

---

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Facultad de Farmacia**

**Departamento de Microbiología**

**Lacasa de *Phanerochaete flavido-alba*: regulación, expresión heteróloga y comparación de las formas nativa y recombinante**



**Benghazi Akhlaki Lamiae**

**TESIS DOCTORAL**



**Universidad de Granada**

**Facultad de Farmacia**

**2015**

---

Editor: Universidad de Granada.Tesis Doctorales  
Autor: Benghazi Akhlaki Lamiae  
ISBN: 978-81-9125-051-7  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/39922>



---

Memoria presentada por **Lamiae Benghazi Akhlaki** para optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Granada

**Fdo: Lamiae Benghazi Akhlaki**

**Los directores**

iii

---

**Dr. José Martínez López**  
Catedrático de Microbiología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

**Dr. Antonio Suárez García**  
Profesor titular de Bioquímica  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

**Dra. Teresa de la Rubia**  
Catedrática de Microbiología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Granada

---



## **AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN**

Los doctores, D. José Martínez López, D. Antonio Suárez García y D<sup>a</sup> Teresa de la Rubia Nieto, como Directores de la Tesis Doctoral titulada: "**Lacasa de *Phanerochaete flavido-alba*: regulación, expresión heteróloga y comparación de las formas nativa y recombinante**", realizada por D<sup>a</sup> **Lamiae Benghazi Akhlaki** en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada **autorizan la presentación a trámite**, dado que reúne todos las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente autorización en Granada a 20 de Diciembre de 2014.

v

---

Fdo. José Martínez- López

Fdo. Antonio Suárez García

Fdo. Teresa de la Rubia Nieto



**D. Alfonso Ruiz-Bravo**, catedrático de Microbiología y Director del departamento de Microbiología de la Universidad de Granada;

**CERTIFICA:**

Que D<sup>a</sup>. **Lamiae Benghazi Akhlaki** , Licenciada en Biología por la Universidad de Abdelmalek Esaadi, ha realizado en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada, bajo la dirección de los Doctores D. José Martínez López, D. Antonio Suárez y D<sup>a</sup> Teresa de la Rubia Nieto, el trabajo de investigación titulado: "**Lacasa de *Phanerochaete flavido-alba*: regulación, expresión heteróloga y comparación de las formas nativa y recombinante**", que presenta para optar al grado de Doctor en Biología.

vii

---

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Granada a 20 de Diciembre de 2014.

Fdo.: Alfonso Ruiz-Bravo



El presente trabajo desarrollado en el **Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada** y en el **Departamento de Biotechnologie des Champignons Filamenteux INRA, Aix Marseille Université**, se ha realizado gracias a las ayudas al grupo de investigación **BIO 250** de la Junta de Andalucía en los años de desarrollo de la tesis, **al contrato de investigación AG2006-11697** del Ministerio de economía y competitividad y a la ayuda para la movilidad de estudiantes del Ministerio de Educación y Ciencia de España.

x

---

*“Vivimos en el mundo cuando amamos. Solo una vida vivida para los demás merece la pena ser vivida”*

*Albert Einstein*



*A mis Padres que en paz descansen*



## Agradecimientos

*Y ahora la parte más difícil, como agradecer a todos aquellos que de una forma directa o indirecta han participado en esta tesis.*

*Lo cierto es que no guardo un recuerdo preciso del momento en que decidí llevar a cabo esta aventura, lo que sí tengo claro es que durante todo este tiempo han sido muchas las personas que me han ayudado en el camino, y a las que me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento.*

*En primer lugar, quiero agradecer a mis directores por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por el apoyo incondicional y la confianza que han depositado en mí desde que entré a formar parte del grupo de investigación. Quisiera agradecerles la disposición para ofrecerme siempre el tiempo y ayuda, que tantas veces he necesitado. Quiero darle las gracias también por su colaboración en el diseño y realización de muchos experimentos, en los que tantas veces he tenido que solventar los problemas y por el entusiasmo que han mostrado a la hora de discutir los resultados lo que me ha ayudado a desarrollar un espíritu crítico.*

*Al Dr. José Antonio Gómez Vidal, por la realización de los análisis de las muestras de decoloración de colorantes textiles por Cromatografía de fases y Espectrometría de masas y por la ayuda prestada en la interpretación de los resultados obtenidos en este estudio.*

*Al Dr. Eric Record , por haberme acogido en su laboratorio de Marsella y por todo el tiempo que dedicó a enseñarme sus conocimientos sobre expresión de enzimas recombinantes, gracias a los cuales pude realizar muchos de los experimentos presentados en este trabajo.*

*A los compañeros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, porque poder trabajar con ellos no sólo ha hecho mucho más llevadera esta Tesis, sino porque en ellos he encontrado una gran amistad.*

*A mi familia en general, por apoyarme, por interesarse siempre por mis andanzas, y por darme algo que no siempre se encuentra, una familia tan unida. Y a mis padres que en paz descanses en especial, por ser un ejemplo para mí y porque si he llegado hasta aquí, ha sido gracias a vosotros.*

# Índice

	Pág.	
<b>I. Introducción.</b>	<b>1</b>	
<b>I.1. La pared celular vegetal.</b>	<b>3</b>	
I.1.2. Polisacáridos.	3	
I.1.3. Lignina.	4	
<b>I.2. Los hongos ligninolíticos.</b>	<b>7</b>	
I.2.1. Hongos de la podredumbre blanca de la madera.	7	
I.2.2. Hongos de la podredumbre parda de la madera.	7	
I.2.3. Hongos de la podredumbre blanda de la madera.	7	<u>xvii</u>
<b>I.3. Biodegradación de los materiales lignocelulósicos.</b>	<b>7</b>	
I.3.1. Biodegradación de celulosas y hemicelulosas.	8	
I.3.2. Biodegradación de la lignina.	8	
I.3.2.1 Peroxidasas ligninolíticas.	9	
I.3.2.2. Lacasas.	12	
I.3.2.3. Oxidasas productoras de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	12	
I.3.2.4. Enzimas reductoras intracelulares.	12	
I.3.2.5. Agentes oxidantes de bajo peso molecular.	13	
<b>I.4. Lacasas.</b>	<b>13</b>	
I.4.1. Lacasas y sus funciones fisiológicas.	14	

I.4.2. Producción de lacasas: condiciones nutricionales y de cultivo.	17
I.4.2.1. Influencia del pH en la producción de lacasas.	17
I.4.2.2. Influencia de la temperatura en la producción de lacasas.	17
I.4.2.3. Influencia del carbono sobre la producción de lacasas.	18
I.4.2.4. Influencia de la fuente de nitrógeno sobre la producción de lacasas.	18
I.4.2.5. Influencia de compuestos aromáticos sobre la producción de lacasas.	18
I.4.2.6. Influencia del cobre sobre la producción de lacasas.	19
I.4.3. Inducción de la producción de las lacasas.	19
I.4.3.1. Inducción de la lacasa por metales.	19
I.4.3.2. Inducción de la lacasa por compuestos aromáticos.	20
I.4.3.3. Inducción de la lacasa por interacciones biológicas.	20
I.4.4. Propiedades fisicoquímicas de las lacasas.	21
I.4.5. Mecanismo catalítico de las lacasas.	22
I.4.6. Actividad catalítica de las lacasas.	24
I.4.7. Potenciales de reducción de las lacasas.	25
I.4.8. Sistemas lacasa mediador.	25
I.4.9. Caracterización molecular de las lacasas.	26
I.4.10. Familias de genes de las lacasas.	27
I.4.11. Expresión heteróloga de las lacasas.	27
I.4.12. Regulación de las lacasas.	32
I.4.13. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas.	34
I.4.13.1. Papel de las lacasas en biorremediación.	35

I.4.13.1.1. Degradación de xenobióticos por las lacasas.	36
I.4.13.1.2. Papel de las lacasas en la decoloración de colorantes textiles.	36
I.4.13.1.3. Papel de las lacasas en el tratamiento de efluentes.	37
I.4.13.2. Papel de las lacasas en la industria del papel.	38
I.4.13.3. Papel de las lacasas como biosensores.	38
I.4.13.4. Papel de las lacasas en la industria del vino y bebidas.	39
<b>I.5. Referencias de la introducción.</b>	<b>40</b>
<b>II. Objetivos.</b>	<b>69</b>
<b>III. Material y métodos.</b>	<b>73</b>
<b>III.1. Microorganismos.</b>	<b>75</b>
III.1.1. Cepas fúngicas.	75
III. 1.2. Cepas bacterianas.	75
<b>III.2. Vectores plasmídicos.</b>	<b>75</b>
<b>III. 3. Medios de cultivo y soluciones.</b>	<b>76</b>
III.3.1. Medios de cultivo para <i>P. flavido-alba</i> .	76
III.3.1.1. Medio de mantenimiento.	76
III.3.1.2. Medio basal.	77
III.3.1.3. Medio para la producción de lacasa.	79
III.3.1.4. Medio para la inducción de la actividad lacasa.	79
III.3.2. Medios de cultivo para <i>Aspergillus niger</i> .	79
III.3.2.1. Medios generales.	79
III.3.2.2. Medios selectivos.	81

III.3.2.3. Medio acetamida ABTS.	82
III.3.3. Medios de cultivo para bacterias.	82
III.3.3.1. Medio de Luria Bertani.	82
<b>III.4. Cultivo de <i>P. flavido-alba</i>.</b>	<b>83</b>
III.4.1. Obtención de inóculos.	83
III.4.2. Condiciones de cultivo.	83
III.4.3. Cultivos inducidos para el estudio de la inducción de la expresión de la lacasa.	83
III.4.3. 1. Inducción por vainillina y ácido suberanilo hidroxámico (SAHA).	83
<b>III.5. Cultivos de <i>A. niger</i>.</b>	<b>84</b>
<b>III.6. Purificación de la lacasa de <i>P. flavido-alba</i>.</b>	<b>85</b>
III.6.1. Ultrafiltración y diálisis.	85
III.6.2. Cromatografías.	85
III.6.2.1. Cromatografía de intercambio aniónico.	85
III.6.2.2. Cromatografía de exclusión molecular.	85
<b>III. 7. Determinaciones analíticas.</b>	<b>86</b>
III.7.1. Valoración de proteínas.	86
III.7.2. Valoración de la actividad lacasa.	86
III.7.3. Electroforesis.	86
III.7.4. Western blot e inmunodetección de la lacasa.	89
III.7.5. Determinación del extremo amino terminal.	90
<b>III.8. Métodos de análisis de ácidos nucleicos.</b>	<b>90</b>
III.8.1. Aislamiento y purificación de ARN de <i>P. flavido-alba</i> .	90

III.8.2. Síntesis de ADNc mediante transcripción inversa (RT).	91
III.8.3. Determinación de la expresión de <i>pfaL</i> mediante PCR semicuantitativa (QPCR).	92
III.8.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	94
III.8.5. Electroforesis en gel de agarosa.	94
III.8.6. Purificación de ADN de geles de agarosa.	95
III.8.7. Clonación del fragmento de ADN.	95
III.8.8. Preparación de células de <i>E.coli</i> XL1.Blue electrocompetentes y transformación.	96
III.8.9. Preparación de ADN plasmídico.	97
III.8.10. Digestión con endonucleasas de restricción.	97
III.8.11. Secuenciación de ADN.	97
<b>III.9. Preparación de protoplastos y cotransformación de <i>A. niger</i>.</b>	<b>98</b>
<b>III.10. Caracterización de la enzima recombinante y comparación enzimática con la enzima nativa.</b>	<b>100</b>
III.10.1. Producción de lacasa de <i>P. flavido-alba</i> por <i>A. niger</i> .	100
III. 10.2. pH óptimo y estabilidad frente al pH y la temperatura	101
III.10.3. Estabilidad a disolventes orgánicos.	102
III.10.4. Parámetros cinéticos.	102
III.10.5. Valoración de las actividades enzimáticas con distintos sustratos.	102
III.10.6. Efecto de los iones metálicos.	103
III.10.7. Efecto de los inhibidores.	103
<b>III.11. Decoloración de colorantes textiles.</b>	<b>103</b>
III.11.1. Colorantes textiles.	103

III.11.2. Productos químicos y reactivos.	104
<b>III.12. Degradación del colorante textil NY1 por las lacasas nativa y recombinante.</b>	<b>104</b>
III.12.1. Preparación de las muestras.	104
III.12.2. Análisis de los compuestos por cromatografía de gases y espectrometría de masas.	104
<b>III. 13. Referencias del material y métodos.</b>	<b>106</b>
<b>IV. Resultados.</b>	<b>111</b>
<b>IV.1. Inducción de la producción de la lacasa de <i>P. flavido-alba</i></b>	<b>113</b>
IV.1.1. Inducción por sustratos aromáticos.	113
IV.1.2. Producción y purificación de lacasa nativa en cultivos de <i>P. flavido-alba</i> añadidos de vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído).	113
IV.1.3. Inducción de la producción de la lacasa de <i>P. flavido-alba</i> por inhibidores de histona desacetilasas.	118
IV.1.4. Demostración del efecto inductor de vainillina y SAHA por cuantificación de la producción de ARNm.	122
<b>IV. 2. Expresión heteróloga del gen <i>pfaL</i> en <i>A. niger</i>.</b>	<b>124</b>
IV. 2.1. Clonación de la secuencia codificante del gen <i>pfaL</i> .	124
IV. 2.2. Obtención de transformantes.	125
IV.2.3. Producción y purificación de PfaLr.	127
IV.2.4. Purificación de la lacasa recombinante.	128

IV.2.5. Comparación de los enzimas nativo y recombinante.	132
IV.2.5.1. pH óptimo.	132
IV.2.5.2. Estabilidad frente al pH.	133
IV.2.5.3 Estabilidad frente a la temperatura.	134
IV.2.5.4. Estabilidad en disolventes orgánicos.	135
IV.2.5.5. Constantes cinéticas.	136
IV.2.5.6. Sensibilidad a inhibidores.	137
IV.2.5.6.1. Interferencia de moléculas orgánicas en la oxidación del ABTS.	137
IV.2.5.6.2 Interferencia de metales en la oxidación del ABTS.	138
<b>IV.3. Decoloración de tintes textiles.</b>	<b>139</b>
<b>IV.4. Referencias de los resultados.</b>	<b>144</b>
<b>V. Discusión.</b>	<b>147</b>
<b>V.1. Inducción de la lacasa de <i>P.flavido-alba</i> y <i>T.versicolor</i> por vainillina y por SAHA.</b>	<b>149</b>
V.1.1. Aspectos metodológicos.	149
V.1.2. Inducción de las lacasas por vainillina y por SAHA.	150
<b>V.2. Expresión heteróloga de <i>pfaL</i> en <i>A. niger</i>.</b>	<b>152</b>
V.2.1. Purificación de la lacasa recombinante.	153
V.2.2. Comparación de la enzima nativa y recombinante.	154
V.2.2.1. pH óptimo y estabilidad al pH.	154
V.2.2.2. Estabilidad frente a la temperatura.	154
V.2.2.3. Estabilidad a disolventes orgánicos.	155

V.2.2.4. Constantes cinéticas.	155
V.2.2.5. Sensibilidad a inhibidores.	156
V.2.2.6. Efecto de los iones metálicos.	157
<b>V.3. Decoloración y degradación de colorantes textiles.</b>	<b>157</b>
<b>V.4. Consideración final.</b>	<b>157</b>
<b>V.5. Referencias de la Discusión.</b>	<b>158</b>
<b>VI. Conclusiones.</b>	<b>171</b>
<b>VII. Índice de Figuras y Tablas.</b>	<b>176</b>

## **Publicaciones**

De la presente Tesis Doctoral se han obtenido las siguientes publicaciones:

- **Benghazi, L.**, Record, E., Suarez, A., Gómez-Vidal, J., Martínez, J. y de la Rubia, T. (2014).

Título: **Production of the *Phanerochaete flavid-alba* laccase in *Aspergillus niger* for synthetic dyes decolorization and biotransformation.**

JOURNAL: World Journal of Biotechnology and Microbiology. **30**: 201-211.

- **Benghazi, L.**, Record, E., Martínez, J. y de la Rubia, T. (2013)

Título: **Comparison of biochemical properties of recombinant and native *Phanerochaete flavid-alba* laccases**

JOURNAL: Journal of Agricultural Science and Technology B **3**: 776-782

xxv

---

## **Contribuciones a Congresos**

1. **Benghazi, L.**, Suarez, A., Gomez-Vidal, J., Martinez, J., de la Rubia, T., (2013). **Lacasa recombinante de *Phanerochaete flavid-alba* para su aplicación en la transformación y decoloración de colorantes sintéticos.** XXIV Congreso de Microbiología, **Barcelona, 10-13 julio.** España.
2. **Benghazi, L.**, Gomez-Vidal, J., Martinez, J. y de la Rubia, T., (2012). **Expression and Purification of recombinant Laccase from *Phanerochaete flavid alba* en *Aspergillus niger* and its use for decolorization of textile synthetic dyes.** Congreso Internacional de Microbiología, **Marrakech, 2-4 Octubre.** Marruecos.

3. **Benghazi, L.**, Record, E., Martinez, J. y de la Rubia, T., (2012). **Comparison of biochemical properties of recombinant and native *Phanerochaete flavidobalva* Laccases.** Congreso Internacional de Microbiología, Marrakech, 2-4 octubre .Marruecos.
4. **Benghazi, L.**, Suarez, A., de la Rubia, T., Record, E. y Martinez, J. (2011). **Expresión de la lacasa de *Phanerochaete flavidobalva* en *Aspergillus-Niger*.** SEM XXIII Congreso Nacional de Microbiología. Salamanca, 11-14 julio. España.
5. **Benghazi, L.**, Martinez-López, J., Suarez, A. y Rodríguez-Rincón F. (2010). **Régulación de la expresión de la Lacasa de *Phanerochaete flavidobalva*.** Congreso nacional de la sociedad Francesa De Microbiología. Marseille, 2-3-4 Junio, Francia

## Abreviaturas

<b>ABTS</b>	2.2'-azinobis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BL</b>	Medio basal para la producción de lacasa de <i>P. flavido-alba</i>
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>BTEX</b>	Benceno, tolueno y xileno
<b>C<sub>t</sub></b>	Ciclo umbral de PCR en tiempo real
<b>DDT</b>	1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano
<b>DMF</b>	N,N-Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EDTA</b>	Ácido etilén-diamino-tetraacético
<b>EGTA</b>	ácido etilenglicol tetraacético
<b>E<sub>0</sub></b>	Potencial de reducción
<b>ε<sub>λ</sub></b>	Coefficiente de extinción molar a una longitud de onda (λ)
<b>FPLC</b>	Cromatografía líquida rápida de alta eficacia (Fast protein liquid chromatography)
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas
<b>HDACs</b>	Inhibidores de las histonas desacetilasas
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución. (High Performance Liquid Chromatography)
<b>K<sub>cat</sub></b>	Constante catalítica de una reacción enzimática
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante Michaelis-Menten
<b>LB</b>	Medio de cultivo de Luria Bertrani
<b>LMS</b>	Sistema lacasa mediador
<b>MB</b>	Medio basal para el cultivo de <i>P.flavido-alba</i>
<b>MCOs</b>	Oxidasas multicobre
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NY1</b>	Acid red 299: (ácido 3-(4-(4-(bis(2-hidroxietyl) amino) fenildiazenil) naftalen-1-il) diazenil) benceno sulfónico.
<b>PAGE</b>	Polyacrilamide Gel Electrophoresis (electroforesis en geles de poliacrilamida)
<b>PAH</b>	Hidrocarburo policíclico aromático
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino

<b>PCB</b>	Bifenoles policlorados
<b>PCP</b>	Pentaclorofenoles
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b><i>pfaL</i></b>	Gen de la lacasa de <i>P. flavido-alba</i>
<b>PfaL</b>	Lacasa de <i>P. flavido-alba</i>
<b>QPCR</b>	PCR cuantitativa en tiempo real
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>SAHA</b>	Ácido suberanilo hidroxámico (vorinostar)
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida
<b>TAE</b>	Buffer tris acetato EDTA
<b>TBS</b>	Buffer tris salino
<b>TBS-T</b>	Buffer tris salino-Tween
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
<b>TEMPO</b>	2,2',6,6'-tetrametil-piperidina-N-oxil
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura media de desnaturalización del DNA
<b>TNT</b>	Trinitrotolueno
<b>U</b>	Unidad internacional de actividad enzimática
<b>VAN</b>	Metoxibencil alcohol
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima de una reacción enzimática
<b>WRF</b>	White-rot-fungi: hongos de la podredumbre blanca de la madera
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolin-β-D-galactósido
<b>YMPG</b>	Medio de cultivo "Yeast-Malt-Peptide-Glucose"

## Resumen

Los hongos de la podredumbre blanca constituyen un interesante grupo de organismos con gran potencial biotecnológico debido a su habilidad para degradar el polímero de la lignina y compuestos aromáticos.

La lacasa de *Phanerochaete flavid-alba* tiene unas propiedades que la hacen particular entre las enzimas de este tipo de los basidiomicetos. El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar la inducción, producción, purificación de esta lacasa, y expresión heteróloga del gen que la codifica en *Aspergillus niger*. Para ello hemos definido los efectos de inhibidores de histona desacetilasas (HDACs) y el efecto de otros inductores aromáticos sobre la producción de la enzima nativa. Finalmente el trabajo describe un sistema de expresión heteróloga del gen de lacasa de *P. flavid-alba* que ha permitido la caracterización físico-química de la enzima expresada. Además ha permitido estudiar la capacidad de esta enzima recombinante para degradar colorantes textiles. Los resultados presentados en esta tesis doctoral confirman su potencial aplicación en este tipo de estrategias de biorremediación.

xxix

---

En este sentido hemos demostrado que la laccasa de *P. flavid-alba* puede producirse en cantidades razonables en *A. niger*, con mayor rendimiento que la lacasa nativa y con propiedades ventajosas como su estabilidad a pH alcalino y frente a disolventes orgánicos. Además, hemos comprobado que no necesita mediadores redox para oxidar de manera eficiente dos colorantes textiles de diferente estructura química. Todos estos resultados indican la utilidad potencial de la lacasa recombinante de *P. flavid-alba*.

## Resumé

Grâce à leur capacité à dégrader les polymères de lignines et les composés aromatiques, les champignons de la pourriture blanche constituent un groupe intéressant d'organismes avec un remarquable potentiel biotechnologique.

Dans le cadre de la thèse, nous avons essayé de déterminer ce potentiel avec pour modèle, la laccase de *Phanerochaete flavido-alba*. L'objectif principal de ce travail a été d'étudier l'induction, la production et la purification de cette laccase, ainsi que l'expression heterologue du gène codant chez *Aspergillus niger*. Nous avons tout d'abord défini l'effet inhibiteur des histones desacetylases (HDACs) et l'effet d'inducteurs aromatiques sur la production de l'enzyme native. Nous avons également mis en place un système d'expression heterologue du gène codant pour la lacase de *P.flavido-alba*, ce qui a permis d'obtenir la caractérisation physico-chimique de l'enzme recombinante. En outre, nous avons étudié la capacité de cette enzyme à dégrader des colorants textiles. Les résultats présentés dans cette thèse doctorale confirment son application potentielle en bio-rémédiation.

xxx

---

Nous avons démontré que la laccase de *P.flavido-alba* peut être produite en quantité raisonnable dans *A. niger*, avec un rendement plus élevé que la souche sauvage. Les propriétés de la lacase natif se sont révélées avantageuses, comme sa stabilité au pH alcalino ou à des solvants organiques. De plus, nous avons vérifié qu'il n'a pas besoin des médiateurs redox pour oxyder de manière efficace deux colorants textiles de différentes structures chimiques. Tous ces résultats indiquent la possibilité d'utiliser la laccase recombinante de *P. flavido-alba* dans des applications biotechnologiques

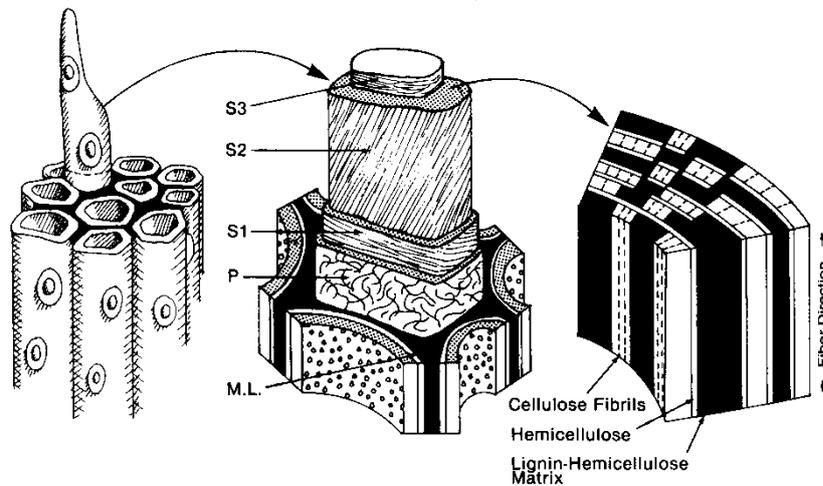


## **I. INTRODUCCIÓN**



## I.1. La pared celular vegetal

En la tierra, las plantas son las encargadas de fijar el CO<sub>2</sub> atmosférico que se acumula mayoritariamente en las paredes celulares vegetales de naturaleza lignocelulósica y constituye el paso más importante en la incorporación de carbono inorgánico a los ecosistemas. Parte de este carbono es incorporado en las plantas en forma de tejidos de defensa y sostén, son los conocidos como materiales lignocelulósicos: los polisacáridos: celulosa y hemicelulosa y la lignina que son los principales componentes de las paredes celulares de las plantas superiores (**Figura 1**).



**Figura 1.** Esquema de la localización de los principales componentes de la pared celular de los tejidos leñosos vegetal. P: pared primaria, S1-S3: capas de la paredes celular secundarias y ML: lámina media (Kirk y Cullen, 1998).

### I.1.2. Polisacáridos

La celulosa supone un 45% del peso de la madera. Es un polímero lineal de largas cadenas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1,4). Las cadenas se unen entre sí, dando lugar a las fibrillas elementales, que a su vez se unen formando las microfibrillas que están cubiertas de hemicelulosa y lignina (Fugita y Harada, 1991). La composición de la celulosa es semejante en todas las plantas (angiospermas y gimnospermas). Las hemicelulosas representan entre un 25% y un 30% del peso

de la madera. Son heteropolímeros constituidos por diversos azúcares unidos por enlaces  $\beta$ -(1,4) y a veces  $\beta$ -(1,3). Sus constituyentes principales son D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, L-arabinosa y los ácidos 4-*O*-metilglucurónico y D-galacturónico. Las hemicelulosas difieren de la celulosa en que presentan ramificaciones con cadenas laterales cortas de azúcares diferentes a los de la cadena principal. La composición de las hemicelulosas varía entre las diferentes especies. Las de angiospermas son ricas en xilanos, mientras que las de gimnospermas lo son en mananos (Fengel y Wegener, 1984).

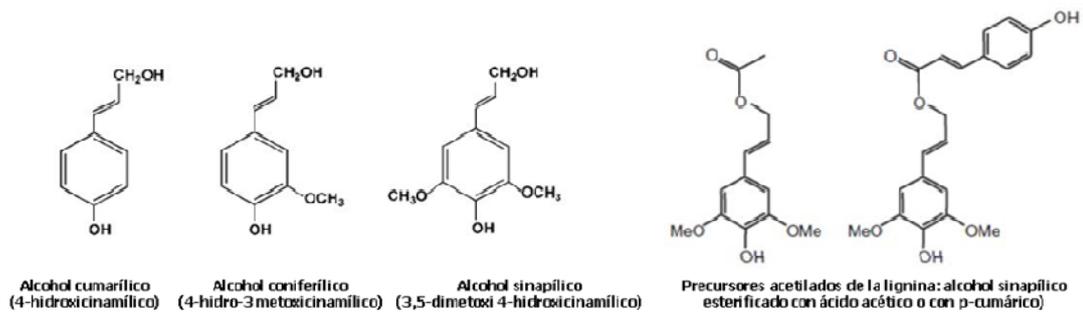
### I.1.3. Lignina

La lignina es, junto con la celulosa, el polímero más abundante en la naturaleza, representa más del 15% de la biomasa terrestre. Proporciona a la pared celular vegetal: soporte estructural, impermeabilidad y resistencia frente al ataque microbiano y al estrés oxidativo (Higuchi, 1990). Es un heteropolímero aromático complejo, altamente ramificado e insoluble, formado por unidades sustituidas de fenilpropano unidos por enlaces éter y C-C entre el carbono del anillo aromático y las cadenas laterales alifáticas.

4

Este polímero se sintetiza en las paredes celulares de las plantas por acoplamiento oxidativo de los radicales fenoxi originados en las oxidaciones de los alcoholes precursores fenilpropano, producidos principalmente por las peroxidasas y fenol oxidadas de las plantas.

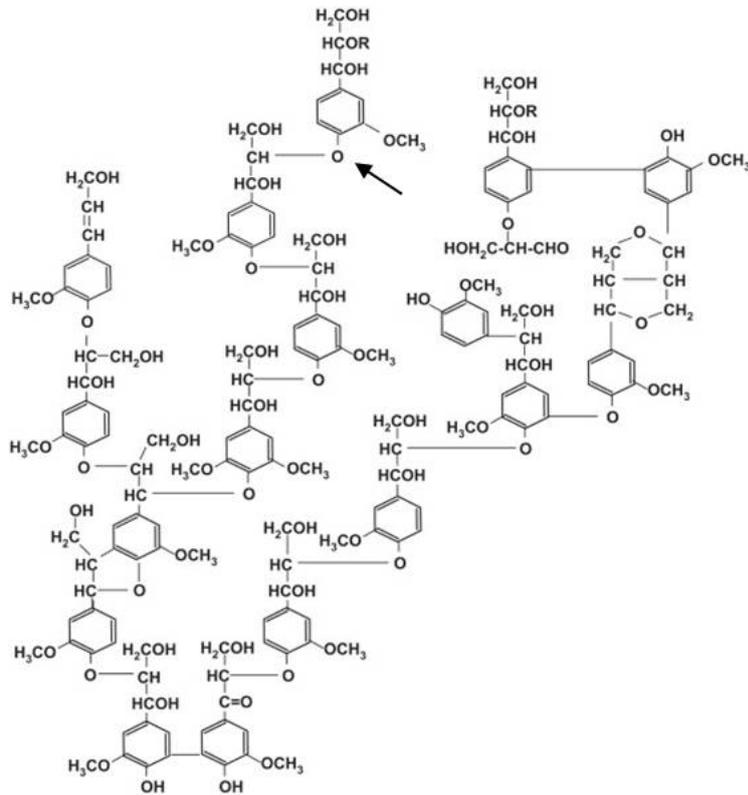
La biosíntesis de los precursores tiene lugar a partir de la fenilalanina, a través de la ruta de los ácidos cinámicos (Higuchi, 1990). Inicialmente se sintetizan los alcoholes cinámicos, cumarílico (4-hidroxicinámico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinámico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico), que representan respectivamente las unidades 4-hidroxifenilio (H), guayacilo (G) y siringilo (S) de la lignina (Higuchi, 1997). Recientemente, se ha descrito la existencia de otro tipo de monómeros no convencionales, como los alcoholes *p*-hidroxicinámicos acetilados en el carbono- $\gamma$  de la cadena lateral (Lu y Ralph, 2002) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Precusores fenilpropano de la unidad estructural de la lignina.

La polimerización de los precusores tiene lugar por la sucesión de etapas enzimáticas que generan radicales, y etapas químicas en las que los radicales se unen formando dímeros, estos son de nuevo oxidados y se unen con los monómeros o entre sí y progresivamente se forma el polímero (Higuchi, 1990).

Las diversas unidades H, G y S se unen entre sí por diferentes tipos de enlaces, aunque el más abundante (más del 50% del total de enlaces) es el enlace aril-éter  $\beta$ -O-4 entre el C<sub>4</sub> del anillo bencénico y el C <sub>$\beta$</sub>  de la cadena lateral, que implica al oxígeno fenólico de los precusores, por ello el contenido de unidades fenólicas de la lignina es muy bajo y esto provoca su difícil degradación. En la **Figura 3** se muestra un esquema de la estructura de la lignina de coníferas, en ella se recogen los diversos tipos de enlaces que se establecen entre los monómeros fenilpropano.



**Figura 3.** Modelo estructural de la lignina de coníferas basado en el propuesto por Adler (1977). Se indica con una flecha el tipo de enlace mayoritario  $\beta$ -O-4.

La heterogeneidad de la lignina es debida a la expresión diferencial de las enzimas monooxigenasas y reductasas, que participan en la ruta de los ácidos cinámicos, lo que conduce a diferentes proporciones de unidades H, S y G (Higuchi, 1997; Donaldson, 2001), y a la reactividad entre diferentes radicales fenoxilo formados durante la oxidación de estas unidades por enzimas de tipo fenol-oxidasa. La variedad de los tipos de enlaces y su estructura amorfa confieren a la lignina una gran complejidad (Fengel y Wegener, 1984) que conduce a diferencias en el contenido, distribución y composición a nivel de organismos, tejidos e incluso capas dentro de la pared celular de una misma planta (Higuchi, 1990).

## **I.2. Los hongos ligninolíticos**

Los hongos ligninolíticos son organismos que pertenecen al grupo de Basidiomicetos o de Ascomicetos, estos últimos juegan un papel muy importante en el ciclo de carbono (Wesenberg y col., 2003). Dentro de este grupo encontramos hongos de la podredumbre blanda, parda y blanca de la madera.

### **I.2.1. Hongos de podredumbre blanca de la madera (WRF)**

Los hongos de podredumbre blanca de la madera constituyen un interesante grupo de organismos con gran potencial biotecnológico debido a su habilidad para degradar el polímero de lignina (Kirk y Farrell, 1987) y compuestos aromáticos. Producen acúmulos de celulosa que dan a la madera una apariencia blanquecina (Pointing, 2001). Estos hongos degradan los componentes de la madera y causan su mineralización y despolimerización (Cheng y Chang, 1985). Los hongos de la podredumbre blanca poseen un sistema oxidativo no específico que incluye varias oxidorreductasas extracelulares, metabolitos de bajo peso molecular y especies reactivas de oxígeno (Schoemaker y Leisola, 1990)

### **I.2.2. Hongos de podredumbre parda de la madera**

7

---

Los hongos de la podredumbre parda son exclusivamente Basidiomicetos y representan únicamente el 7% de los hongos degradadores de la madera. Atacan fundamentalmente la celulosa y la hemicelulosa y producen una degradación parcial de la lignina generando una acumulación de lignina oxidada que aporta el color pardo a la madera y de esto proviene su nombre (Martínez y col., 2005).

### **I.2.3. Hongos de podredumbre blanda de la madera**

Los hongos que pertenecen a este grupo son en su mayoría Ascomicetos y también algunos basidiomicetos, pueden provocar este tipo de podredumbre (Martínez y col., 2005), estos hongos atacan la celulosa y la hemicelulosa de la madera reblandeciendo sus tejidos y producen una descomposición superficial de la misma.

## **I.3. Biodegradación de los materiales lignocelulósicos**

La biodegradación de materiales lignocelulósicos es un proceso natural de gran importancia para su reciclado en los ecosistemas (Blanchette, 1995; Pérez y col., 2002).

### I.3.1. Biodegradación de celulosas y hemicelulosas

La conversión de celulosas y hemicelulosas en azúcares más simples es llevada a cabo por un gran número de organismos (bacterias, hongos y protozoos) que secretan diferentes tipos de hidrolasas capaces de degradar estos polisacáridos en mono y disacáridos (Leonowicz y col., 1999).

Las celulasas de origen fúngico, principalmente de los géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium*, han sido las más estudiadas ya que estos organismos las producen extracelularmente y por tanto se facilita su separación en los medios de cultivo. El complejo celulolítico de estos hongos está formado por distintos componentes que actúan sinérgicamente. Este sistema enzimático tiene tres tipos diferentes de actividades, endo- $\beta$ -glucanasa, exo- $\beta$ -glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa (Montenecourt y Eveleigh, 1979). La endoglucanasa actúa al azar en el interior del polímero hidrolizando enlaces  $\beta$ -(1,4) y generando nuevos extremos de cadena no reductores. Las exoglucanasas actúan sobre ellos liberando moléculas de celobiosa o de glucosa y la  $\beta$ -glucosidasa hidroliza celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño. Existen distintos tipos de enzimas que degradan hemicelulosas (endo y exoxilanasas y  $\beta$ -xilosidasas) que presentan alta especificidad según los azúcares que constituyen las cadenas

### I.3.2. Biodegradación la lignina

La lignina es por sus características estructurales un polímero de muy difícil degradación (Barr y Aust, 1994), además su gran tamaño, impide su metabolismo intracelular, por ello, la degradación de la lignina es un paso limitante en el reciclado del carbono en los ecosistemas terrestres (Buswell y Odier, 1987).

Existen diferentes organismos capaces de degradar la lignina, en mayor o menor medida, entre los que se encuentran bacterias como *Pseudomonas*, *Xantomonas* y *Streptomyces*, (Buswell y Odier, 1987), hongos ascomicetos como *Chrysonilia sitophyla* (Buswell y Odier, 1987) y deuteromicetos como *Fusarium proliferatum* (Buswell y Odier, 1987; Regalado y col., 1997). El principal grupo de hongos que degradan la lignina de la madera es el de los basidiomicetos. Dentro de este grupo de basidiomicetos, se encuentran los únicos organismos capaces de mineralizar eficientemente la lignina: los hongos de la podredumbre blanca (Crawford, 1981; Buswell y Odier, 1987). Entre estos organismos, *Phanerochaete chrysosporium* ha sido históricamente el organismo utilizado como modelo en los estudios de biodegradación de la lignina (Schoemaker y col., 1991) a pesar de que no es el más

selectivo en la degradación del polímero.

La biodegradación de lignina es un proceso complejo catalizado por enzimas que muestran una gran inespecificidad (Kirk y Farrell, 1987). El proceso implica tanto la despolimerización inicial de la lignina como la transformación que sufren los productos derivados de la lignina para incorporarse en las rutas generales del metabolismo.

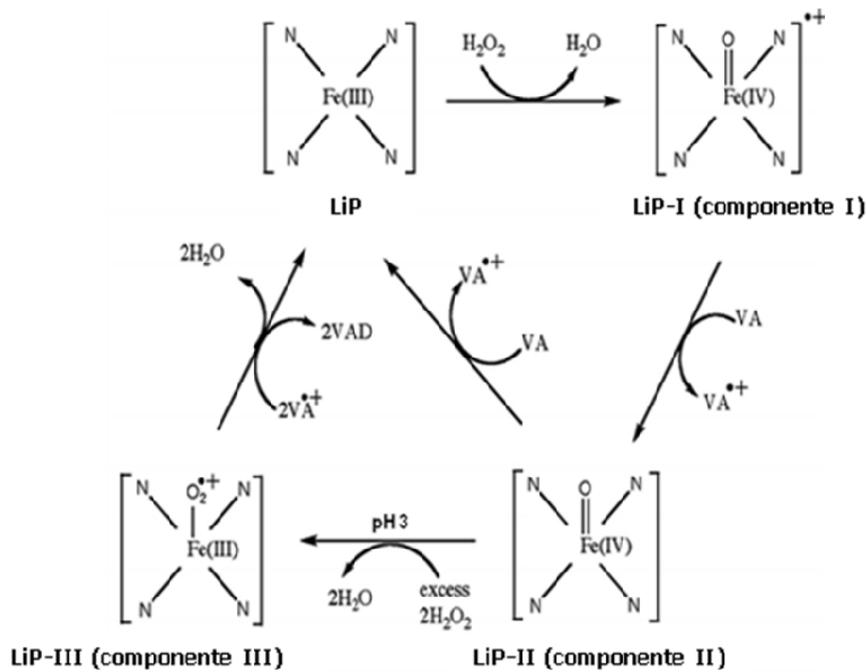
Es un proceso oxidativo, enzimático y radicalario. En él intervienen las enzimas oxidorreductasas ligninolíticas propiamente dichas (lacasas y peroxidasas) y variedad de enzimas auxiliares (oxidasas productoras de  $H_2O_2$ , celobiosa deshidrogenasa, reductasas miceliales, etc.). También intervienen radicales altamente oxidativos generados durante el proceso. Entre estos últimos se incluyen especies activas de oxígeno, iones de metales oxidados y radicales de compuestos de bajo peso molecular, liberados durante la degradación del polímero, que son capaces de atacar la lignina de forma no específica y penetrar en la pared celular, accediendo a zonas donde, por sus tamaños, las enzimas no pueden acceder (Kawai y col., 1989; Evans y col., 1994; Guillén y col., 2000; Camarero y col., 2005; Martínez y col., 2005; Gorbacheva y col., 2009).

#### **I.3.2.1. Peroxidasas ligninolíticas**

La primera peroxidasa ligninolítica identificada fue la lignina peroxidasa (LiP) (Tien, 1988; Glenn y col., 1983), con posterioridad a su hallazgo en *P. chrysosporium*, la LiP ha sido detectada en otros muchos hongos (Hatakka, 1994).

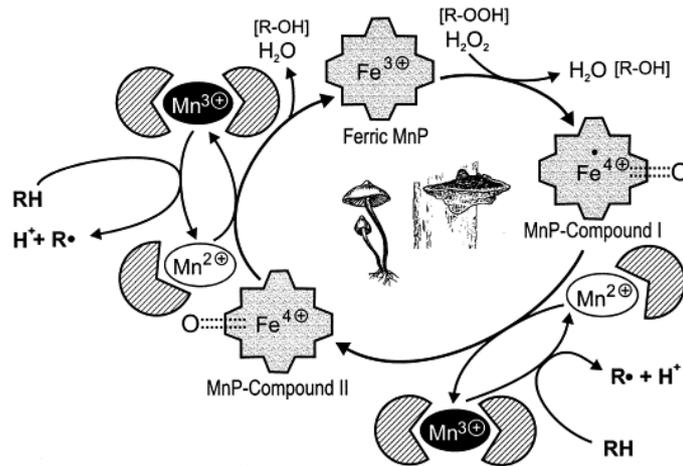
La LiP posee un fuerte poder oxidante y no solamente oxida los sustratos habituales de las peroxidasas como, fenoles y anilinas, sino también una variedad de estructuras no fenólicas y éteres aromáticos semejantes a las unidades estructurales básicas de la lignina (Tuor y col., 1992).

La interacción de LiP con un sustrato se lleva a cabo mediante un mecanismo "ping-pong" donde el  $H_2O_2$  oxida la enzima dando lugar al compuesto I ó LiP-I (**Figura 4**). Posteriormente, el compuesto I es reducido en dos pasos consecutivos por sustratos orgánicos para formar el compuesto II ó LiP-II y la enzima nativa. En exceso de  $H_2O_2$  y ausencia de sustratos reductores, ocurre la inactivación del enzima al compuesto III ó LiP-III. Este puede ser convertido a la enzima nativa por autooxidación espontánea o por oxidación con el radical catiónico del alcohol veratrílico (Wong, 2009).



**Figura 4.** Ciclo catalítico de la LiP tomado de Wong, 2009.

Un año después del descubrimiento de la LiP, se descubrió una segunda peroxidasa ligninolítica: manganeso peroxidasa (MnP) (Kawahara y col., 1984). A diferencia de la LiP, la MnP solo es capaz de oxidar compuestos fenólicos, además requiere la presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  para cerrar su ciclo catalítico (**Figura 5**). El enzima es oxidada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  o peróxidos orgánicos para dar el compuesto I (MnP-I), la reducción de este compuesto I por  $\text{Mn}^{2+}$  da lugar al compuesto II (MnP-II) y este es reducido a la enzima nativa de forma similar por la oxidación de otra molécula de  $\text{Mn}^{2+}$ . Mientras que el compuesto I de la MnP puede ser reducido al compuesto II no solo por  $\text{Mn}^{2+}$  sino por otros donadores de electrones, el compuesto II de la MnP solo puede ser reducido al enzima nativa por el  $\text{Mn}^{2+}$  por lo que este es un reductor obligado para cerrar el ciclo (Hofrichter, 2002).



**Figura 5.** Ciclo catalítico de la MnP tomado de Hofrichter, 2002.

El  $Mn^{3+}$  formado por la MnP es a su vez un agente oxidante que, una vez estabilizado en forma de quelatos, es capaz de oxidar rápidamente las unidades fenólicas y también las no fenólicas a través de reacciones de peroxidación de lípidos (Jensen y col., 1996). La capacidad de sintetizar manganeso peroxidasa está ampliamente distribuida entre los hongos ligninolíticos (Hatakka, 1994; Peláez y col., 1995).

Al igual que la LiP, la MnP también se inactiva en exceso de peróxidos y ausencia de sustratos reductores.

La tercera peroxidasa ligninolítica es la peroxidasa versátil (VP) descrita por primera vez en *Pleurotus eryngii* como un tipo de manganeso peroxidasa capaz de oxidar  $Mn^{2+}$  y sustratos no fenólicos típicos de la lignina peroxidasa (Ruiz-Dueñas y col., 1999; Camarero y col., 1999). Posteriormente se han aislado de otros hongos como *Bjerkandera adusta* (Wang y col., 2003), *Bjerkandera* sp. B33/3 (Moreira y col., 2007) y *Pleurotus ostreatus* (Kamitsuji y col., 2004).

Este grupo de enzimas no solo oxidan el  $Mn^{2+}$  como las MnPs sino que también oxidan sustratos aromáticos de alto potencial redox típicos de la LiP como el alcohol veratrílico, metoxibencenos y modelos de lignina en ausencia de manganeso (Camarero y col., 1999). Esta enzima puede también oxidar eficazmente colorantes de alto potencial redox como el colorante Reactive Black Blue 5 (RB5) así como una variedad de fenoles e incluso hidroquinonas (Heinfling y col., 1998).

La participación de la VP en la degradación del polímero de lignina se ha puesto de

manifiesto recientemente por Salame y col., 2013. Estos autores demuestran que la inactivación del gen *mnp2* de *P. ostreatus*, que codifica la VP2, provoca una reducción de entre un 14% a un 36% de la mineralización de la lignina tanto en medios adicionados como no adicionados de  $Mn^{2+}$ .

#### **I.3.2.2. Lacasa**

La mayoría de los hongos de la podredumbre blanca de la madera secretan una o varias lacasas (Giardina y col., 2009). Por ser el objetivo de esta tesis, la descripción de esta enzima se realizará en el **apartado 2** de esta introducción.

#### **I.3.2.3. Oxidasas productoras de $H_2O_2$**

Para la actuación de las peroxidasas ligninolíticas, en la degradación de la lignina, los WRF requieren peróxido extracelular. Este peróxido es producido principalmente por dos enzimas: glioxal oxidasa (Kersten y Kirk, 1987) y aril alcohol oxidasa (AAO) (Guillén y col., 1994).

La glioxal oxidasa fue descrita por primera vez en cultivos de *P. chrysosporium* en condiciones ligninolíticas (Kersten y Kirk, 1987), y posteriormente también en otros hongos como en *Phlebia radiata* (Vares y col., 1994). Esta enzima es capaz de generar  $H_2O_2$  extracelular mediante la oxidación de muy diversos metabolitos secretados por el hongo, como el glioxal, metilglioxal o el ácido glioxílico (Kersten, 1990).

La aril alcohol oxidasa se ha descrito en hongos del género *Pleurotus* (Bourbonnais y Paice, 1988; Guillén y col., 1990; Sannia y col., 1991), y en otras especies, como *B. adusta* (Muheim y col., 1990). Tiene una amplia especificidad de sustrato. En *P. eryngii* se ha comprobado que es capaz de oxidar alcoholes primarios alfa-insaturados y alcoholes alifáticos insaturados generando  $H_2O_2$  extracelular (Guillén y col., 1994). Algunos sustratos de la aril alcohol oxidasa (principalmente los alcoholes aromáticos) son producidos durante la despolimerización de la lignina a través de reducciones enzimáticas de esta forma estos sustratos están disponibles para la actuación de esta enzima durante la degradación del polímero.

#### **I.3.2.4. Enzimas reductoras intracelulares**

El micelio de los WRF reduce las quinonas, los aldehídos y los ácidos aromáticos producidos por ellos o liberados durante la degradación de la lignina (Ander y col.,

1984). Entre las enzimas reductoras miceliales cabe destacar la aril alcohol deshidrogenasa y la quinona reductasa (Constam y col., 1991). Sus funciones podrían ser: la reducción de quinonas y radicales fenoxilo impidiendo su repolimerización y toxicidad, y la reducción de los productos derivados de la despolimerización de la lignina, que es un requisito para que continúe su degradación, ya que al ser reducidos, se convierten de nuevo en sustratos de las enzimas ligninolíticas (Schoemaker y col., 1989).

#### **I.3.2.5. Agentes oxidantes de bajo peso molecular**

Los hongos ligninolíticos se caracterizan por producir gran cantidad y variedad de metabolitos extracelulares (Shimada y Higuchi, 1991). Algunos de estos compuestos participan en la degradación de la lignina; como mediadores de las enzimas ligninolíticas, como el alcohol veratrílico o el ácido hidroxiantranílico mediadores de la LiP (Cancel y col., 1993) y de la lacasa (Eggert y col., 1996); otros como sustratos de las enzimas (como el glioxal o metilglioxal) para la glioxal oxidasa o los ácidos dicarboxílicos que estabilizan al  $Mn^{3+}$  producido por la MnP (Kishi y col., 1994) y además están implicados en la formación de especies reactivas del oxígeno

Además de estos metabolitos aromáticos estos hongos producen también especies reducidas del oxígeno como  $H_2O_2$ , anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) que debido a su alto potencial redox son capaces de atacar directamente a la lignina (Backa y col., 1993).

#### **I.4. Lacasas**

La lacasa (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxígeno oxidoreductasa) es una de las pocas enzimas que han sido estudiadas desde el siglo XIX. Fue descrita por primera vez en 1883 en exudados de la laca del árbol japonés *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883). Ese descubrimiento hace a esta enzima una de las enzimas más antiguas. En 1896 se demostró en hongos (Bertrand, 1896) y posteriormente ha sido descrita en otros organismos.

Son enzimas comunes en la naturaleza y se encuentran ampliamente distribuidas en plantas y hongos así como en bacterias y en insectos (Minussi y col., 2007). Las lacasas de vegetales se encuentran en el xilema donde presumiblemente oxidan monolignoles en las primeras etapas de la lignificación (Gavnholt y Larssen, 2002) y también participan en la formación del polímero de la lignina mediante mecanismos

radicalarios. No obstante la distribución de estas enzimas en vegetales es mucho más limitada que en los hongos (Mayer y Staples, 2002; Moin y Omar, 2014).

Solo se han descrito unas pocas lacasas de origen procariota. La primera de ellas se detectó en la bacteria *Azospirillum lipoferum* (Givaudan y col., 1993) donde está implicada en la formación de la melanina. Se ha descubierto en *Marinomonas mediterránea* una lacasa atípica con seis sitios de unión al cobre de función desconocida (Sánchez-Amat y col., 2001). En las cubiertas de las esporas de *Bacillus subtilis* se ha descrito una lacasa (Enguita y col., 2003) que participa en la producción de pigmento en las endosporas. También se han descrito lacasas en especies del género *Streptomyces* (Arias y col., 2003), a pesar de todas estas descripciones, no parece que esta actividad sea un hecho común entre procariotas.

Sin embargo, son muchas las descripciones de lacasas en hongos, principalmente en ascomicetos y basidiomicetos habiéndose purificado a partir de muchas especies. Las lacasas son típicas de hongos basidiomicetos de la podredumbre de la madera y relacionados, como los hongos saprofitos descomponedores de restos vegetales del suelo, esto es, de especies que provocan la degradación de la lignina. Entre estos grupos casi todas las especies de WRF producen lacasa en mayor o menor proporción y esta enzima ha sido purificada de muchas especies (Hatakka, 2001). La mayoría de las lacasas caracterizadas derivan de WRF que son eficaces degradadores de la lignina, muchos contienen algunos genes codificadores pero sus papeles fisiológicos no son del todo comprendidos (Mander y col., 2006). *Agaricus bisporus* (Wood, 1980), *Botrytis cinerea* (Marbach y col., 1984), *Coprinus cinereus* (Schneider y col., 1999), *P. radiata* (Niku-Paavola y col., 1988), *P. ostreatus* (Sannia y col., 1986) y *Trametes versicolor* (Rogalski y col., 1991) son ejemplos de basidiomicetos que producen lacasas.

#### **I.4.1. Lacasas y sus funciones fisiológicas**

Como ya hemos comentado, las lacasas son un tipo de multicobre oxidasas azules (MCOs) ampliamente distribuidas en la naturaleza y muy estudiadas por su participación en la degradación de la lignina.

Sus funciones biológicas son diferentes según los organismos productores aunque todas catalizan reacciones de polimerización y despolimerización. En plantas, las lacasas están implicadas en la respuesta primaria a heridas (Davies y Ducros, 2001) y en la síntesis y polimerización de lignina (Bao y col., 1993). En insectos en la esclerotización y ensamblaje de las cutículas (Dittmer y col., 2004). En procariotas

se han relacionado con la morfogénesis (Sharma y col., 2007) (**Tabla 1**) en la biosíntesis de pigmentos de las esporas, en la protección que proporciona las cubiertas de las esporas a la radiación UV (Hullo y col., 2001).

**Tabla 1.** Posible función biológica de las principales oxidasas multicobre tipo lacasa descritas en procariotas (Modificado de Sharma y col., 2007).

Especie (gen)	Posible función	Referencia
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Pigmentación Oxidación de compuestos fenólicos	Givaudan y col., 1993
<i>Bacillus</i> sp. ( <i>mnxG</i> )	Esporulación, oxidación Mn <sup>2+</sup>	Van Waasbergen y col., 1996.
<i>Bacillus sphaericus</i>	Esporulación, pigmentación	Claus y Filip, 1997
<i>Bacillus subtilis</i> ( <i>cotA</i> )	Pigmentación de esporas Resistencia a UV y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hullo y col., 2001
<i>Bacillus licheniformes</i> ( <i>cotA</i> )	Pigmentación de esporas Resistencia a UV y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Koschorreck y col., 2008
<i>Bacillus pumilus</i> ( <i>cotA</i> )	Pigmentación de esporas Resistencia a UV y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reiss y col., 2011
<i>Marinomonas mediterranea</i> ( <i>ppoA</i> )	Pigmentación	Sánchez-Amat y Solano, 1997 Sánchez-Amat y col., 2001
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Síntesis de fenoxacinonas Pigmentación	Hsieh y Jones, 1995 Jones, 2000
<i>Streptomyces griseus</i> ( <i>epoA</i> )	Pigmentación Morfogénesis	Endo y col., 2003
<i>Xanthomonas campestris</i> ( <i>copA</i> )	Resistencia al Cu <sup>2+</sup>	Lee y col., 1994

La alta actividad lacasa en WRF sugiere que su principal función es la despolimerización de constituyentes de la pared celular de los vegetales como la lignina.

El papel de las lacasas en la degradación de la lignina es evidente porque:

- La mayoría de los WRF que degradan lignina también producen lacasa extracelularmente
- El polímero de lignina contiene grupo fenólicos que constituyen sustratos de las lacasas

- En la naturaleza la degradación de la lignina así como la catálisis de la lacasa es un proceso oxidativo

Este proceso de degradación también implica la participación sinérgica de algunas otras enzimas y componentes no enzimáticos, que ayudan a establecer un equilibrio entre la polimerización y despolimerización enzimática (Barbosa y col., 1996; Galliano y col., 1991). Además de la degradación de biopolímeros, las lacasas fúngicas llevan a cabo otras funciones fisiológicas como la producción de pigmentos (que suelen producirse frente a estrés medioambiental), la morfogénesis fúngica, detoxificación, esporulación y en la patogénesis (Thurston, 1994; Nagai y col., 2003). En hongos patógenos de plantas la producción de lacasa se relaciona con la detoxificación de componentes tóxicos generados por la planta como sistema de defensa (Mayer y Stapel, 2002). En el hongo patógeno humano *Cryptococcus neoformans*, las lacasas son expresadas como factores de virulencia, estas lacasas convierten catecolaminas del hospedador en melanina que protege a *C. neoformans*, por lo que este hongo provoca un mayor daño en el hospedador (Zhu y Williamson, 2004).

En hongos las lacasas intervienen en la degradación de la lignina junto con otras enzimas ligninolíticas (Leonowicz y col., 2001).

#### **I.4.2. Producción de lacasas: condiciones nutricionales y de cultivo**

La producción de lacasa por hongos está muy influenciada por muchos parámetros como tiempo de cultivo, cultivos sumergidos o estacionarios, concentraciones de compuestos orgánicos o inorgánicos, concentración de inductores (Palmieri y col., 2000), aireación (Dekker y Barbosa, 2001) y actuación de proteasas (Palmieri y col., 2001).

Las lacasas son producidas durante el metabolismo secundario de WRF en cultivos sumergidos o sustratos naturales (Scraddha y col., 2011). Las demandas fisiológicas varían entre los WRF y hay numerosos estudios sobre la influencia de la agitación, pH, temperatura, niveles de fuentes de carbono, nitrógeno y elementos traza.

##### **I.4.2.1. Influencia del pH en la producción de lacasa**

El pH del medio de cultivo de los hongos es crítico y juega un papel muy importante no solo sobre el crecimiento sino también sobre la producción de enzimas ligninolíticas. Aunque no hay mucha información disponible sobre la influencia de pH en la producción de lacasa, se ha comprobado que el cultivo de los hongos a pH 5.0 proporciona altos niveles de actividad lacasa. Así el pH óptimo para la producción de lacasa en muchos hongos está comprendido entre 5.0 y 6.0 (Minussi y col., 2007; Thiruchelvam y Ramsay, 2007; Papinutti y col., 2003).

#### **I.4.2.2. Influencia de la temperatura sobre la producción de lacasa**

La temperatura, como cualquier otro parámetro físico, juega un papel vital en el crecimiento y producción de lacasa. La temperatura óptima para la formación de cuerpos fructificantes y para la producción de lacasa es de 25° C en presencia de luz, y de 30° C cuando los cultivos son incubados en oscuridad (Thurston, 1994). En general los hongos presentan una mayor producción de lacasa a una temperatura de 25° C a 30° C (Minussi y col., 2007), disminuyendo a temperaturas superiores (Zadrazil y col., 1999).

#### **I.4.2.3. Influencia del carbono sobre la producción de la lacasa**

La degradación de compuestos de carbono proporciona energía que es utilizada por los organismos para su crecimiento y desarrollo. La fuente de carbono más fácilmente utilizada por los WRF es la glucosa (Levin, 2002). Entre las diversas fuentes de carbono utilizadas, el extracto de malta resultó ser la mejor para la producción de lacasas por algunos WRF (Da Cunha y col., 2003).

#### **I.4.2.4. Influencia de las fuentes de nitrógeno sobre la producción de lacasa**

Las lacasas de WRF son generalmente producidas durante la fase de metabolismo secundario, a menudo alcanzada por limitación en nitrógeno (Leathan y Kirk, 1983), aunque en algunas cepas de estos hongos se ha comprobado que las concentraciones de nitrógeno no tienen ningún efecto sobre esta actividad (Janusz y col., 2006), estas observaciones contradictorias fueron adscritas a diferencias entre cepas de *P. chrysosporium* y *Lentinus edodes* (Buswell y col., 1995). Estos autores encontraron que las lacasas fueron producidas a altas concentraciones de nitrógeno aun cuando se acepte que para la producción de lacasa se requiera una alta relación carbono/nitrógeno.

Por otro lado, Leathan y Kirk 1983, probaron diferentes fuentes de nitrógeno principalmente nitrato potásico, ácido glutámico, glicina, extracto de carne etc. y encontraron que el ácido glutámico a baja concentración proporcionó las mayores cantidades de lacasa.

#### **I.4.2.5. Influencia de compuestos aromáticos sobre la producción de lacasa**

Los compuestos aromáticos de bajo peso molecular, tienen una influencia muy significativa sobre el crecimiento y actividad de microorganismos lignocelulolíticos (Guota y col., 1981). Algunos de estos compuestos relacionados estructuralmente a la lignina como los ácidos ferúlico, verátrico y otros compuestos fenólicos, son producidos de forma natural por estos hongos durante la degradación del polímero. Estos compuestos aromáticos por tanto son añadidos de forma rutinaria a los medios de cultivo para incrementar la producción de la lacasa por estos hongos (Arora y Rampal, 2002). Se ha propuesto que una de las funciones de la lacasa es la polimerización de compuestos aromáticos producidos durante la degradación de la lignina (Thurston, 1994).

#### **I.4.2.6. Influencia del cobre sobre la producción de lacasa**

El cobre es un micronutriente indispensable para la mayoría de los organismos vivos (Arora y Rampal, 2002). La adición de bajas concentraciones de cobre a los medios de cultivo de WRF, estimula la producción de lacasa (Giardina y col., 1999). Palmieri y col., 2000, encontraron que la adición de 150  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre a los medios de cultivo provoca un aumento de 5 veces la actividad lacasa cuando se compara con el cultivo control.

#### **I.4.3. Inducción de la producción de lacasas**

Debido a su amplio rango de sustratos, las lacasas fúngicas tienen numerosas aplicaciones industriales (ver apartado aplicaciones biotecnológicas). Hay numerosos estudios sobre la regulación de la expresión de los genes de las lacasas con objeto de incrementar la productividad de las lacasas nativas y también para descubrir el papel fisiológico de las diferentes isoformas producidas por el mismo organismo. Como ya hemos comentado, la síntesis y secreción de lacasas están muy influenciadas por los niveles de nutrientes, etapa del desarrollo así como por la adición de una amplia variedad de inductores al medio de cultivo que varían entre las diferentes especies de hongos y las diferentes isoformas de una misma cepa.

La transcripción de genes de lacasas está con frecuencia regulada por iones metales (Collins y Dobson, 1997), varios compuestos aromáticos relacionados con la lignina o con derivados de la lignina (Terrón y col., 2004) y con los niveles de nutrientes (Collins y Dobson, 1997; Soden y Dobson, 2001).

#### **I.4.3.1. Inducción de la lacasa por metales**

La regulación de la expresión de la lacasa por metales está muy extendida en los hongos. Se ha demostrado la inducción por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . En todos los hongos analizados *T. versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispota*, *P. ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Coriolopsis rigida* y *Trametes pubescens*, la regulación de la producción de la lacasa por cobre ocurre a nivel de la transcripción (Collins y Dobson, 1997; Álvarez y col., 2009; Palmieri y col., 2000; Faraco y col., 2003; Soden y Dobson, 2001; Galhaup y col., 2002). Pero el efecto del cobre sobre la síntesis de la lacasa puede explicarse no solo a nivel transcripcional. Los resultados de Palmieri y col., 2001 demuestran que la concentración de cobre a 1mM disminuye la actividad proteolítica extracelular en muchos hongos por lo que impide la degradación de la proteína.

Los iones  $\text{Ag}^+$  y el  $\text{Mn}^{2+}$  también modula la transcripción de la lacasa (Soden y Dobson, 2001; Manubens y col., 2007). No obstante estos iones pueden tener efectos opuestos en diferentes especies. Así el  $\text{Mn}^{2+}$  actúa como inductor en *P. sajor-caju*, *Clitocybula dusenii* y *Nematoloma frowardii* pero inhibe la expresión de la lacasa en *C. subvermispota* (Scheel y col., 2000; Manubens y col., 2007).

#### **I.4.3.2. Inducción de la lacasa por compuestos aromáticos**

Los fenoles y compuestos aromáticos relacionados con la lignina son generalmente añadidos a los medios de cultivo para incrementar la producción de la lacasa (de Souza y col., 2004; Hou y col., 2004). La inducción de la lacasa por sustancias fenólicas puede representar un mecanismo defensivo desarrollado por el hongo frente a compuestos aromáticos tóxicos, ya que cataliza su polimerización. La lacasa juega un papel defensivo disminuyendo el estrés oxidativo provocado por radicales del oxígeno originados en la reacción de estas moléculas (Thurston, 1994). Existen numerosas descripciones de las respuestas en diferentes hongos a diferentes compuestos aromáticos (Fukushima y col., 1995; Chen y col., 2003). La inducción de la lacasa varía con el organismo y parece ser específica de ciertos compuestos aromáticos.

Esta inducción ocurre a nivel transcripcional y es diferente no solo entre los

diferentes hongos analizados sino también entre las diferentes isoenzimas del mismo organismo (Collins y Dobson, 1997; Terrón y col., 2004; Xiao y col., 2006).

#### **I.4.3.3. Inducción de la lacasa por interacciones biológicas**

Las lacasas son importantes en la virulencia de muchos hongos patógenos o como mecanismo de defensa para hongos ligninolíticos (Missall y col., 2005). Muchos autores sugieren que la lacasa juega un papel importante como mecanismo de defensa de los basidiomicetos frente a microparásitos. Se ha examinado la inducción y producción de lacasa en cultivos de *L. edodes*, *T. versicolor* y *P. ostreatus* infectados con especies de *Trichoderma* (Savoie y col., 1998) El interés en el estudio de este tipo de respuesta deriva del hecho de que las cepas de *Trichoderma* son parásitos muy agresivos de hongos de interés en la industria alimentaria como *Agaricus*, *Pleurotus* y *Lentinula* lo que conduce a grandes pérdidas económicas.

Baldrian, 2006 con 18 cepas de hongos ligninolíticos en cultivos en estado sólido, describió el incremento de la producción de lacasa en respuesta a la infección con una cepa de *Trichoderma harzianum*, Flores y col., 2009 estudiaron la producción y el perfil de isoformas de lacasa de *A. bisporus* y *P. ostreatus* en respuesta a la infección con especies de *Trichoderma*. Los resultados mostraron que la infección con *Trichoderma*, hongo no productor de lacasa, incrementó la producción de lacasa en ambos hongos tanto en cultivos en fase sólida como en cultivos sumergidos en fermentadores.

#### **I.4.4. Propiedades fisicoquímicas de las lacasas**

Las lacasas fúngicas generalmente son glicoproteínas extracelulares monoméricas con una masa molecular de entre 40 y 130 kDa. Como la mayoría de las proteínas extracelulares fúngicas, las lacasas son glicoproteínas. Sus contenidos en carbohidratos unidos covalentemente pueden oscilar entre un 10 a un 25%, este residuo glucídico suele consistir en manosa, N-acetilglucosamina y galactosa y puede contribuir a la alta estabilidad del enzima (Claus, 2004). No obstante en contenido glucídico de estas proteínas varía tanto en cantidad como en composición en función del medio de cultivo (Pickard y Hashimoto, 1988) por lo que los datos son muy heterogéneos (Morozova y col., 2007).

Los puntos isoeléctricos son ácidos entre 2.6-6.0 con un promedio de alrededor de 4.0 y el pH óptimo depende del sustrato utilizado para valorar la actividad. Generalmente las lacasas fúngicas muestran un pH óptimo de entre 3.0-5.0 (Chang

y col., 2009).

En general son proteínas muy estables, con rango de temperatura entre 30 y 70° C (Morozova y col., 2007) y óptimo de alrededor de 50° C (Chang y col., 2009) y presentan actividad en un amplio rango de pH de entre 2.0 y 8.5 (Thurston, 1994).

La mayoría de las lacasas fúngicas, especialmente las de hongos de la podredumbre blanca de la madera son producidas y detectadas tanto intra como extracelularmente (Susla y col., 2007; Wong, 2009).

Las lacasas se caracterizan por tener varios átomos de cobre en su estructura, en estado de oxidación  $\text{Cu}^{2+}$ . Estos átomos de cobre se agrupan en tres tipos de centros de cobre: tipo 1, tipo 2 y tipo 3 con diferentes propiedades (Yaroporov y col. 1994).

- **Tipo 1 (T1)** el cobre azul, tiene un máximo de absorción entre 600-610 nm y proporciona color azul a estas proteínas. Este máximo es provocado por la unión covalente entre el cobre y la cisteína. Este cobre está coordinado con dos histidinas, una cisteína y un cuarto residuo que pueden ser leucina o fenilalanina (Claus , 2004)
- **Tipo 2 (T2):** absorbe ligeramente en la región del visible y se encuentra muy cerca del cobre T3 coordinado con dos histidinas y una molécula de agua.
- **Tipo 3 (T3):** Es un centro de cobre binuclear formado por un par de iones  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{Cu}^{2+}$  con una banda de absorción a 330 nm. Está coordinado por 6 histidinas y un puente hidroxilo (Claus, 2004; Witayakran y Ragauskas, 2009).

En la naturaleza es posible encontrar lacasas no azules (Palmieri y col., 2000), se denominan lacasas blancas se ha caracterizado estructuralmente y muestran la presencia de un átomo de cobre, otro de hierro y dos átomos de zinc por molécula.

Los estudios de secuenciación génica y del ADNc han puesto de manifiesto que la mayoría de las lacasas fúngicas muestran secuencias que suelen codificar para 520-550 aminoácidos incluido el péptido de secreción y que tienen muy conservadas las secuencias de unión al cobre (Thurston, 1994).

#### **I.4.5. Mecanismo catalítico de las lacasas**

A pesar de la intensa investigación llevada a cabo, el mecanismo catalítico de las lacasas todavía no está completamente definido.

Los electrones separados de los sustratos, se transfieren secuencialmente al cobre T1 y luego al centro T2/T3 presentes en el centro activo del enzima (**Figura 6**), finaliza con una molécula de oxígeno que se reduce a una molécula de agua (Solomon y col., 1996). La eficacia en la oxidación de sustratos depende de la diferencia de potenciales entre el cobre T1 del enzima y el potencial del sustrato. Un factor muy importante que juega un papel muy significativo en la catálisis enzimática es el pH del medio de la reacción, que afecta, no solo a la actividad catalítica del enzima sino también la potencial redox de los sustratos. Los sustratos de las lacasas pueden dividirse en dos grupos básicos, los donadores de electrones y protones (compuestos orgánicos) y los donadores de electrones (compuestos orgánicos y no orgánicos) (Solomon y col., 1996; Lindley, 2001; Claus, 2004). Los fenoles son los sustratos típicos porque sus potenciales redox (de 0.5 a 1.0 V son lo suficientemente bajos como para permitir su transferencia al cobre T1. Las lacasas son capaces de oxidar ciertos fenoles con valores de potenciales mayores mediante la participación de mediadores (**apartado 1.4.8.**)

22

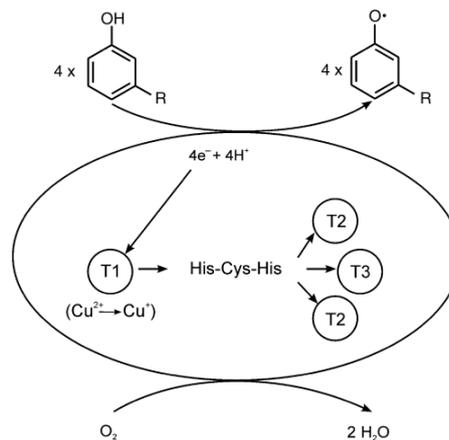
La oxidación de sustratos por las lacasas implica los siguientes pasos:

- Unión del sustrato reductor al cobre T1, transferencia del electrón desde el sustrato al cobre T1 y formación de un radical del sustrato que se conecta con la reducción del cobre T1.
- Transferencia electrónica desde el cobre T1 al complejo trinuclear T2/T3
- Unión del oxígeno al centro del cobre T2/T3, transferencia de electrones desde los átomos de cobre T2/T3 al oxígeno y su reducción a agua.

La explicación sería la siguiente (**Figura 6**): la oxidación del sustrato reductor genera un radical libre tras la transferencia de un electrón al Cu T1, que se encuentra totalmente oxidado ( $\text{Cu}^{2+}$ ), el producto de oxidación inicial es típicamente inestable y es susceptible de una segunda oxidación. Como la oxidación del sustrato mediante la pérdida de un electrón está acoplada con la reducción del oxígeno molecular por cuatro electrones, la lacasa debe operar como una batería, almacenando los electrones de las oxidaciones individuales para reducir el  $\text{O}_2$  (Thurston, 1994). Por ello, para la completa reducción de una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua (**Figura 6**) se requiere la oxidación consecutiva de 4

moléculas de sustratos reductores. Cada electrón extraído de las cuatro oxidaciones monoeléctricas en el sitio T1 es transferido intramolecularmente, al agrupamiento trinuclear T2/T3 a través del tripéptido His-Cys-His altamente conservado en las oxidasas azules, donde se une el O<sub>2</sub> y se producen 2 moléculas de agua (Mc Guirl y Dooley, 1999; Baldrian, 2006).

El primer paso de reducción del centro T1 por el sustrato constituye el paso limitante en el ciclo global de óxido reducción de las lacasas (Xu, 1996; Solomon y col., 1996).



**Figura 6.** Ciclo catalítico de la lacasa tomado de Baldrian, 2006.

La determinación de la estructura cristalográfica es una herramienta esencial para los estudios de relación estructura-función de las enzimas: hasta la fecha solo existen publicadas la estructura cristalina de cinco lacasas fúngicas: una lacasa inactiva del basidiomiceto *Coprinus cinereus* (Ducros y col., 1998), del ascomiceto *Melanocarpus albomyces* (Hakulinen y col., 2002), dos de los basidiomicetos *T. versicolor* (Pionteck y col., 2002) y *Rigidosporus lignosun* (Garavaglia y col., 2004) y otra bacteriana Cot A de la endospora de *B. subtilis* (Enguita y col., 2003).

En base a estas estructuras se han comprobado por mutagénesis dirigida que ciertos residuos cercanos a los iones cobre catalíticos están implicados en la actividad y el potencial redox de estas lacasas fúngicas (Xu y col., 1998), en consecuencia se dispone de una colección de mutantes con alteraciones estructurales en el centro del cobre T1.

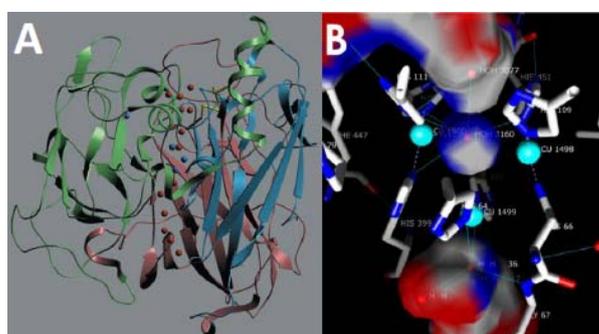
El alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de lacasas y la resolución de su estructura, ha permitido identificar características conservadas en todas ellas en

cuanto a estructura terciaria de los sitios redox y coordinación de los iones cobre (Kumar y col., 2003, Valderrama y col., 2003 Claus, 2004).

El plegamiento estructural de las lacasas está configurado en tres dominios de tipo cupredoxina con arquitectura tipo barril- $\beta$ , estabilizados por varios puentes disulfuro.

Generalmente, los sitios de unión del cobre T1 se encuentran dentro de un dominio; en la lacasa de *T. versicolor* en el dominio D3, un bolsillo hidrofóbico que contiene el sitio del cobre T1 y en sus proximidades el sustrato reductor se une a una pequeña cavidad cargada negativamente, que podría estabilizar el radical catiónico que se produce durante su oxidación (Piontek y col., 2002) (**Figura 7**).

El cluster trinuclear T2/T3 está embebido entre los dominios D1 y D3 y el dominio D2; contiene residuos implicados en la unión al sustrato. El sitio de reducción del oxígeno en el agrupamiento T2/T3 tiene acceso al solvente por dos canales, uno ancho que accede al sitio T3 y otro estrecho que conduce al cobre T2. Estos canales facilitan la entrada del oxígeno molecular y la liberación de las moléculas de agua (Ducros y col., 1998; Piontek y col., 2002; Hakulinen y col., 2002; Enguita y col., 2003).



**Figura 7. A)** Estructura tridimensional de la lacasa de *T. versicolor* mostrando los canales de entrada de oxígeno y salida de agua (esferas de color rojo) (tomado de Piontek y col., 2002). **B)** Representación del centro T2/T3 de la lacasa de *Trametes trogii* mostrando la superficie del canal de oxígeno (en la parte superior) y del canal de agua (en la parte inferior) (tomado de Matera y col., 2008).

#### **I.4.6. Actividad catalítica de las lacasas**

Las lacasas oxidan sustratos fenólicos,  $Mn^{2+}$  (en presencia de quelatos) y un amplio número de compuestos xenobióticos (Solomon y col., 1996). El mecanismo catalítico como ya se ha descrito anteriormente en complejo y aun no completamente aclarado (Andrzej y col., 2001). No obstante se sabe que para la actividad catalítica se requieren los cuatro átomos de cobre de la proteína y que durante el ciclo catalítico, el cobre tipo 1 debe ser oxidado y reducido cuatro veces (Claus, 2004). Por otro lado, las características particulares de estas enzimas como el potencial redox de los átomos de cobre, la estructura del centro activo u otras, pueden influir en el rango de sustratos. No obstante por definición son multicobre oxidasas capaces de oxidar polifenoles, fenoles metoxilados, diaminas aromáticas y otros compuestos aromáticos pero incapaz de oxidar la tirosina (Enguita, 2011)

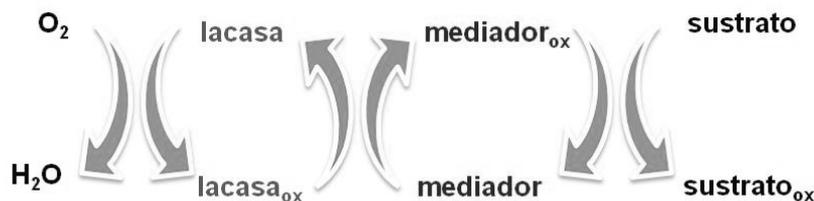
#### **I.4.7. Potenciales de reducción de las lacasas**

En función de los potenciales de reducción, las lacasas se han clasificado en lacasas de bajo y alto potencial (Xu y col., 1998). A partir de estudios voltimétricos, parece que el potencial de reducción del oxígeno a agua se relaciona con un alto potencial de reducción del cobre T1 (Kamitaka, y col. 2007). Las lacasas fúngicas tienen mayores potenciales de reducción para los átomos de cobre que las de otros organismos. Aunque es el potencial del cobre T1 el que parece relacionarse con el potencial catalítico del enzima, el potencial de reducción del centro trinuclear del cobre está menos relacionado, así a diferencia del cobre T1, los cobre T2 y T3 reaccionan específicamente e internamente con el oxígeno, lo que produce estados intermediarios altamente reactivos muy oxidantes y probablemente sufran transferencias de electrones intramoleculares espontáneas (Christopher y col., 2009).

#### **I.4.8. Sistema lacasa-mediador**

El potencial máximo de las lacasas fúngicas descrito (0.8V) es inferior a las peroxidasas ligninolíticas (mayor de 1V), por lo que no pueden oxidar compuestos aromáticos de bajo  $E^{\circ}$  como son las unidades no fenólicas de la lignina (Kawai y col., 1989). Sin embargo, el potencial de oxidación de estas enzimas puede ser ampliado mediante el uso de moléculas pequeñas conocidas como mediadores que tienen la capacidad de cambiar el potencial redox durante la oxidación desde 0.78 V a 1.084 V (Zille y col., 2004). El mecanismo catalítico implica la oxidación del mediador que puede difundir lejos del enzima, oxidar al sustrato y volver al ciclo

catalítico como una especie reducida (Wells y col., 2006; Riva, 2006) es lo que se conoce como sistema lacasa-mediador (**Figura 8**).



**Figura 8.** Representación esquemática del ciclo de oxidación-reducción de sustratos catalizado por el sistema lacasa-mediador.

Los mediadores pueden oxidar el sustrato por diferentes mecanismos; los que contienen grupos N-OH oxidan el sustrato a través de la transferencia de átomo de hidrógeno, mientras que otros como el ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) lo hacen por transferencia de electrones (Calcaterra y col., 2008).

El primer mediador utilizado en la oxidación del alcohol veratrílico y dímeros de lignina no fenólicos fue el ABTS (Bourbonnais y Paice, 1990). Hoy se dispone de muy diversos mediadores sintéticos como el 1-hidroxibenzotriazol, la N-hidroxiftalimida, el ácido violúrico o la N-hidrociacetanilida (Kawai y col., 1989; Bourbonnais y col., 1997; Xu y col., 2000).

Actualmente la investigación se dirige hacia la búsqueda de mediadores naturales que no presentan los inconvenientes de los sintéticos, no son tóxicos, son más estables, de bajo coste y compatibles con el medioambiente; entre estos cabe destacar el ácido 3-hidroxiantranílico (Eggert y col., 1996), el ácido 4-hidroxibenzoico, y el 4-hidroxibenzol (Johannes y Majcherczyk, 2000), también compuestos fenólicos de origen natural producidos durante la degradación de la lignina como la acetosiringona, siringaldehído o vainillina (Camarero y col., 2005).

#### **1.4.9. Caracterización molecular de las lacasas**

La actividad lacasa en los basidiomicetos en general está codificada por varios genes (Jönsson y col., 1995; Saloheimo y col., 1991).

Para el aislamiento de genes de las lacasas, se ha trabajado con el ADNc pues es fácil amplificar la primera cadena de ADNc utilizando primers degenerados diseñados de secuencias conservadas de los dominios de unión al cobre. El ADNc parcial

puede ser fácilmente extendido a su longitud completa utilizando técnicas de amplificación de extremos de ADNc (RACE) (Chen y col., 2004). También se ha utilizado el ADNc para estudios de expresión de esta enzima (Kim y col., 2008). Para estudiar las familias y número de genes es útil la construcción de una librería de ADN genómico. La gran conservación de secuencias de lacasas se ha utilizado para el diseño de primers, hibridación y el rastreo de uno o más genes de lacasas de una gran variedad de organismos.

#### **I.4.10. Familia de genes de lacasas**

Las lacasas generalmente se secretan como múltiples isoenzimas (Susla y col., 2007). Esta diversidad de isoenzimas se atribuyó a modificaciones postranscripcionales del mismo producto del gen, pero la caracterización de algunas familias de genes de lacasas sugirió que al menos parte de esta diversidad bioquímica podría ser debido a la multiplicidad de genes en el genoma fúngico (Ong y col., 1997).

En muchos hongos se ha descrito la expresión diferencial de los genes de lacasas (Palmieri y col., 2000). Se puede concluir que los hongos son capaces de producir diversas lacasas y la proporción de los enzimas producidos, depende de la composición y condiciones de cultivo empleadas (Moldes y col., 2004).

Probablemente la familia de genes produce proteínas muy relacionadas que son solo sutilmente diferentes en sus actividades lo que permite la transformación de un mayor número de sustratos o que muestren diferencias en regulación (Mansur y col., 1997). Además hasta que no se detecten todos los transcritos de todos los genes de lacasas, no puede descartarse la posibilidad de que algunos genes no se transcriban o que su expresión esté condicionada a diferentes condiciones fisiológicas.

#### **I.4.11. Expresión heteróloga de las lacasas**

La producción de lacasas de fuentes naturales no puede satisfacer las demandas del mercado por su bajo rendimiento lo que es incompatible con los procesos industriales. La expresión de proteínas recombinantes en hospedadores de fácil manejo puede permitir una alta productividad en tiempos más cortos y así reducir los costes de producción (Ferrer-Miralles y col., 2009).

A partir de los años 90 del siglo pasado, la expresión de lacasas ha sido un campo de investigación y materia de debate por muchos investigadores. Se han descrito numerosos trabajos sobre la expresión heteróloga de lacasas en bacterias, levaduras, hongos filamentosos y plantas así como hay ejemplos de expresión homóloga (Alves y col., 2004; Kajita y col., 2004; Waterman y col., 2007; Mander y col., 2006; Kataoka y col., 2007).

Desafortunadamente aún no se ha conseguido la expresión funcional de lacasas fúngicas en bacterias (*Escherichia coli*) esto quizás se deba al requerimiento de glicosilación, carencia de chaperonas y distinto uso de codones entre otras razones.

Los sistemas de expresión de lacasa basados en levaduras presentan problemas de secreción de la proteína heteróloga ya que posiblemente las levaduras carecen de un sistema enzimático adecuado que lleve a cabo las correctas modificaciones post-traduccionales para la secreción (Arana, 2002). Los hongos filamentosos tienen varias ventajas respecto a otros sistemas de expresión como son las de realizar modificaciones post-traduccionales apropiadas, por lo que han sido explotados para la producción comercial de proteínas recombinantes (van Hartingsveldt y col., 1987; Sims y col., 2005). Estos hongos tienen una gran capacidad para producir grandes cantidades de proteínas secretadas. *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* se han usado durante mucho tiempo en alimentación, por lo que muchas especies de este género son muy seguras. Sin embargo, la producción de proteínas heterólogas es a menudo limitada. Para mejorar la producción de proteínas heterólogas. Muchos trabajos han presentado métodos para solucionar este problema, como el sistema de fusión génica o el método de cultivo en estado sólido (Iwashita, 2002). Comparado con levaduras, la ruta de secreción, que es la clave de la producción de proteínas extracelulares, está muy poco caracterizada en hongos filamentosos.

En la **Tabla 2** se recogen numerosas lacasas expresadas heterológicamente

**Tabla 2.** Lacasas expresadas heterológicamente.

Lacasa	Fuente	Hospedador	Referencia
PO1	<i>Coriolus hirsutus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kojima y col., 1990
PO2	<i>Coriolus hirsutus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kojima y col., 1990
PrL	<i>Phlebia radiata</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Saloheimo y Niku-Paavola, 1991
LCC1, LCC4	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Wahleithner y col., 1996

LCC2			
LCC1	<i>Trametes villosa</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Yaver y col., 1996
MtL	<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Berka y col., 1997 Bulter y col., 2003
LCC1	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Jönsson y col., 1997
LCC1	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cassland y Jönsson, 1999
LCC2	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cassland y Jönsson, 1999
LCC1	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Gelo-Pujic y col., 1999
LCCIV	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Brown y col., 2002
LCC1	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Zea mays L</i>	Hood y col., 2003
LCC1	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pichia methalonica</i>	Guo y col., 2006
LACIIIb	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Jolivalt y col., 2005
LCCa	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Necochea y col., 2005
LCC 1, LCC2	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pichia pastoris</i> , <i>Aspergillus niger</i>	Bolhin y col., 2006
Gene IV	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Téllez-Jurado y col., 2006
LAC	<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Aspergillus sojae</i>	Hatamoto y col., 1999
LCC 1	<i>Coprinus cinereus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Yaver y col., 1999
LCC 1	<i>Coprinus cinerea</i>	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Kilaru y col., 2006
LtLACC 2	<i>Liriodendron tulpifera</i>	<i>Tobacco cell</i>	LaFayette y col., 1999
LAC 1	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Otterbein y col., 2000
LAC 1	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Record y col., 2002
LAC 1	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Sigoillot y col., 2004
LAC 1	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Alves y col., 2004
LAC 1	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Madzak y col., 2005
LAC 2	<i>Lobolly pine</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sato y col., 2001

PPOA	<i>Marinomonas mediterranea</i>	<i>Escherichia coli</i>	Sanchez-Amat y col., 2001
LAC 4	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Soden y col., 2002
PPO	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Li y Steffens, 2002
LAC 1	<i>Melanocarpus albomyces</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	Kiiskinen y col., 2004
LAC 1	<i>Melanocarpus albomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kiiskinen y col., 2004
LAC 3	<i>Trametes sp. cepa C30</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Klonowska y col., 2005
POX A1b, POX C	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Kluveromyces lactis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Piscitelli y col., 2005
LCC 1	<i>Pycnoporus coccineus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hosshida y col., 2005
LCC 1	<i>Coprinopsis cinerea</i>	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Kilaru y col., 2006
LCC	<i>Trametes trogii</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Colao y col., 2006
LCC 1	<i>Trametes trogii</i>	<i>Kluveromyces lactis</i>	Camattari y col., 2007
LAC B	<i>Trametes sp.</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Li y col., 2007
LAC D	<i>Trametes sp. 420</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Hong y col., 2007
Ery3	<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Rodriguez y col., 2008
Pel3	<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bleve y col., 2008
LCC	<i>Fomes lignosus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Hu y col., 2007

Así las lacasas como otras enzimas oxidativas son difíciles de expresar en sistemas no fúngicos, por ello son numerosos los sistemas heterólogos de expresión de lacasas en hongos filamentosos como se recoge en la **Tabla 2**. Como puede observarse hay una destacable excepción con la expresión homóloga en la que el hongo basidiomiceto *P. cinnabarinus* fue utilizado como hospedador para expresar la lacasa activa de este hongo (Alves y col., 2004).

Los problemas asociados a la expresión heteróloga de enzimas fúngicas incluyen el incorrecto doblamiento y el ineficiente uso de codones de los organismos de expresión, lo que provoca un bajo rendimiento de la proteína o una enzima no funcional. También la sustitución incorrecta de residuos de carbohidratos durante la glicosilación de las proteínas puede provocar un problema adicional en la expresión heteróloga. Estos problemas están siendo superados mediante la utilización de

organismos vectores de expresión más avanzados cuyo uso de codones son más adecuados para la expresión correcta de estas proteínas.

La producción heteróloga de lacasas a menudo se incrementa por variación de las condiciones de cultivo. Así la adición de cobre al medio de cultivo es un factor importante para la producción heteróloga de lacasa en *Pichia pastoris* y *Aspergillus* sp. (Liu y col., 2003; Cassland y Jönsson, 1999). Al contrario de lo que ocurre con la producción homóloga de lacasa en la que la adición de cobre a menudo afecta la expresión génica. El aumento en la producción de lacasa por adición de cobre está probablemente relacionado con un apropiado doblamiento de la lacasa activa en la producción heteróloga (Uldschmid y col., 2003).

La capacidad de producir lacasas en sistemas heterólogos de manera eficiente también depende de los cambios que se hagan en la secuencia original del ADN. Por ejemplo, se ha obtenido un incremento en la secreción de lacasas recombinantes reemplazando el péptido señal nativo por secuencias señales presentes en proteínas con alto grado de secreción por el hospedador (Salony y col., 2008). También puede utilizarse la ingeniería de proteínas para incrementar la estabilidad, actividad y/o especificidad de un enzima. Se han obtenido proteínas de alta calidad a través de recombinación, mutagénesis dirigida o al azar donde un simple cambio en la secuencia de aminoácidos proporciona una mejora en las propiedades bioquímicas (pH óptimo, termoestabilidad, especificidad de sustrato) y parámetros catalíticos ( $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $K_{cat}$ ).

---

31

Hoy como resultado del gran avance en biología molecular y tecnología de ADN recombinante es posible explorar nuevas estrategias dirigidas a la producción de lacasas a nivel industrial. A partir de genes sintéticos que codifique lacasas, modificar secuencias específicas de nucleótidos para mejorar la expresión de la enzima o incluso para conseguir nuevas características que representen ventajas para ciertos procesos industriales.

#### **I.4.12. Regulación de las lacasas**

Los diferentes genes de lacasas de un hongo generalmente son regulados diferencialmente y los patrones de regulación difieren substancialmente entre las especies de hongos productores (Wahleithmer y col., 1995; Yaver y Golightly 1996; Yaver y col., 1996; Smith y col., 1998; Palmieri y col., 2000; Soden y Dobson, 2001). Los transcritos de la lacasa de *P. radiata* se producen rápidamente bajo limitación en nitrógeno (Saloheimo y Niku-Paavola, 1991). En *T. villosa*, el gen *lcc1*

es fuertemente inducido por 2,5-xilidina pero no el gen *lcc2*. Por el contrario, experimentos de Northern blots no detectaron transcritos *lcc3*, *lcc4*, y *lcc5* en todas las condiciones (Yaver y Golightly, 1996; Yaver y col., 1996). Tres lacasas de *R. solani* (*lcc1*, *lcc2*, *lcc3*) son transcritas a bajos niveles constitutivos y pueden ser reprimidas en cultivos adicionados de p-anisidina. Sin embargo la expresión de *lcc4* de *R. solani* es inducible por p-anisidina. En *R. solani*, los genes *lcc1*, *lcc2*, *lcc3* están agrupados y separados del gen *lcc4*, lo que sugiere una relación entre la organización genómica y la regulación transcripcional (Wahleithmer y col., 1995). También se ha establecido una regulación transcripcional de las lacasas inducibles por cobre y por otros metales (Karahanian y col., 1998; Palmieri y col., 2000; Soden y Dobson, 2001; Galhaup y col., 2002).

Muchos estudios se han dirigido hacia la regulación de la expresión de lacasas por metales. El cobre en particular influye a nivel de la transcripción en *T. versicolor* (Collins y Dobson, 1997), *C. subvermispora* (Álvarez y col., 2009), *P. ostreatus* (Palmieri y col., 2000), *P. sajor-caju* (Soden y Dobson, 2001) y *T. pubescens* (Galhaup y col., 2002). Se han detectado posibles elementos de respuesta a metales en regiones del promotor de muchas lacasas (Giardina y col., 2009).

32

Las diferencias en la respuesta transcripcional al cobre que ocurren en los genes de las lacasas en diferentes especies o dentro del mismo género sugiere que ciertos isoenzimas de lacasas deben ejercer un papel protector frente al estrés oxidativo inducido por metales. Esta protección podría ser ejercida por quelación de iones de cobre a través de la síntesis del pigmento protector de melanina (Eisenman y col., 2007). De la misma forma los diferentes perfiles de expresión observados en los genes de lacasas en respuesta a compuestos aromáticos podría indicar que algunos isoenzimas estén especializados en hacer frente al estrés oxidativo provocado por los radicales de oxígeno originados de estas moléculas (Thurston, 1994).

También se ha propuesto un cierto grado de especialización para los genes de las lacasas de *C. rigida* (Saparrat y col., 2010). En este caso se cree las distintas capacidades de las isoenzima de lacasa de este hongo pueden estar relacionadas con las distintas regulaciones en función del estado de crecimiento o en respuesta a inductores, de modo que las lacasas con altos potenciales redox son reguladas positivamente cuando el nivel de sustrato es abundante, mientras que ocurre una inducción muy específica de lacasas con bajo potencial redox cuando la concentración de sustrato es baja (Saparrat y col., 2010).

Hasta la fecha, aunque se ha mostrado una considerable atención sobre la mejora y la regulación de la producción de lacasa, la mayoría de los estudios en este campo se han focalizado en la búsqueda de nuevas cepas con alto rendimiento de producción, identificación de lacasas o de sus genes (Bose y col., 2007; Myasoedova y col., 2009; Elisashvili y col., 2009; Eugenio y col., 2010). Aun se desconoce el mecanismo molecular de regulación de la producción de las lacasas fúngicas.

#### **I.4.13. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas**

Las lacasas pueden oxidar/polimerizar/romper una amplia variedad de compuestos biológicos o sintéticos fenólico y no fenólicos. Estos sistemas enzimáticos ofrecen ventajas a los tratamientos físicos y químicos ya que son biodegradables y específicos.

Aunque son enzimas con una alta variedad de utilidades biotecnológicas, el requerimiento de modificaciones post-traduccionales para la actividad enzimática en algunas lacasas fúngicas, ha impedido su amplia utilización en aplicaciones biotecnológicas (Sigoillot y col., 2004).

Las reacciones que producen estas enzimas pueden ser utilizadas en procesos industriales como en las industrias textil, de alimentos, de obtención de papel y farmacéutica (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Preparaciones comerciales de lacasas disponibles para uso industrial (tomado de Osma y col., 2010).

	<b>Aplicación</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Empresa</b>
<b>Industria alimentaria</b>	Elaboración de cerveza	Flavoustar	Advanced Enzyme Technologies Ltd. (India)
	Mejora del color (té)	Laccase Y20	Amano Enzyme USA Co. Ltd.
<b>Industria papelera</b>	Bioblanqueo	Lignozym-process	Lignozym GmbH (Germany)
	Deslignificación de pasta de papel	Novozym 51003	Novozymes (Denmark)
<b>Industria textil</b>	Desgastado tela	Bleach Cut 3-S	Season Chemicals

	vaquera	(China)
Tratamiento tela vaquera	Cololacc BB	Colotex Biotechnology Co. Ltd. (Hong Kong)
Desgastado tela vaquera	DeniLite	Novozymes (Denmark)
Tratamiento tela vaquera	Ecostone LC10	AB Enzymes GmbH
Tratamiento tela vaquera	IndiStar	(Germany)
Tratamiento tela vaquera	Novoprime Base 268	Inc. (Rochester, USA)
Desgastado tela vaquera	Primagreen Ecofade LT100	Genencor Inc. (Rochester, USA)
Desgastado tela vaquera	ZyLite	Zytext Pvt. Ltd. (India)

#### **I.4.13.1. Papel de las lacasas en bioremediación**

34

Uno de los principales problemas medioambiental es la contaminación del agua, suelo y aire por compuestos tóxicos. Ciertos compuestos como hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), pentaclorofenoles (PCP), bifenoles policlorados (PCB) 1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano (DDT), benceno, tolueno y xileno (BTEX) así como trinitrotolueno (TNT) son compuestos muy persistentes en el medio ambiente y tienen efectos mutagénicos y/o carcinogénicos (Bollag y col., 2003). La capacidad de los hongos de transformar una gran variedad de estas sustancia químicas ha incrementado el interés en su utilización en bioremediación. Hoy el tratamiento enzimático es una alternativa para la eliminación de xenobióticos del medioambiente (Marbach y col., 1985).

##### **I.4.13.1.1. Degradación de xenobióticos por lacasas**

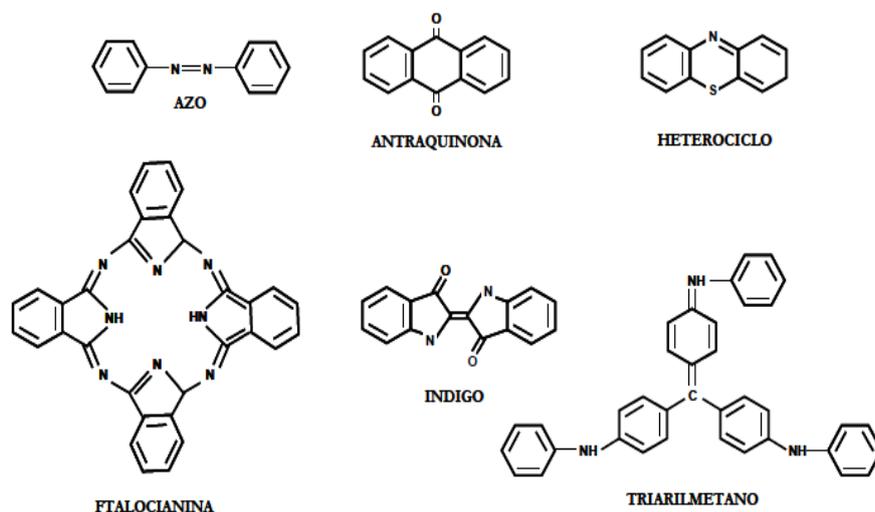
Debido a su amplio espectro de sustrato, las lacasas pueden oxidar una gran variedad de compuestos xenobióticos (Torres y col., 2003; Johannes y Majchercyk, 2000; Bezalel y col., 1996). Los experimentos de laboratorio han puesto de manifiesto la aplicación de lacasas para la eliminación de fenoles y compuestos aromáticos del agua y el mecanismo de eliminación implica la oxidación enzimática del tóxico a radicales libres o a quinonas que sufren polimerización o parcial precipitación (Niku-Paavola y Viikari, 2000; Enguita, 2011).

En el suelo, las lacasas además de oxidar el sustrato pueden también inmovilizar contaminantes por acoplamiento a sustancias húmicas un proceso análogo a la síntesis de ácidos húmicos en el suelo (Ahn y col., 2002). Los xenobióticos que pueden ser inmovilizados por este mecanismo son compuestos fenólicos como clorofenoles y anilinas o fenoles clorados. La inmovilización disminuye la disponibilidad biológica de los xenobióticos y por tanto su toxicidad (Gelo-Pujic y col., 1999).

Los cultivos de *T. versicolor* inducidos para la producción de lacasa, y la enzima purificada con ABTS oxidan el benzo-[ $\alpha$ ]-pireno (Collins y col., 1996), también las lacasas de especies de *Pleurotus*, degradaron contaminantes aromáticos y la oxidación se incrementó en presencia de mediadores (Rodríguez y col., 2004).

#### I.4.13.1.2. Papel de las lacasas en la decoloración de colorantes textiles

Los reactivos químicos utilizados en la industria textil son muy diversos en composición desde compuestos inorgánicos a orgánicos y polímeros (Zollinger, 2002). Por su estructura química, los colorantes son resistentes a la decoloración, a la exposición a la luz, agua y diferentes químicos y la mayoría de ellos son difíciles de decolorar por su origen sintético. La mayoría de los procesos de tratamiento de las aguas residuales de esta industria son ineficaces y muy caros. El desarrollo de procesos basados en las lacasas parece una solución atractiva por su potencial en la degradación de colorantes de diversa estructura química (Rodríguez-Couto y col., 2005) incluyendo a colorantes sintéticos muy empleados industrialmente (Setti y col., 1999) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Estructuras químicas más comunes de los colorantes textiles.

La utilización de lacasas en la industria textil está creciendo muy rápidamente, además de su utilización en la decoloración de efluentes (Fernández y col., 2009) se están utilizando lacasas en la síntesis de colorantes (Polak y Jarosz-Wilkolazka, 2012).

#### **I.4.13.1.3. Papel de las lacasas en el tratamiento de efluentes**

Muchos contaminantes xenobióticos aromáticos son generados en las industrias del papel, petroquímica, destilerías y textil y son responsables del color y toxicidad de sus efluentes. Los hongos de la podredumbre blanca de la madera producen enzimas que son muy eficaces en la detoxificación y decoloración de estos efluentes (Rubilar y col., 2008). Los métodos de tratamiento convencionales como lagunas aireadas y plantas de lodos activados son ineficaces en la eliminación del color de estos efluentes.

Las lacasas fúngicas pueden utilizarse en el tratamiento de efluentes de la industria papelera y de las industrias de productos agrícolas como la industria del aceite de oliva (Bajpai, 1999; D'Annibale y col., 2000). También se ha utilizado con éxito el sistema lacasa-mediador para el tratamiento de efluentes de la industria del papel y en la detoxificación de residuos de la industria del aceite de oliva y sus efluentes (Minussi y col., 2007; Sampedro y col., 2007).

En la detoxificación de efluentes, se han propuesto procesos que se basan en la decoloración y detoxificación en continuo del efluente con hongos productores de lacasa inmovilizados (Archibald y col., 1990).

#### **I.4.13.2. Papel de las lacasas en la industria del papel**

La liberación de las fibras de la celulosa de la lignina es un paso importante en el procesamiento de la madera para la fabricación de la pasta de papel. Los métodos tradicionales para ello implican a oxidantes químicos con cloro, sulfito u oxígeno que imponen la liberación de productos clorados y sulfitos o la pérdida de fuerza de la fibra de celulosa. Para superar estos inconvenientes, se han utilizado sistemas enzimáticos o microbianos de deslignificación. La lacasa es capaz de degradar polímeros naturales o sintéticos de la lignina. La oxidación por esta enzima provoca la ruptura de uniones aromáticas o alifáticas y la despolimerización de la lignina (Eggert y col., 1996).

En la industria del papel el blanqueo de la pasta se obtiene mediante tratamiento de las pastas con compuestos clorados y aromáticos que pueden ser tóxicos, mutagénicos y cancerígenos (Taspinar y Kolankaya, 1998). Se ha utilizado el sistema lacasa-mediador para el bioblanqueo de la pasta pero su utilización está condicionada por la falta de un mediador barato (Taspinar y Kolankaya, 1998). El papel de bioremediación de las lacasas en la industria del papel viene condicionado por la alcalinidad del efluente. Así se ha llevado a cabo un considerable esfuerzo para identificar lacasas que puedan actuar en estas condiciones alcalinas. Así se ha implicado a la lacasa de *Corioloopsis gallica* en la decoloración de efluentes alcalinos como los de la industria del papel (Milstein y col., 1988). También las lacasas pueden ser aplicadas a la bioremediación de residuos de la industria del papel por una decloronización directa (Bajpai, 1999) y separación de clorofenoles y cloroligninas del efluente (Wong y col., 2000). Otros usos de las lacasas en esta industria es la reducción del número kappa de la pasta (Abadulla y col., 2000) y en la mejora de las propiedades mecánicas de la pasta (Kuznetsov y col., 2001).

#### **I.4.13.3. Papel de las lacasas como biosensores**

La utilización de lacasas en la industria de los biosensores se atribuye principalmente a su amplia variedad de sustratos lo que permite la detección de un amplio rango de fenólicos (Fogel y Limson, 2013; Palmore y Kim, 1999). Los biosensores que utilizan lacasa incluyen un electrodo que puede ser utilizado para la detección de fenoles como catecoles en el té (Palmore y Kim, 1999), compuestos fenólicos en el vino y ligninas y fenoles en aguas residuales (Giovanelli y Ravasini, 1993). Fogel y Limson, 2013, desarrollaron un método rápido y simple de detectar sustratos fenólicos electroquímicamente por biosensores de lacasas.

#### **I.4.13.4. Papel de las lacasas en la industria del vino y bebidas**

La lacasa puede prevenir los cambios no deseables como decoloración, enturbiamiento o cambios en el sabor en cervezas, jugos de frutas y vinos por la eliminación de compuestos fenólicos como ácidos cumárico, flavanos y antocianinas (Marbarch y col., 1985).

Las lacasas naturales no siempre son útiles en aplicaciones industriales. Las principales limitaciones son: (i) la necesidad de usar un mediador redox para la oxidación indirecta de sustratos diferentes a fenoles y arilaminas, y (ii) su actividad es óptima generalmente a pH ácido, lo que impide su uso en ambientes a otros pHs.

Las técnicas de ingeniería genética permiten obtener lacasas recombinantes modificadas con alto potencial de oxidación, amplio rango de sustratos y de pHs. Ello implica realizar mutagénesis dirigida en lacasas cuyas estructuras cristalinas hayan sido estudiadas, o DNA "shuffling" (mutagénesis al azar *in vitro*, seguida de selección).

Sin embargo, estas metodologías requieren un sistema de expresión con alta eficiencia de transformación y de secreción de metaloenzimas activas. Aunque todas las lacasas fúngicas poseen una estructura conservada en los sitios activos, exhiben una alta diversidad en la proteína y en su parte polisacarídica, (Mayer y Staples, 2002). Esta compleja situación, junto con la falta de un método eficiente de transformación para basidiomicetos, ha estimulado la búsqueda de organismos heterólogos de expresión para incrementar y abaratar el coste de producción de lacasas con propiedades biotecnológicas y estudiar su estructura y propiedades catalíticas. Algunas lacasas han sido expresadas en *Saccharomyces cerevisiae* (Cassland y Jönsson, 1999; Kojima y col., 1990; Larsson y col., 2001), *P. pastoris* (Gelo-Pujic y col., 1999; Jönsson y col., 1997; Otterbein y col., 2000), *T. reesei* (Saloheimo y Niku-Paavola, 1991), *A. oryzae* (Berka y col., 1997; Ducros y col., 1997; Xu y col., 1999; Yaver y col., 1996 y 1999), *A. niger* (Record y col., 2002; Sigoillot y col., 2005) y *Y. lipolytica* (Madzak y col., 2005).

38

Así para el diseño de lacasas con aplicación industrial, se han desarrollado eficientes sistemas de expresión que permiten mutagénesis dirigida (Gelo-Pujic y col., 1999; Xu y col., 1998 y 1999) o de evolución molecular *in vitro*. Se estima que, un experimento de "DNA shuffling" del gen de una lacasa requiere el análisis de al menos  $10^4$  transformantes para obtener un mutante con las propiedades de interés (Madzak y col., 2005). Por otra parte, con el fin de comparar los efectos de varias mutaciones es necesario seleccionar transformantes con el mismo número de copias y loci integrados.

#### La lacasa de *P. flavido-alba*: resultados previos

*P. flavido-alba* es un hongo ligninolítico que de encuadra dentro del Phylum *Basidiomycota*, Clase *Hymenomyces*, Orden *Aphylophorales*, Familia *Corticaceae* (Alexopoulos, 1996).

*P. flavido-alba* fue seleccionado como objeto de estudio por nuestro grupo de investigación de entre otros WRF por ser más eficaz que otros hongos probados para la decoloración de los efluentes de la industria papelera (Pérez y col., 1997).

El sistema ligninolítico de este hongo está constituido por peroxidadas (LiP y MnP) y lacasa. Al menos se producen cinco isoenzimas de LiP de pIs entre 3.2 y 3.9 y masa molecular entre 30 y 40 kDa, muy parecidas a las descritas en *P. chrysosporium* (Ben Hamman y col., 1997) y otras MnPs (al menos cinco isoformas) en la fracción mayoritaria de actividad tras cromatografía de intercambio aniónico Mono Q de pIs entre 4.75 y 5.6 y masa molecular de 45 kDa (Ben Hamman y col., 1999). Además este hongo produce minoritariamente otra MnP de masa molecular 55 kDa y pI más ácido < de 2.8. (de la Rubia y col., 2002a). La detección de la lacasa en este hongo fue posible tras el desarrollo de un medio de cultivo apropiado para su expresión (Pérez y col., 1996). En este medio la lacasa de este hongo una vez purificada fue parcialmente purificada en cuanto a su masa molecular, pI, temperatura y pH óptimos así como en termoestabilidad y estabilidad a pH (Pérez y col., 1996). Tras la inducción con vainillina con objeto de aumentar su producción, se pudo llegar a una caracterización más amplia bioquímica y molecular (de la Rubia y col., 2002b).

La lacasa de *P. flavido-alba* es poco similar a lacasas típicas, especialmente en su secuencia N-terminal, alta masa molecular, alto porcentaje de glicosilación y altos  $K_m$  frente al ABTS y catecol. De la misma manera se ha encontrado algunas particularidades en esta lacasa tales como la oxidación del  $Mn^{2+}$  (de la Rubia y col., 2002b) y la oxidación del hierro (Lucas y col., 2005), lo que sugiere que esta enzima posee otras características especiales para su estudio y aplicación biotecnológica. En este sentido ya se ha demostrado que la lacasa de *P. flavido-alba* juega un papel muy importante en los procesos de decoloración de las aguas residuales de las almazaras (Pérez y col., 1998).

También hemos caracterizado el gen de la lacasa de *P. flavido-alba* (Rodríguez-Rincón y col., 2010) mediante un método de *screening* por PCR. La secuencia del ADNc completa (Gen Bank *accesión* number: EF446161) se obtuvo por solapamiento de las secuencias obtenidas por este método y su alineamiento con el ADNg.

Se determinó un marco de lectura abierto de 1704 pb desde el codón de iniciación hasta el de terminación (ATG/TAA) de la traducción y codifica para un polipéptido (PfaL) de 567 aminoácidos. En la proteína deducida se identificó un péptido señal de secreción de 25 aminoácidos, pero este péptido estaba separado del amino terminal 19 aminoácidos, lo que sugiere que la PfaL madura puede requerir dos procesamientos proteolíticos.

El gen *pfaL* ocupa una región de 2978 pb y contiene 19 intrones con una longitud promedio de 58 pb y sitios de corte con secuencias consenso GT/AG. La posible región promotora del gen incluye sitios TATA y CAAT a -99 y -247 del codón de inicio respectivamente y secuencias consenso para elementos reguladores de la transcripción encontrados en otros genes de lacasas fúngicas como: elementos de respuesta a metales a -183, -504 y -1369; elementos de respuesta a xenobioticos a -483; elementos de respuesta a antioxidantes a -331 y -916; un posible AP1 a -1116; elementos de respuesta al nitrógeno a -900, -1036 y -1325; y un elemento glucosa represor a -424.

Con objeto de establecer la relación filogenética de la lacasa deducida de *P.flavidoalba* se realizaron varios alineamientos de ella con las secuencias de las proteínas multicobre (incluyendo lacasas y ferroxidasas) disponibles en las bases de datos. Según los estudios filogenéticos, las lacasas fúngicas se agrupan en dos grandes grupos, las lacasas de basidiomicetos y las de ascomicetos (Hoegger y col. 2006; Valderrama y col. 2003). La secuencia de PfaL alineó fuera de los grupos de las lacasas o dentro del grupo de lacasas de los ascomicetos según el algoritmo utilizado.

## I.5. Referencias de la introducción

### A

**Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Cavaco, P.A. y Gubitz, G.M. (2000).** Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3357-3362.

**Adler, E. (1977).** Lignin chemistry. Past, present and future. *Wood Sci. Technol.* **11**: 169-218.

**Ahn, M.Y., Dec, J., Kim, E. y Bollag, J.M. (2002).** Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *J. Environ. Qual.* **31**: 1509-1515.

**Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. y Blackwell, M. (1996).** introductory micology 4<sup>th</sup> ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA.

**Álvarez, J.M., Conessa, P., Mancilla, R.A., Polanco, R., Santibanez, P.A. y Vicuña, R. (2009).** Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispota* is mediated by an ACE1-like copper-fist transcription factor. *Fungal Genet. Biol.* **46**: 104-111.

**Alves, A.M.C.R., Record, E., Lomascolo, A., Scholtmeijer, K., Asther, M., Wessels, J.G.H. y Wosten, H.A.B. (2004).** Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6379-6384.

**Ander, P., Eriksson, K.-E. y Yu, H.-S. (1984).** Metabolism of lignin-derived aromatic acids by wood-rotting fungi. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 60-68.

**Andrzej, L., Cho, N-S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. y Rogalski, J. (2001).** Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* **41**: 185-227.

**Arana, A. (2002).** Aplicaciones de la biología molecular. Identificación del basidiomiceto *Trametes* sp I-62 y expresión heteróloga del gen *cg/lcc1* en *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.

**Archibald, F., Paice, M.G. y Jurasik, L. (1990).** Decolorization of kraft belachery effluent chromospheres by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 846-853.

**Arias, M.E., Arenas, M., Rodriguez, J., Soliveri, J., Ball, A.S. y Hernández, M. (2003).** Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1953-1958.

**Arora, D.S. y Rampal, P. (2002).** Laccase production by some *Phlebia* species. *J. Basic Microbiol.* **42**:295-301.

## B

---

**Backa, S., Gierer, J., Reitberger, T. y Nilsson, T. (1993).** Hydroxyl radical activity associated with the growth of white-rot fungi. *Holzforschung* **47**: 181-187.

**Bajpai, P. (1999).** Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol. Progr.* **15**: 147-157.

**Baldrian, P. (2006).** Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 215-242.

**Bao, W., O'Malley, D., Whetten, R. y Sederoff, R.R. (1993).** A laccase associated with the lignification in *Loblolly pine* xylem. *Science* **260**: 672-674.

**Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H. y Hardy, G.E. (1996).** Inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaera* sp. when screened on the polymeric dye Ply R-478. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**: 93-96.

**Barr, D.P. y Aust, S.D. (1994).** Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **28**: 78-87.

**Berka, R.M., Schneider, P., Golightly, E.J., Brown, S.H., Madden, M., Brown, K.M., Halkier, T., Mondorf, K. y Xu, F. (1997).** Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3151-3157.

**Bertrand, G. (1896).** Coexistence of laccase and tyrosinase in certain fungi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* **123**: 463-465.

**Bezalel, L.H. y Cerniglia, C.E. (1996).** Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 292-295.

**Blanchette, R.A. (1995).** Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.* **73**: S999-S1010.

**Bleve, G., Lezzi, C., Mita, G., Rampino, P., Perrotta, C., Villanova, L. y Griego, F. (2008).** Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Sacharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**: 731-741.

**Bollag, J.M., Chu, H.L., Rao, M.A. y Gianfreda, L. (2003).** Enzymatic oxidative transformation of chlorofenol mixtures. *J. Environ. Qual.* **32**: 63-69.

**Bohlin, C., Jonsson, L.J., Roth, R. y Vanzyl, W.H. (2006).** Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Apergillus niger*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **129**: 195-214.

**Bose, S., Mazumder, S. y Mukherjee, M. (2007).** Laccase production by the white-rot fungus *Termitomyces clypeatus*. *J. Basic Microbiol.* **47**:127-131.

**Bourbonnais, R. y Paice, M.G. (1988).** Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem. J.* **255**: 445-450.

**Bourbonnais, R. y Paice, M.G. (1990).** Substrate range of veratryl alcohol oxidase and phenol oxidase from white-rot fungi. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* **199**: 38.

**Bourbonnais, R., Paice, M.G.; Freiermuth, B., Bodie, E. y Borneman, S. (1997).** Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4627-4632.

**Brown, M.A., Zhao, Z. y Mauk, A.G. (2002).** Expression and characterization of a recombinant multicopper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorg.*

Chim. Acta **331**: 232-238.

**Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C. y Arnold, F.H. (2003).** Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by direct evolution. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 987-995.

**Buswell, J.A., Cai, Y.J. y Chang, S.T. (1995).** Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. FEMS Microbiol. Lett. **128**: 81-87.

**Buswell, J.A. y Odier, E. (1987).** Lignin biodegradation. Crit. Rev. Biotechnol. **6**: 1-60.

## C

---

**Calcaterra, A., Galii, C. y Gentili, P. (2008).** Phenolic compounds as likely natural mediators of laccase: A mechanistic assessment. J. Mol. Catal. B-Enzym. **51**: 118-120.

44

**Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2005).** Lignin derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 1775-1784.

**Camarero, L., Martinez, M.J. y Martinez, A.T. (1999).** A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving alpha-keto-gamma-thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 916-922.

**Camattari, A., Bianchi, M.M., Branduardi, P., Porro, D. y Brambilla, L. (2007).** Induction by hypoxia of heterologous-protein production with the KI PDCI promoter in yeasts. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 922-929.

**Cancel, A.M., Orth, A.B. y Tien, M. (1993).** Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 2909-2913.

**Cassland, P. y Jönsson, L.J. (1999).** Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. Appl. Microbiol.

Biotechnol. **52**: 393-400.

**Chang, A., Scheer, M., Grote, A., Schomburg, I. y Schomburg, D. (2009).** BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Res.* **37**: 588-592.

**Chen, S., G.E.W. y Buswell, J.A. (2004).** Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Eur. J. Biochem.* **271**: 318-328.

**Chen, S., Ma, D., Ge, W. y Buswell, J.A. (2003).** Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**: 143-148.

**Cheng, C.L. y Chang. H. (1985).** Chemistry of lignin biodegradation. En: Higuchi, T. Ed. Biosynthesis and biodegradation of wood components. Academic Press, Orlando. USA.

**Christopher, F.B., Stephen, R.G., Pari, S., Fraser, A.A. y Sarah, J.G. (2009).** Designer laccases: A voge for high potential fungal enzymes?. *Trends Biotechnol.* **28**: 63-72.

45

---

**Claus, H. (2003).** Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **179**: 145-150.

**Claus, H. (2004).** Laccase: structure, reactions, distribution. *Micron.* **35**: 93-96.

**Claus, H. y Filip, Z. (1997).** The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiol. Res.* **152**: 209-216.

**Colao, M.C., Lupino, S., Garzillo, A.M., Buonocore, V. y Ruzzi, M. (2006).** Heterologous expression of *lccI* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microb. Cell Fact.* **5**: 31-42.

**Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A. y Dobson, A.D.W. (1996).** Oxidation of anthracne and benzo (a) pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4563-4567.

**Collins, P.J. y Dobson, A.D.W. (1997).** Regulation of laccases gene expression in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3444-3450.

**Constam, D., Muheim, A., Zimmermann, W. y Fiechter, A. (1991).** Purification and partial characterization of an intracellular NADH: quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Gen. Microbiol. **137**: 2209-2214.

**Crawford, R.L. Ed. (1981).** Lignin biodegradation and transformation. Wiley Interscience. New York. USA.

## D

---

**Da Cunha, M.A.A., Barbosa, A.M., Giese, E.C. y Dekker, R.F.H. (2003).** The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. J. Basic Microbiol. **43**: 385-392.

**D'Annibale, A., Stavi, S.R., Vinciguera, V. y Sermanni, G.G. (2000).** Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolic removal efficiency in olive mill wastewater. J. Biotechnol. **77**: 265-273.

**Davies, G. J. y Ducros, V. (2001).** Laccase. En: Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T. y Wieghardt, K. Eds. Handbook of metalloproteins. John Wiley and Sons, Ltd. Chichester, West Sussex. UK.

**de la Rubia, T., Linares, A., Pérez, J., Muñoz-dorado, J., Romera, J. y Martínez, J. (2002a).** Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavid-alba*. Res. Microbiol. **153**: 547-554.

**de la Rubia, T., Ruiz, E., Pérez, J., y Martínez, J. (2002b).** Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavid-alba* induced by vanillin. Arch. Microbiol. **179**: 70-73.

**De Souza, C.G.M., Tychanowicz, G.K., De Souza D.F. y Peralta, R.M. (2004).** Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. J. Basic Microbiol. **44**: 129-136.

**Dekker, R.F.H. y Barbosa, A.M. (2001).** The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. Enzyme Microbiol. Tech. **28**: 81-88.

**Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu, Y.C., Gorman, M.J., Kramer, K.J. y Kanost, M.R. (2004).** Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**: 29-41

**Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P. y Bally, R. (2000).** Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 919-927.

**Donaldson, L.A. (2001).** Lignification and lignin topochemistry: an ultrastructural view. *Phytochemistry* **57**: 859-873.

**Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K., Brown, S., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S. Pedersen, A.H. y Davies, G.J. (1998).** Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat. Struc. Mol. Biol.* **5**: 310-316.

## E

47

---

**Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. y Eriksson, K.E.L. (1996).** A fungal metabolite mediates degradation of non phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* **391**: 144-148.

**Eisenman, H.C., Mues, M., Weber, S.E., Frases, S., Gerfen, G. y Casadevall, A. (2007.)** *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology* **153**: 3954-3962.

**Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Khardziani, T. y Agathos, N.S. (2009).** Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 331-339.

**Endo, K., Hayashi, Y., Hibi, T., Hosono, K., Beppu, T. y Ueda, K. (2003).** Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* **133**: 671-677.

**Enguita, F.J. (2011).** Structural biology of fungal multicopper oxidases. En: Leitão, A.L. Ed. *Mycofactories*. Benthan Science Publishers Ltd. Lisboa, Portugal.

Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O. y Carrondo, M.A. (2003). Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* **278**: 19416-19425.

Eugenio, M.E., Carbajo, J.M., Martín, J.A., González, A.E. y Villar, J.C. (2010). Laccase production by *Pycnoporus sanguineus* under different culture conditions. *J. Basic Microbiol.* **49**: 433–440.

Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F. y Veness, R.G. (1994). Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 235-240.

## F

---

Faraco, V., Giardina, P. y Sannia, G. (2003). Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* **149**: 2155-2162.

Fengel, D. y Wegener, G. Eds. (1984). *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. De Gruyter, Berlin.

48

---

Fernández, J. A., Henao, L.M., Pediola-Rodríguez, A.M. y Quevedo-Hidalgo, B. (2009). Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo. *Rev. Colomb. Biotechnol.* **81**: 59-72.

Ferrer-Miralles, N., Domingo-Spin, J., Corchero, J.L., Vázquez, E. y Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceutical. *Microb. Cell Fact.* **24**: 8-17.

Flores, C., Vidal, C., Trejo-Hernández, M.R., Gallino, E. y Serrano-Carreón, L. (2009). Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. *J. Appl. Microbiol.* **106**: 249-257.

Fogel, R. y Limson, J.C. (2013). Electrochemically predicting phenolic substrates suitability for detection by amperometric laccase biosensors. *Electroanalysis* **25**: 1237-1246.

Fugita, M. y Harada, H. (1991). Ultrastructure and formation of wood cell wall. En: Hon, D.N.-S. y Shirashi, N. Eds. *Wood and Cellulosic Chemistry*. Marcel Dekker

Inc., New York. USA.

**Fukushima, Y. y Kent, K.T. (1995).** Laccase component of the *Cerioporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 872-876.

## G

---

**Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C.K., Strauss, J. y Haltrich, D. (2002).** Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* **148**: 2159-2169.

**Galliano, H., Gas, G., Seris, J.L. y Boudet, A.N. (1991).** Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 478-482.

**Garavaglia, S., Cambria, M.T., Miglio, M., Regusa, S., Lacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A. y Rizzi, M. (2004).** The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full component of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J. Mol. Biol.* **3425**: 1510-1531.

49

---

**Gavnholt, B. y Larssen, K. (2002).** Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiol. Plant* **116**: 273-280.

**Gelo-Pujic, M., Kim, H.H., Butlin, N.G. y Palmore, G.T. (1999).** Electrochemical studies of a truncate D laccase produced in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5515-5521.

**Gianfreda, L., Xu, F. y Bollag, J.M. (1999).** Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed. J.* **3**: 1-25.

**Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Pscitelli, A., Vanhulle, S. y Sannia, G. (2009).** Laccases: a neverending story. *Cell Mol. Life Sci.* **67**: 369-385.

**Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G. y Sannia, G. (1999).** Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.* **34**: 655-663.

**Giovanelli, G. y Ravasini, G. (1993).** Apple juice stabilization by combined enzyme membrane filtration process. *LWT- Food Sci. Technol.* **26**: 1-7.

**Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M. y Bally, R. (1993).** Polyphenol oxidase from *Azospirillum lipoferum* isolated from the rhizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**: 205-210.

**Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M. y Gold, M.H. (1983).** An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**: 1077-1083.

**Gorbacheva, M., Morozova, O., Shumakovich, G., Streltsov, A., Shleev, S. y Yaropolov, A. (2009).** Enzymatic oxidation of manganese ions catalysed by laccase. *Bioorg. Chem.* **37**: 1-5.

**Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000).** Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **383**: 142-147.

50

**Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. y Evans, C.S. (1994).** Hydrogen peroxide producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 465-470.

**Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1990).** Characterization and purification of an aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*. *Abs. 4th. Inter. Mycol. Congr. Regensburg*, 232.

**Guo, M., Lu, F.P., Du, L.X., Pu, J. y Bai, D.Q. (2006).** Optimization of the expression of a laccase gene from *Trametes versicolor* in *Pichia methalonica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 848-852.

**Guota, J.K., Hamp, S.G., Buswell, J.A. y Eriksson, K.E. (1981).** Metabolims of transferulic acid by the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* **128**: 349-354.

**H**

---

**Hakulinen, N., Kiiskinen, L.-L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A. y Rouvinen, J. (2002).** Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 601-605.

**Hatakka, A. (2001).** Biodegradation of lignin, in lignin, humic substances and coal. En: Hofrichter, M. y Steinbuchel, A. Eds. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

**Hatakka, A. (1994).** Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi - Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 125-135.

**Hatamoto, O., Sekine, H., Nakano, E. y Abe, K. (1999).** Cloning and expression of a cDNA encoding the laccase from *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 58-64.

**Heinfling, A., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Bergbauer, M. y Szewzyk, U. (1998).** Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2788-2793.

**Higuchi, T. (1990).** Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* **24**: 23-63.

**Higuchi, T. Ed. (1997).** Biochemistry and molecular biology of wood. Springer-Verlag, New York.

**Hofrichter, M. (2002).** Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Tech.* **30**: 454-466.

**Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R. y Kues, U. (2006).** Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J.* **273**: 2308-2326.

**Hong, Y.Z., Zhou, H.M., Tu, X.M, Li, J.F. y Xiao, Y.Z. (2007).** Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes* sp. 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Curr. Microbiol.* **54**: 260-265.

**Hood, E.E., Drees, M.R., Beifuss, K., Magallanes, L., Horn, M.E., Callaway, E., Dress, C., Delaney, D.E., Clough, R. y Howard, J.A. (2003).** Criteria for high-level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. *Plant Biotechnol.*

J. 1: 129-140.

**Hoshida, H., Fujita, T., Murata, K., Kubo, K. y Akada, R. (2005).** Copper-dependent production of a *Pycnoporus ciccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Sacharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 1090-1097.

**Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C. y Yan, B. (2004).** Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem.* **39**: 1415-1419.

**Hsieh, C.J. y Jones, G.H. (1995).** Nucleotide sequence, transcriptional analysis, and glucose regulation of the phenoxazinone synthase gene (*phsA*) from *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* **177**: 5740-5747.

**Hu, M.R., Chao, Y.P., Zhang, G.Q., Yang, X.Q., Xue, Z.Q. y Qian, S.J. (2007).** Molecular evolution of *Fome lignosus* laccase by ethyl methane sulfonate-based random mutagenesis in vitro. *Biomol. Eng.* **24**: 619-624.

**Hullo, M.F., Moszer, I., Danchin, A. y Martin-Verstraete, I. (2001).** COtA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.* **183**: 5426-5430.

52

---

## I

**Iwashika, K. (2002).** Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *J. Biosc. Bioengin.* **94**: 530-535.

---

## J

**Janusz, G., Rogalski, J., Barwinska, M. y Szczodrak, J. (2006).** Effects of culture conditions on production of extracellular laccase by *Rhizoctonia praticola*. *Polish J. Microbiol.* **55**: 309-319.

**Jensen, K.A.-Jr, Bao, W., Kawai, S., Srebotnik, E. y Hammel, K.E. (1996).** Manganese dependent cleavage of non phenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3679-3686.

**Jiménez-Juárez, N., Roma-Miranda, R., Baeza, A., Sánchez-Amat, A.,**

**Vazquez-Duhalt, R. y Valderrama, B. (2005).** Alkali and halide-resistant catalysis by the multipotent oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *J. Biotechnol.* **117**: 73-82.

**Johannes, C. y Majcherczyk, A. (2000).** Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator system. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 524-528.

**Jolivalt, C., Madzak, C., Brault, A., Caminade, E., Malosse, C. y Moigin, C. (2005).** Expression of a laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 450-456.

**Jones, G.H. 2000.** Actinomycin production persists in a strain of *Streptomyces antibioticus* lacking phenoxazinone synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1322-1327.

**Jönsson, L., Sjöström, K., Häggström, I. y Nyman, P.O. (1995).** Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. *Biochim. Biophys. Acta* **1251**: 210-215.

53

**Jönsson, L.J, Saloheimo, M. y Penttilä, M. (1997).** Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lccI* and expression in *Pichia pastoris*. *Curr. Genet.* **32**: 425-430.

## K

**Kajita, S., Sugawara, S., Miyazaki, Y., Nakamura, M., Katayama, Y., Shishido, K y Iimura, Y. (2004).** Overproduction of recombinant laccase using a homologous expression systems in *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 194-199.

**Kamitaka, Y., Tsujimura, S., Setoyama, N., Kajino, T. y Kano, K. (2007).** Fructose/dioxigen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis. *Phys. Chem.* **9**: 1793-1801.

**Kamitsuji, H., Honda, Y., Watanabe, T. y Kuwahara, M. (2004).** Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus*

*ostreatus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **65**: 287-294.

**Karahanian, E., Corsini, G., Lobos, S. y Vicuña, R. (1998)**. Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Biochim. Biophys. Acta **1443**: 65-74.

**Kataoka, A., Komori, H., Ueki, Y., Konno, Y., Kamitaka, Y., Kurose, S., Tsujimura, S., Higuchi, Y., Kano, K., Seo, D. y Sakurai, T. (2007)**. Structure and function of the engineered multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli* deletion of the methionine-rich helical region covering the substrate-binding site. J. Mol. Biol. **373**: 141-152.

**Kawai, S., Umezawa, T. y Higuchi, T. (1989)**. Oxidation of methoxylated benzyl alcohols by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde. Wood Res. **76**: 10-16.

**Kersten, P.J. (1990)**. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**: 2936-2940.

54

**Kersten, P.J. y Kirk, T.K. (1987)**. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. **169**: 2195-2201.

**Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Bailey, M., Ylosmaki, E., Siika-Aho, M. y Saloheimo, M. (2004)**. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. Microbiology **150**: 3065-3074.

**Kilaru, S., Hoegger, P.J., Majcherczyk, A., Burns, C., Shishido, K., Bailey, A., Foster, G.D. y Kues, U. (2006)**. Expression of laccase gene *lccI* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. Appl. Microbiol. Biotechnol. **71**: 200-210.

**Kim, Y., Yeo, S., Song, H.G. y Choi, H.T. (2008)**. Enhanced expression of laccase during the degradation of endocrine disrupting chemicals in *Trametes versicolor*. J. Microbiol. **46**: 402-407.

**Kirk, T.K. (1971).** Effects of microorganisms on lignin. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 185-210.

**Kirk, T.K. y Cullen, D. (1998).** Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. En: Young, R. A. y Akhtar, M. Eds. *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. TAPPI Press. Atlanta. USA.

**Kirk, T.K. y Farrell, R.L. (1987).** Enzymatic 'combustion': the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 465-505.

**Kishi, K., Wariishi, H., Márquez, L., Dunford, H.B. y Gold, M.H. (1994).** Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic acid chelators and pH. *Biochem.* **33**: 8694-8701.

**Klonowska, A., Gaudin, C., Asso, M., Fournel, A., Reglier, M. y Tron, T. (2005).** *Lac3*, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast. *Enzyme Microb. Tech.* **36**: 34-41.

**Kojima, Y., Tsukuda, Y., Kawai, Y., Tsukamoto, A., Sujiura, J., Sakaimo, M. y Kita, Y. (1990).** Cloning sequences analysis and expression of ligninolytic phenoloxidases genes of the white rot basidiomycetes *Coriolus hirsutus*. *J. Biol.* **265**: 15224-15230.

**Koschorreck, K., Richter, S.M., Ene, A.B., Roduner, E., Schmid, R.D. y Urlacher, V.B. (2008).** Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**: 217-224.

**Kumar, S.V.S., Phale, P.S., Durani, S. y Wangikar, P.P. (2003).** Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol. Bioengin.* **83**: 386-394.

**Kuznetsov, B.A., Shumakovich, G.P., Koroleva, O.V. y Yaropolov, A.I. (2001).** On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. *Biosen. Bioelec.* **16**: 73-84.

**Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. y Gold, M.H. (1984).** Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. **169**: 247-250.

---

## L

**Lafayette, P.R., Eriksson, K.E. y Dean, J.F. (1999).** Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). Plant Mol. Biol. **40**: 23-35.

**Larsson, S., Cassland, P. y Jonsson, L.J. (2001).** Development of a *Sacharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. Appl Environ. Microbiol. **67**: 1163-1170.

**Leatham, G.F. y Kirk, T.K. (1983).** Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white rot basidiomycetes. FEMS Microbiol. Lett. **16**: 65-67.

**Lee, Y., Hendson, M., Panopoulos, N.J. y Schroth, M.N. (1994).** Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small copper proteins and multicopper oxidases. J. Bacteriol. **176**: 173-188.

**Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D. y Rogalski, J. (2001).** Fungal laccase: properties and activity on lignin. J. Basic Microb. **41**: 185-227.

**Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Hofrichter, M. y Rogalski, J. (1999).** Biodegradation of lignin by white rot fungi. Fungal Genet. Biol. **27**: 175-185.

**Levin, L., Forchiassin, F. y Ramos, A.M. (2002).** Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. Mycologia **94**: 377-383.

**Lewis, N.G. y Yamamoto, E. (1990).** Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. Ann. Rev. Plant Phys. **41**: 455-496.

**Li, F., Hong, Y.Z., Xiao, Y.Z., Xu, Y.H. y Fang, W. (2007).** High production of laccase B from *Trametes* sp. in *Pichia pastoris*. World J. Microbiol. Biotechnol. **23**:

741-745.

**Li, L. y Steffens, J.C. (2002).** Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* **215**: 239-247.

**Lindley, P.F., Bertini, I., Sigel, A. y Sigel, H. Eds. (2001).** Multi-copper oxidases. En: Hand-book on metalloproteins, Marcel Dekker, Inc. New York.

**Lu, F. y Ralph, J. (2002).** Preliminary evidence for sinapyl acetate as a lignin monomer in kenaf. *J. Chem. Soc. Chem. Commu.* **1**: 90-91.

---

## M

**Madzak, C., Mimmi, M.C., Caminade, E., Brault, A., Baumberger, S., Briozzo, P., Mougin, C. y Jolival, C. (2005).** Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**: 77-84.

**Madzak, C., Otterbein, L., Chamkha, M., Moukha, S., Asther, M., Gaillardin, C. y Beckerich, J.M. (2005).** Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* **5**: 635-646.

**Mander, G.J., Wang, H., Bodie, E., Wagner, J., Vienken, K., Vinuesa, C., Foster, C., Leeder, A.C., Allen, G., Hamill, V., Janssen, G.G., Dunn-Coleman, N., Karos, M., Lemaire, H.G., Subkowski, T., Bollschweiler, C., Turner, G., Nüsslein, B. y Fischer, R. (2006.)** Use of laccase as a novel, versatile reporter system in filamentous fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5020-5026.

**Mansur, M., Suárez, T., Fernández-Larrea, J., Brizuela, M.A. y González, A.E. (1997).** Identification of a laccase gene family in the new lignin degrading basidiomycete CECT 20197. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2637-2646.

**Manubens, A., Canessa, P., Folch, C., Avila, M., Salas, L. y Vicuña, R. (2007).** Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *FEMS Microbiol. Lett.* **275**: 139-145.

**Marbach, I., Harel, E. y Mayer, A.M. (1984).** Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochem. J.* **23**: 2713-2717.

**Marbach, I., Harel, E. y Mayer, A.M. (1985).** Pectin: a second inducer for laccase production by *Botrytis cinerea*. *Phytochem. J.* **24**: 2559-2561.

**Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2005).** Biodegradation of lignocellulosics: Microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. *Int. Microbiol.* **8**: 195-204.

**Martins, L.G., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H. y Enriques, A.O. (2002).** Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* **277**: 18849-18859.

**Matera, I., Gullotto, A., Tilli, S., Ferraroni, M., Scozzafava, A. y Briganti, F. (2008).** Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate. *Inorg. Chim. Acta* **361**: 4129-4137.

58

**Mayer, A.M. y Staples, R.C. (2002).** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem. J.* **60**: 551-565.

**McGuirl, M.A. y Dooley, D.M. (1999).** Copper-containing oxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**: 138-144.

**Milstein, O., Hars, A., Majcherczyk, A., Trojanowski, J., Tautz, D., Zanker, H. y Huettermann, A. (1988).** Removal of chlorophenols and chlorolignins from bleaching effluent by combined chemical and biological treatment. *Water. Sci. Technol* **20**: 161-170.

**Minussi, R.C., Miranda, M.A., Silva, J.A., Feirreira. C.V., Aoyama, H., Marangoni, S., Rotilio, D., Pastore, G.M. y Durán, N. (2007).** Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Afr. J. Biotechnol.* **6**: 1248-1254.

**Missall, T.A., Moran, J.M., Corbett, J.A. y Lodge, J.K. (2005).** Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. *Eukaryot. Cell* **4**: 202-208.

**Moin, S.F. y Omar, M.N. (2014).** Laccase enzymes: purification, structure to catalysis and tailoring. *Protein Peptide Lett.* **21**: 707-713.

**Moldes, D., Lorenzo, M. y Sanroman, M.A. (2004).** Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic waste. *Biotechnol. Lett.* **26**: 327–330.

**Montenecourt, B. y Eveleigh, D.E. (1979).** Production and characterization of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. TAPPI Annual Meeting Proc. Tech. Asso. Pulp Paper Industry, Atlanta.

**Moreira, P.R., Almeida-Varo, E., Malcata, F.X. y Duarte, J.C. (2007).** Lignin transformation by a versatile peroxidase from a novel *Bjerkandera* sp. strain. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **59**: 234-238.

**Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V. y Yaropolov, Y.I. (2007).** Laccase mediator systems and their applications: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* **43**: 523-535.

**Muheim, A., Waldner, R., Leisola, M.S.A. y Fiechter, A. (1990).** An extracellular aryl-alcohol oxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Enzyme Microb. Tech.* **12**: 204-209.

**Myasoedova, N.M., Chernykh, A.M., Psurtseva, N.V., Belova, N.V. y Golovleva, L.A. (2009).** New efficient producers of fungal laccases. *Appl. Biochem. Microbiol.* **44**: 73–77.

---

## N

**Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T., Kanda, K. y Sato, T. (2003).** Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology* **149**: 2455-2462.

Necochea, R., Valderrama, B., Diaz-Sandoval, S., Folch-Mallof, J.L., Vasquez-Duhalt, R. y Iturriaga, G. (2005). Phylogenetic and biochemical characterization of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. FEMS Microbiol. Lett. **244**: 235-241.

Niku-Paavola, M.L. y Viikari, L. (2000). Enzymatic oxidation of alkenes. J. Mol. Catal. **10**: 435-444.

Niku-Paavola, M.L., Karhunen, E., Salola, P. y Raunio, V. (1988). Lignolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. Biochem. J. **254**: 877-888.

## O

---

Ong, E., Pollock, W.B.R. y Smith, M. (1997). Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor*. Gene **196**: 113-119.

60

Osma, J.F., Toca-Herrera, J.L. y Rodríguez-Couto, S. (2010). Uses of laccases in the food industry. Enzyme Res. **2010**: 918761.

Otterbein, L., Record, E., Longhi, S., Asther, M. y Moukha, S. (2000). Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. Eur. J. Biochem. **267**: 1619-1625.

## P

---

Palmieri, G., Bianco, C., Cennamo, G., Giardina, P., Marino, G., Monti, M. y Sannia, G. (2001). Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. ACTA Biochim. Polonica **67**: 2754-2759.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. y Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 920-924.

**Palmore, G.T.R. y Kim, H.H. (1999).** Electro enzymatic reduction of dioxygen to water in the catode compartment of a biofuel cell. *J. Elec. Chem.* **464**: 110-117.

**Papinutti, V.L., Diorio, L.A. y Forchiassin, F. (2003).** Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerdermeus* grown on wheat bran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 157-160.

**Peláez, F., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1995).** Screening of 68 species of basidiomycetes involved in lignin degradation. *Mycol. Res.* **99**: 37-42.

**Pérez, J., de la Rubia, T., Ben Hamman, O y Martínez, J. (1998).** *Phanerochaete flavido-alba* laccase induction and modification os manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2726-2729.

**Pérez, J., Martínez, J. y de la Rubia, T. (1996).** Purification and partial characterization of a laccase from the White rot fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4263-4267.

**Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. y Martínez, J. (2002).** Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* **5**: 53-63.

**Pérez, J., Saez, L., de la Rubia, T. y Martínez, J. (1997).** *Phanerochaete flavido-alba* ligninolytic activities and decolorization of partially biodepured paper mill wastes. *Water Res.* **31**: 495-502.

**Pickard, M.A. y Hashimoto, A. (1988).** Stability and carbohydrate composition of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* grown in a fructose-salts medium. *Can. J. Microbiol.* **34**: 998-1002.

**Piontek, K., Antorini, M. y Choinowski, T. (2002).** Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* **277**: 37663-37669.

**Piscitelli, A., Giardina, P., Mazzoni, C. y Sannia, G. (2005).** Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Sacharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 428-439.

**Pointing, S.B. (2001).** Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 20-33.

**Polak, J. y Wilkolazka, A.J. (2012).** Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochem.* **47**: 1295-1307.

## R

---

**Record, E., Punt, P.J., Chamkha, M., Labat, M., van den Holden, C.A.M.J.J. y Asther, M. (2002).** Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **269**: 602-609.

**Regalado, V., Rodríguez, A., Perestelo, F., Carnicero, A., de la Fuente, G. y Falcón, M.A. (1997).** Lignin degradation and modification by the soil inhabiting fungus *Fusarium proliferatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3716-3718.

**Reiss, R., Ihssen, J. y Thony-Meyer, L. (2011).** *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnol.* **11**: 9-19.

**Riva, S. (2006).** Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* **24**: 219-226.

**Rodríguez-Couto S., Sanromán, M. y Gübilt, G.M. (2005).** Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere* **58**: 417-422.

**Rodríguez, E., Nuero, O., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2004).** Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biol. Biochem.* **36**: 909-916.

**Rodríguez, E., Ruiz-Dueñas, F.J., Kooistra, R., Ram, A., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2008).** Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the pel 3 encoded protein. *J. Biotechnol.* **134**: 9-19.

**Rodríguez-Rincón, F., Suárez, A., Lucas, M., Larrondo, L.F., de la Rubia, T., Polaina, J. y Martínez, J. (2010).** Molecular and structural modelling of the

*Phanerochaete flavido-alba* extracellular laccase reveals its ferroxidase structure. Arch. Microbiol. **192**: 883-892.

**Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A. y Hatakka, A. (1991).** Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. Acta Microbiol. Pol. **40**: 221-234.

**Rubilar, O., Diez, M.C. y Gianfreda, L. (2008).** Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi. Crit. Rev. Env. Sci. Tec. **38**: 227-268.

**Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1999).** Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Mol. Microbiol. **31**: 223-236.

---

## S

**Saloheimo, M. y Niku-Paavola, M.L. (1991).** Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. Biotechnol. **9**: 987-990.

**Salame, T.M., Knop, D., Levinson, D., Mabjeesh, S.J., Yarden, O. y Hader, Y. (2013).** Release of *Pleurotus ostreatus* versatile peroxidase from Mn<sup>2+</sup> repression enhanced anthropogenic and natural substrate degradation. PloS One **7**: e 52446.

**Salony, G.N., Baranwal, R., Chhabra, M., Mishra, S., Chaudhuri, T.K. y Bisaria, V.S. (2008).** Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta **1784**: 259-268.

**Sampedro, I., D'Annibale, A., Ocampo, J.A., Stazi, S.R. y Garcia-Romera, I. (2007).** Solid state cultures of *Fusarium oxysporium* transform aromatic components of olive mill dry residue and reduce its phytotoxicity. Bioresources Technol. **98**: 3547-3554.

**Sánchez-Amat, A., Lucas-Elío, P., Fernández, E., García-Borrón, J.C. y Solano, F. (2001).** Molecular cloning and functional characterization of a unique

multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta* **1547**: 104-116.

**Sánchez-Amat , A. y Solano, F. (1997)**. A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**: 787-92

**Sannia, G., Limongi, P., Cocca, E., Buonocore, F., Nitti, G. y Giardina, P. (1991)**. Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1073**: 114-119.

**Sannia, G., Giardina, P. y Luna, M. (1986)**. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol. Lett.* **8**: 797-800.

**Saparrat, M., Balatti, P.A., Martínez, M.J. y Jurado, M. (2010)**. Differential regulation of laccase gene expression in *Corioloropsis rigida* LPSC. *Fungal Biol.* **114**: 999-1006.

**Sato, Y., Wull, B., Sederoff, R. y Whetten, R. (2001)**. Molecular cloning and expression of eight cDNA in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J. Plant Res.* **114**: 147-155.

**Savoie, J.M, Mata, G. y Billette, C. (1998)**. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* sp. and shiitake, *Lentinula edodes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 589-593.

**Scheel, T., Hofer, M., Ludwig, S. y Holker, U. (2000)**. Differential expression of manganese or aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 686-691.

**Schneider, P., Caspersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K. y Ostergaard, P.R. (1999)**. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme Microb. Technol.* **25**: 502-508.

**Schoemaker, H.E., y Leisola, M.S.A. (1990)**. Degradation the lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* **13**: 101-109.

**Schoemaker, H. E., Meijer, E. M., Leisola, M. S. A., Haemmerli, S. D., Waldner, R., Sanglard, D. y Schmidt, H.W. H. (1989)**. Oxidation and reduction in lignin biodegradation. En: Lewis, N.G. y Paice M.G. Eds. *Plant Cell Wall*

Polymers: Biogenesis and Biodegradation (ACS Symposium no. 399), Washington, DC: American Chemical Society. USA.

**Schoemaker, H.E., Tuor, U., Muheim, A., Schmidt, H.W.H. y Leisola, M.S.A. (1991).** White rot degradation of lignin and xenobiotics. En: Betts, W.B. Ed. Biodegradation: Natural and synthetic materials. Springer Verlag. London, UK.

**Setti, L., Giuliani, S., Spinozzi, G. y Pifferi, P.G. (1999).** Laccase catalyzed oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. Enzyme Microb. Tech. **25**: 285-289.

**Sharma, P., Goel, R. y Capalasin, N. (2007).** Bacterial laccases. World. J. Microbiol. Biotechnol. **23**: 823-832.

**Shimada, M. y Higuchi, T. (1991).** Microbial, enzymatic and biomimetic degradation of lignin. En: Hons, D.N.S. Shiraiski, N. Eds. Wood and cellulosic chemistry. Marcel Dekker. New York.

**Shraddha, R., Shekher, S., Sehgal, S., Kamthania, M. y Kumar, A. (2011).** Laccase: microbial sources, production, purification, and potencial biotechnological applications. Enzyme Res. **2011**: 217861-217872.

65

---

**Sigoillot, C., Record, E., Belle, V., Robert, J.L., Levasseur, A., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J., Fournel, A., Sigoillot, J.C. y Asther, M. (2004).** Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. Appl. Microbiol. Biotechnol. **64**: 346-352.

**Sims, H.A., Gent, M.E., Lanthaler, K., Dunn-Coleman, N.S., Oliver, S.G. y Robson, G.D. (2005).** Transcriptome analysis of recombinant protein secretion by *Aspergillus nidulans* and the unfolded-protein response in vivo. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 2737-2747.

**Smith, M., Shnyreva, A., Wood, D.A. y Thurston, C.F. (1998).** Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Microbiology **144**: 1063-1069.

**Smith, M., Thurston, C.F., Wood, D.A. (1997).** Fungal laccases: role in delignification and possible industrial applications. En: Messerschmidt, A. Ed. Multi-copper oxidases. World Scientific. Singapore.

**Soden, D.M. y Dobson, A.D.W. (2001).** Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* **147**: 1755-1763.

**Soden, D.M., O'Callaghan, J. y Dobson, A.D.W. (2002).** Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology* **148**: 4003-4014.

**Solomon, E.I., Sundaram, U.M. y Machonkin, T.E. (1996).** Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**: 2563-2606.

**Susla, M., Novotn, C. y Svobodová, K. (2007).** The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures. *Biores. Technol.* **98**: 2109–2115.

**Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K. y Inamori, Y. (2003).** A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 2167-2175.

---

**Taspinar, A. y Kolankaya, N. (1998).** Optimization of enzymic chlorine removal from kraft pulp. *Bull. Environ. Contam.Toxicol.* **61**: 15-21.

**Téllez-Jurado, A., Arana-Cuenca, A., Gonzalez-Becerra, A.E., Viniestra-González, G. y Loera, O. (2006).** Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. *Enzyme Microb. Tech.* **38**: 665-669.

**Terrón, M.C., González, T., Carbajo, J.M., Yague, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., Dobson, A.D.W. y González, A.E. (2004).** Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on Lac gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* spI-62. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 954-962.

**Thiruchelvam, A.T. y Ramsay, J.A. (2007).** Growth and laccase production kinetics of *Trametes versicolor* in a stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 547-554.

**Thurston, C.F. (1994).** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26.

**Tien, M. y Kirk, T.K. (1988).** Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Meth. Enzymol.* **161**: 238-249.

**Torres, E., Bustos-Jaimes, I. y Le Borgne, S. (2003).** Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catalys.* **46**: 1-15.

**Tuor, U., Wariishi, H., Schoemaker, H.E. y Gold, M.H. (1992).** Oxidation of phenolic arylglycerol beta-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* - oxidative cleavage of an alpha-carbonyl model- compound. *Biochem.* **31**: 4986-4995.

---

## U

**Uldschmid, A., Dombi, R. y Marbach, K. (2003).** Identification and functional expression of *ctaA*, a P-type ATPase gene involved in copper trafficking in *Trametes versicolor*. *Microbiology* **149**: 2039-2048.

67

---

## V

**Valderrama, B., Oliver, P., Medrano-Soto, A. y Vazquez-Duhalt, R. (2003).** Evolutionary diversity of fungal laccases. *Anton. Leeuw.* **84**: 289-299.

**van Hartingsveldt, W., Mattern, I.E., van Zeijl, C.M., Pouwels, P.H. y van den Hondel, C.A. (1987).** Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 71-75.

**van Waasbergen, L.G., Hildebrand, M. y Tebo, B.M. (1996).** Identification and characterization of a gene cluster involved in manganese oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *J. Bacteriol.* **178**: 3517-3530.

**Vares, T., Niemenmaa, O. y Hatakka, A. (1994).** Secretion of ligninolytic enzymes and mineralization of C<sup>14</sup>-ring-labelled synthetic lignin by three *Phlebia tremellosa* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 569-575.

**Wahleithner, J., Xu, F., Brown, K., Brown, S., Golightly, E., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A. y Schneider, P. (1996).** The identification and characterization of four laccase genes from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Cur. Genet.* **29**: 395-403.

**Wang, Y.X., Vazquez-Duhalt, R. y Pickard, M.A. (2003).** Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Can. J. Microbiol.* **49**: 675-682.

**Waterman, S.R., Hachan, N., Panepinto, J., Hug, S. y Williamson, P.R. (2007).** Cell walls targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mycell. *Infect. Immun.* **75**: 714-722.

**Wells, A., Teria, M. y Eve, T. (2006).** Green oxidations with laccase–mediator systems. *Biochem. Soc. T.* **34**: 304-308.

**Wesenberg, D., Kyriakides, I. y Agathos, S.N. (2003).** White-rot- fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* **22**: 161-187.

**Witayakran, S., Zettili, A. y Ragauskas, A.J. (2007).** Laccase-generated quinones in naphthoquinone synthesis via Diels-Alder reaction. *Tetrahedron Lett.* **48**: 2983-2987.

**Witayakran, S. y Ragauskas, A.J. (2009).** Modification of high lignin softwood kraft pulp with laccase and amino acids. *Enzyme Microbiol. Tech.* **44**: 176-181.

**Wong, D.W.S. (2009).** Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **157**: 174-209.

**Wong, Y.X. y Yu, J. (1999).** Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* **33**: 3512-3520.

**Wood, D.A. (1980).** Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **117**: 327-338.

---

**Xiao, Y.Z., Hong, Y.Z., Li J.F., Hang, J., Tong, P.G., Fang, W. y Zhou, C.Z. (2006).** Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 493-501.

**Xu, F. (1996).** Oxidation of phenols, anilines, and benzenthols by fungal laccase: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochem.* **35**: 7608-7614.

**Xu, F., Berka, R.M., Wahleithner, J.A., Nelson, B.A., Shuster, J.R., Brown, S.H., Palmer, A.E., y Solomon, E.I. (1998).** Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem. J.* **334**: 63–70.

**Xu, F., Kulys, J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.J.W., Abbate, E., Galinyte, V. y Schneider, P. (2000).** Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hidroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2052- 2056.

**Xu, F. (1999).** Laccases. En: Flickinger, M.C. y Drew, S.W. Eds. *The Encyclopedia of Bioprocessing Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation.* Wiley, New York.

---

**Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. y Varfolomeyev, S.D. (1994).** Laccase: properties, catalytic mechanism and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **49**: 257-280.

**Yaver, D.S. y Golightly, E.J. (1996).** Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene* **181**: 95-102.

**Yaver, D.S., Overjero, M.D., Xu, F., Nelson, B.A., Brown, K.M., Halkier, T., Bernauer, S., Brown, S.H. y Kauppinen, S. (1999).** Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase *lcc I*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4943-4948.

**Yoshida, H. (1983).** Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the chemical society of Tokio. J. Chem. Soc. **43**:472-486.

---

## Z

**Zadrazil, F., Gonser, A. y Lang, E. (1999).** Influence of incubation temperature on the secretion of extracellular lignolytic enzymes of *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* into soil. Proc. Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications. Granada, Spain.

**Zhu, X. y Williamson, P.R. (2004).** Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. FEMS. Yeast Res. **5**: 1-10.

**Zille, A., Ramalho, P., Tzanov, T., Millward, Roy., Aires, V., Cardoso, M.H., Ramalho, M.T., Guebitz, G.M. y Cavaco-Paulo, A. (2004).** Predicting dye biodegradation from redox potentials. Biotechnol. Progress **20**: 1588-1592.

**Zollinger, H. (2002).** Colour chemistry, synthesis properties and application of organic dyes and pigments. VCH Publisher, New York. USA.

## **II. OBJETIVOS**



A partir del conocimiento actual de la lacasa de *Phanerochaete flavid-alba* y por su interés básico y su potencial aplicación biotecnológica, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Analizar la regulación de la expresión del gen de la lacasa de *Phanerochaete flavid-alba* por compuestos aromáticos.
2. Definir la utilidad de inhibidores de las histonas desacetilasas como inductores de la producción de lacasas en hongos.
3. Facilitar la producción de la lacasa de *P. flavid-alba* mediante la expresión heteróloga del gen en *Aspergillus niger*.
4. Purificación y caracterización de la proteína recombinante.
5. Comparación de las lacasas nativa y recombinante en propiedades cinéticas y aplicadas a la decoloración de tintes textiles.
6. Modificaciones estructurales de los tintes textiles oxidados por las formas nativa y recombinante de la lacasa de *P. flavid-alba*

## **II. OBJECTIFS**

À partir des connaissances de la lacase de *Phanerochaete flavid-alba* et de son intérêt dans les applications biotechnologiques, ce travail présente les suivants objectifs:

1. Analyser la régulation de l'expression du gène codant pour la lacase de *Phanerochaete flavid-alba*.
2. Définir l'utilité des inhibiteurs des histonas desacetylases comme inducteurs de la production de la lacase des champignons.

3. Clonage et production de la laccase de *P.flavido-alba* par expression heterologue chez *Aspergillus niger*.
4. Purification et caractérisation de la protéine recombinante.
5. Comparaison des propriétés cinétiques et application de la laccase de *P.flavido-alba* à la décoloration de colorants textiles.
6. Etude des modifications structurelles des colorants textiles oxydés par les laccases native et recombinante de *P.flavido-alba*.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



### III. 1. Microorganismos

#### III. 1. 1. Cepas fúngicas

En este trabajo se ha utilizado el hongo basidiomiceto de la podredumbre blanca de la madera *P. flavido alba* FPL106507, cepa cedida por la colección de cultivos de hongos del Laboratorio de Productos Forestales de Madison, WI, USA.

Para estudios de la regulación de la expresión de la lacasa se ha utilizado también el hongo basidiomiceto *T. versicolor* A-136 de la colección de cultivos de hongos del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) CSIC, Madrid.

Para los estudios de expresión de la lacasa recombinante se ha utilizado el hongo ascomiceto *A. niger* D-15 # 26 (Gordon y col., 2000). Se trata de una cepa deficiente en proteasas extracelulares muy útil para expresión de proteínas heterólogas extracelulares.

#### III. 1. 2. Cepas bacterianas

Se ha utilizado la cepa de *E. coli* XL1-Blue, Genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]. Células ultracompetentes con una eficiencia de transformación superior a 10<sup>8</sup> transformantes por μg de ADN y permite la selección de clones recombinantes mediante la detección de actividad β- galactosidasa.

### III. 2. Vectores plasmídicos

Los vectores utilizados en el presente trabajo fueron:

- **pAN52-4** (GenBank Z32750): vector de expresión (5.721pb) en *A. niger*. La expresión en *A. niger* es dirigida por el promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans* (*PgpdA*) y por el terminador transcripcional *trpC*. El plásmido pAN52-4 permite la secreción de la proteína heteróloga porque es portador de la secuencia señal del gen de la glucoamilasa de *A. niger*.
- **pGEM-T** (Promega): vector de clonación directa de productos de PCR. Lleva incorporado un marcador de resistencia a ampicilina, así como el gen que

codifica la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, que permite la identificación de clones recombinantes.

- **pAB4-1**: vector de transformación que contiene el marcador de selección *pyrG* (van Hartingsveldt y col., 1987).

### III. 3. Medios de cultivo y soluciones

#### III. 3. 1. Medios de cultivo para *P. flavido-alba*

##### III. 3. 1. 1. Medio de mantenimiento

El hongo se mantuvo a 4° C sobre el medio YMPG (extracto de levadura, extracto de malta, peptona y glucosa) (Bonnarme y Jeffries, 1990).

**Tabla 4.** Medio YMPG.

Composición por litro:

<b>Componentes</b>	<b>(g)</b>
Glucosa	10
Extracto de levadura	2
Extracto de malta	10
Peptona	2
L-asparragina	1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20
Agar	8

Se ajustó el pH a 4.5 con ácido clorhídrico, se esterilizó en autoclave a 115° C durante 30 minutos y se mantuvo en sobrefusión a 50° C, finalmente se añadió tiamina esterilizada por filtración (0.22  $\mu$ m, Millipore®) a una concentración final de 1 mg. l<sup>-1</sup>.

##### III. 3. 1. 2. Medio basal: MB

Se ha utilizado el medio descrito por Kirk y col., (1986) para la inducción de la actividad ligninolítica en *P. chrysosporium*. En el texto que sigue se refiere como MB.

Para su elaboración se prepararon por separado tres soluciones: una solución de elementos traza, una solución de nutrientes orgánicos e inorgánicos y una solución de tiamina. La solución de elementos traza se preparó tras disolver ácido nítrico acético (1.5 % p/v) en 100 ml de agua y ajustar el pH a 6.5 con KOH saturada. Los minerales se incorporaron en el siguiente orden y cantidad:

**Tabla 5.** Composición de la solución de elementos traza del medio de cultivo MB.

Composición por litro:

<b>Componentes</b>	<b>(g)</b>
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	3
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0.50
NaCl	1
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.10
CoSO <sub>4</sub>	0.10
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.10
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.10
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.01
AlK (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . 12H <sub>2</sub> O	0.01
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.01

Se completó el volumen a un litro y se esterilizó en autoclave a 115° C durante 30 minutos.

La mezcla de nutrientes orgánicos e inorgánicos se preparó en 730 ml de agua destilada, incorporando los siguientes nutrientes:

**Tabla 6.** Composición de nutrientes orgánicos del medio de cultivo MB.  
Composición por litro:

<b>Componentes</b>	<b>(g)</b>
Glucosa	10
KHPO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.50
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.10
Tartrato amónico	0.20
Tiamina hidrocloreuro	0.001
Alcohol veratrílico	0.42
Tween 20	0.50

Finalmente esta solución se añadió a 200 ml de tampón tartrato sódico (4.6 g) pH 4.5 y se esterilizó en autoclave (115° C durante 30 minutos).

La preparación del medio MB se llevó a cabo añadiendo a esta última solución 70 ml de elementos traza y 1ml de tiamina (1 mg. ml<sup>-1</sup>) esterilizada por filtración.

### III. 3. 1. 3. Medio basal para la producción de lacasa (BL)

Es una modificación del medio de cultivo MB, sin adición de alcohol veratrílico, Tween 20 ni sulfato de manganeso. La hemos denominado medio basal para la producción de lacasa o medio BL.

### III. 3. 1. 4. Medio para la inducción de la actividad lacasa

Para la inducción de la actividad lacasa se han realizado cultivos en medio BL a los que tras 72 horas de incubación se añadió vainillina (3 metoxi bencil alcohol) a concentración final de 1 mM (**Figura 10**) y SAHA (ácido suberánico hidroxámico o Vorinostar) a una concentración final de 100 µM (**Figura 11**).

### III. 3. 2. Medio de cultivo para *A. niger*

#### III.3.2.1. Medios generales

Medio de crecimiento para ascomicetos utilizado en forma líquida o sólida (añadiendo 8 g. l<sup>-1</sup> de agar).

**Tabla 7.** Medio de cultivo para ascomicetos.

Composición por litro:

<b>Componentes</b>	<b>(g)</b>
Glucosa	10
Casaminoácidos	2
Extracto de levadura	5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5

Se esterilizó en autoclave (115° C durante 30 minutos). Posteriormente, se añadieron las soluciones de sales con nitrógeno y los elementos traza a una concentración final 1X esterilizados por filtración.

**Tabla 8.** Solución de sales con nitrógeno (50X) para el medio de cultivo de ascomicetos.

Composición por litro:

<b>Componentes</b>	<b>(g)</b>
KCl	26.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	74.8
NaNO <sub>3</sub>	297.0

**Tabla 9.** Solución de elementos traza (1000X) para el medio de cultivo de ascomicetos.

Composición por litro:

<b>Componentes</b>	<b>(g)</b>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.0
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	5.0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5.0
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	1.69
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	1.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.5
EDTA Na <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	64.76

### III.3.2.2. Medios selectivos

Son medios que, debido a su formulación, solo permiten el crecimiento de cepas portadoras de alguna característica selectiva.

**Agar acetamida A:** una vez autoclavado, se añade la solución de elementos traza a una concentración de 0.5 X, una solución de sales sin nitrógeno a una concentración de 1X, acetamida 0.6 g. l<sup>-1</sup> y CsCl<sub>2</sub> a una concentración de 1.7 g. l<sup>-1</sup>

Solución stock de acetamida y CsCl<sub>2</sub>: se prepararon a una concentración 10X (6 g. l<sup>-1</sup> y 17 g. l<sup>-1</sup>, respectivamente) y se esterilizaron por filtración.

Componentes	(g)
Sacarosa	325
MgSO <sub>4</sub>	0.25
Agar	12

Solución de sales sin nitrógeno (50X)

Componentes	(g)
KCl	2.6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.5

Se ajustó el pH a 5.5 con KOH 5M

**III.3.2.3. Agar acetamida ABTS:** medio de selección de transformantes portadores del pAN52-4 y del gen codificante para la lacasa de *P. flavido-alba*.

Composición por litro.

Componentes	(g)
Glucosa	10
MgSO <sub>4</sub>	0.5
Agar	12

82

Una vez autoclavado y atemperado, se añaden, a una concentración final de 1X, las soluciones de elementos traza y de sales sin nitrógeno, la de acetamida (0.6 g. l<sup>-1</sup>) y la de ABTS esterilizada por filtración.

### III.3.3. Medios de cultivo para bacterias

#### III. 3. 3.1. Medio Luria- Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001)

Se utilizó como medio de cultivo para el crecimiento de *E. coli* tras el proceso de transformación.

**Tabla 10.** Medio de Luria-Bertrani.

Composición por litro:

<b>Componentes</b>	<b>(g)</b>
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agar (para medios de solido)	15

El medio líquido y sólido se esterilizaron en autoclave a 121° C durante 20 minutos.

### **III. 4. Cultivo de *P. flavido-alba***

#### **III. 4. 1. Obtención de inóculos**

Se obtuvieron cultivos sobre YMPG en placa sembrados con el micelio del hongo. Tras 7 días de incubación a 30° C, se recortaron cinco cuadrados de 1 cm. Con ellos se inocularon lotes de 100 ml de medio de cultivo basal BL dispuestos en matraces de 1000 ml. Tras nueve días de incubación en reposo a 30° C los cultivos se homogeneizaron en esterilidad con Waring Blender durante 10 segundos dos veces. La suspensión obtenida se usó como inóculo.

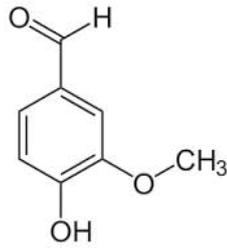
#### **III. 4. 2. Condiciones de cultivo**

Según la finalidad, los experimentos fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 250 ó 1000 ml de capacidad con 25 ó 300 ml respectivamente de medio de cultivo BL. Fueron tapados con tapones de caucho, e inoculados al 10% con el homogeneizado. Se mantuvieron en reposo a 30° C durante siete u once días.

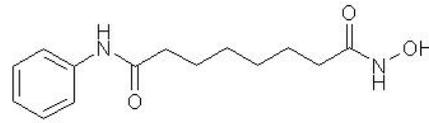
#### **III. 4. 3. Cultivos inducidos para estudios de regulación de la expresión de la lacasa**

##### **III. 4. 3. 1. Inducción por vainillina y ácido suberanilo hidroxámico (SAHA)**

Se prepararon cultivos en matraces de 250 ml con 25 ml de medio BL. Estos cultivos fueron inoculados como se describe en el apartado anterior e incubado a 30° C en reposo. A los tres días de incubación se adicionaron los inductores; un inductor fenólico monomérico (vainillina) (**Figura 10**) o un inhibidor de las histonas desacetilasas (ácido suberanilo hidroxámico) (**Figura 11**).



**Figura 10.** 3 metoxi bencil alcohol.



**Figura 11.** Ácido suberanilo hidroxámico.  
Vorinostat (SAHA).

La elección de la vainillina se basó en estudios previos sobre la oxidación de componentes fenólicos del alpechín por *P. flavido-alba* (Ben Hamman y col., 1999a y 1999b; Pérez y col., 1996; de la Rubia y col., 2002).

La vainillina y el SAHA se disolvieron en NN dimetilformamida: agua (3:7 v/v), se esterilizaron en autoclave y se adicionaron separadamente a una concentración final de 1mM para la vainillina y 100  $\mu$ M para el SAHA (cuatro réplicas por solución). Igualmente, se prepararon dos grupos de cultivos control (cultivos sin y con NN dimetilformamida).

84

Finalmente los cultivos se incubaron a 30° C durante otros tres días. El micelio de cada uno de los cultivos se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80° C hasta su uso.

### III. 5. Cultivo de *A. niger*

*A. niger* se mantuvo en forma de suspensiones de esporas, conservadas a 4° C hasta su uso. Para la obtención de estas suspensiones, se inocularon placas de medio Agar acetamida y se incubaron hasta que se observó la esporulación por ennegrecimiento de la superficie (4-5 días 30° C). La superficie de los cultivos esporulados se rascó con la ayuda de un escobillón de algodón y de solución salina (NaCl 9 g. l<sup>-1</sup>) Posteriormente, esta suspensión se filtró a través de tejido *Miracloth* para eliminar restos de medio de cultivo y micelio, y se cuantificó la concentración de esporas con la ayuda de una cámara de contaje Thoma-Zeiss.

Para la conservación a largo plazo, las suspensiones de esporas se congelaron a -80° C en una solución de glicerol 20 % (v/v).

*A. niger* se cultivó en el medio de crecimiento incubado a 30° C y en agitación a 300 rpm. Como inóculo se utilizó una suspensión con 10<sup>6</sup> esporas por ml.

### **III. 6. Purificación de lacasa de *P. flavido-alba***

#### **III. 6. 1. Ultrafiltración y diálisis**

Tras diez días de cultivo en BL con vainillina, se obtuvieron los fluidos extracelulares por filtración sobre papel. Estos fluidos extracelulares se congelaron a -20° C con objeto de precipitar el polisacárido extracelular. Los fluidos extracelulares descongelados y filtrados por tejido de entretela se concentraron de la siguiente manera: para volúmenes grandes, por filtración tangencial con membrana de 10 kDa (Minisette, Filtrón<sup>®</sup>) y para volúmenes menores, por centrifugación en Centriplus<sup>®</sup> 10 kDa, Centricon<sup>®</sup> 10kDa y Microcon<sup>®</sup> 3 kDa (Amicon). Los concentrados de cada paso de filtración fueron dializados a 4° C frente a tampón acetato sódico 10 mM a pH 5.0 durante cuatro horas.

#### **III. 6. 2. Cromatografías**

##### **III.6.2.1. Intercambio aniónico**

La cromatografía de intercambio aniónico se realizó en dos columnas. Los concentrados crudos procedentes de la filtración tangencial fueron purificados en una columna (9 x 1.6 cm) de resina Acell Plus QMA (Waters<sup>®</sup>) equilibrada con tampón acetato sódico 10 mM a pH 5.0. La elución de las proteínas se realizó con tampón acetato sódico 0.6 M pH 5.0. Las fracciones que presentaron actividad lacasa fueron reunidas, dializadas en el tampón de carga y concentradas en Centriplus<sup>®</sup>. Las fracciones concentradas fueron purificadas por FPLC en otra columna de intercambio aniónico Hi-Trap (Amersham Pharmacia). Se utilizaron los mismos tampones que sobre Acell. Las fracciones eluidas con actividad lacasa fueron reunidas, dializadas (frente a tampón acetato sódico 10 mM pH 5.0) y concentradas en Centricon<sup>®</sup>.

##### **III.6.2.2. Exclusión molecular**

Los concentrados procedentes de la purificación por intercambio aniónico se purificaron por FPLC en una columna de exclusión molecular (Superdex<sup>®</sup> HR 75, Pharmacia). Se recogieron las fracciones eluidas con tampón acetato sódico 0.2 M a

pH 5.0. Las que presentaron actividad lacasa fueron reunidas, dializadas (frente a tampón acetato sódico 10 mM pH 5.0) y concentradas en Centricon® y Microcon®.

### **III. 7. Determinaciones analíticas**

#### **III. 7. 1. Valoración de proteínas**

La cantidad de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando el reactivo y el procedimiento de Bio-Rad. El ensayo se basa en el cambio de absorbancia del colorante Coomassie Blue G-250 al unirse a las proteínas (de 465 a 595 nm). Los datos de absorbancia se extrapolaron a una curva patrón de albumina de suero de bovina (BSA) a una concentración de entre 5-100  $\mu\text{g. ml}^{-1}$ . Para la determinación de proteínas, la reacción colorimétrica se llevo a cabo añadiendo 200  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bio-Rad a 20  $\mu\text{l}$  de muestra diluida con agua destilada hasta un volumen de 800  $\mu\text{l}$ . Tras incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se realizo la medida espectrofotométrica de cada una de las muestras problema a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}$  de proteína por ml de muestra.

86

#### **III. 7. 2. Valoración de la actividad lacasa**

La actividad lacasa se determinó por la oxidación de ABTS 5 mM en tampón glicina 0.1 M, pH 5.0. Se determinó el incremento de absorción a 436 nm. La actividad lacasa se expresó como nanomoles del radical catiónico formado ( $\epsilon_{436}=29.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por ml de muestra por minuto (Niku-Paavola y col., 1988). La actividad específica se expresó en unidades internacionales por mg de peso seco de micelio o por mg de proteína. Una unidad internacional (U) de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para obtener 1  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto.

#### **III. 7. 3. Electroforesis**

La pureza de la actividad lacasa de los cultivos fúngicos y la separación de los perfiles de isoenzimas de dicha actividad por peso molecular se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La electroforesis se llevo a cabo en geles de poliacrilamida al 12 % según el método descrito por Laemmli (1970).

**Tabla 11.** Composición de los geles de acrilamida al 12%.

<b>Componentes</b>	<b>Gel concentrador</b>	<b>Gel separador</b>
Tampón concentrador	2.5 ml	-
Tampón separador	-	2.5 ml
Acrilamida	1 ml	3 ml
Agua bidestilada	6.4 ml	4.35 ml
SDS 10%	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
APS 10 %	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Los tampones correspondientes a cada tipo de gel se prepararon en Tris-HCl a diferentes pH y concentraciones para garantizar la movilidad de las proteínas en el gel concentrador y la posterior separación según la masa molecular en el gel separador. Así, el tampón concentrador se preparó en Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 y el tampón separador en Tris HCl 1.5 M a pH de 8.8.

**Tabla 12.** Composición del tampón de electroforesis de carrera para SDS.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
Tris HCl pH 8.3	25 mM
Glicina	190 mM
SDS	0.1% (w/v)

Las muestras, previamente dializadas mediante ultrafiltración, se sometieron a 100° C durante 5 min con tampón de muestra. Los pocillos del gel se cargaron con 20  $\mu$ l de la muestras (0.19 mg de proteína). La electroforesis se llevo a cabo en cubeta Mini-Protean a corriente 150 V durante una hora.

**Tabla 13.** Composición del tampón para hervir la muestra para SDS.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
Tris-HCl pH 8.5	1.45 g
Glicerol	20 ml
SDS	0.4 g
Azul de bromofenol	0.1 g
$\beta$ -mercaptoetanol	5% (v/v)

Para la determinación del peso molecular de las distintas isoenzimas, se utilizaron como patrones las siguientes proteínas de peso molecular conocido:

**Tabla 14.** Composición de los patrones de proteínas (Pharmacia) para SDS.

<b>Componentes</b>	<b>kDa</b>
$\beta$ -Galactosidasa	116
Fosforilasa b	97
Albumina bovina	66
Ovoalbúmina	45
Anhidrasa carbónica	30

Para la detección de las bandas de proteínas los geles se tiñeron utilizando la tinción de plata (Bio-Rad Silver Stain). Esta técnica está basada en el uso de nitrato de plata susceptible de unirse a proteínas en un pH ácido y la consecuente reducción de los iones de plata por formaldehído en un pH alcalino. Esta técnica tiene una sensibilidad 50 veces superior a la tinción clásica por azul de Coomassie, por lo que se utiliza cuando la cantidad de proteínas en la muestra es pequeña.

88

Para la tinción por plata se sumergió el gel en una solución de metanol 40 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) durante 30 minutos. A continuación se incubó en dicromato-potásico y ácido nítrico al 10% durante cinco minutos y se lavó tres veces durante cinco minutos con agua destilada. Posteriormente se incubó el gel en una solución de nitrato de plata al 10% (v/v) 3.2 % (p/v) durante 20 minutos. A continuación se lavó el gel con agua destilada durante un minuto. Para el revelado, se sumergió dicho gel en una solución de carbonato sódico y paraformaldehído al 10% (v/v). Para fijar las bandas de proteína se usó una solución de ácido acético al 5% (v/v).

### **III. 7. 4. Western blot e inmunodetección de la lacasa**

Primero, se requiere la transferencia de las proteínas, separadas por SDS-PAGE, a un soporte sólido tal como una membrana de nitrocelulosa. La membrana de nitrocelulosa fue colocada sobre el gel de poliacrilamida. Posteriormente ambos elementos fueron colocados entre papeles Whatman, esponjas y un soporte de plástico. Las proteínas fueron transferidas por electroforesis hacia el ánodo en tampón de transferencia.

Los sitios de unión no específicos de la membrana fueron bloqueados por TBS-T leche desnatada al 10 % durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario, lavado con TBS-T tres veces, e incubada con el anticuerpo secundario. Los anticuerpos de conejo empleados fueron diluidos en TBS-T leche. Después de tres lavados con tampón TBS la membrana se reveló con reactivo de detección ECL (Pharmacia).

Las proteínas purificadas se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa a 100 V a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después de tres lavados con tampón PBST, se incubó la membrana con la solución de leche desnatada y el segundo anticuerpo anti-inmunoglobulina G de conejo unido a peroxidasa (1:3000) durante dos horas a 37° C. Después de tres lavados con tampón PBST la membrana se reveló con reactivo de detección ECL (Pharmacia).

**Tabla 15.** Composición del tampón PBST para Western Blot.

<b>Componentes</b>	<b>(g)</b>
NaCl	8
KCl	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24
Tween 20	2 ml

Se ajustó el pH a 7.2 con HCl

### **III. 7. 5. Determinación del extremo amino terminal**

La determinación de la secuenciación de aminoácidos del extremo amino terminal se realizó sobre 5 µg de lacasa purificada mediante la degradación de Edman automatizada, utilizando un secuenciador de proteínas de pulso líquido (modelo 477A, Applied Biosystems) acoplado a un analizador de feniltiohidantoína (modelo 120A, Applied Biosystems). La concentración de enzima utilizada para analizar la secuencia N-terminal fue 1 nM.

### III. 8. Métodos de análisis de ácidos nucleicos

#### III. 8. 1. Aislamiento y cuantificación de ARN de *P. flavido-alba*

EL ARN se obtuvo del micelio congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  obtenido de cultivos en medio BL con vainillina. El ARN total fue extraído y purificado mediante RNeasy Plant mini kit (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante, que se describen brevemente:

- El micelio (100 mg) congelado en nitrógeno líquido se marceró hasta un polvo fino con mortero y pistilo previamente lavados con NaOH (0.1 M), EDTA (1 mM) y  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ARNasas.
- Se lisó el micelio con tampón de lisis: RLC/ $\beta$ -mercaptoetanol (450  $\mu\text{l}$  /5  $\mu\text{l}$ ), se mezcló, se homogenizó y filtró a través de una columna "QIashredder" para obtener el filtrado.
- El filtrado se mezcló con 350  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% y se homogenizó.
- El homogenizado se filtró a través de una minicolumna "RNeasy" mediante centrifugación 1 min a 11.000 x g para adherir el ARN a la membrana de sílica-gel de la columna.
- La membrana se lavó con tampón RW1 (500  $\mu\text{l}$ ) y luego con tampón RPE (500  $\mu\text{l}$  dos veces). En los dos lavados iniciales la minicolumna se centrifugó 11.000 x g, el último lavado se centrifugó 2 min a máxima velocidad. Una vez seca la membrana, el ARN se eluyó dos veces con 50  $\mu\text{l}$  de agua milli Q libre de ARNasas.

El ARN total se cuantificó por espectrofotometría a 260nm y 280nm. Para ello el eluato se diluyó 1:100 en agua DEPC (agua libre de ARNasas) y la concentración se calculó teniendo en cuenta que 40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  equivalen a una unidad de absorbancia a 260 nm. la relación entre la absorbancia obtenida a 260 y 280 nm nos permite estimar la pureza de la muestra, teniendo en cuenta que cuanto más cercana sea dicha relación al valor 2.0, más alta es la pureza de la muestra de ARN obtenida. Posteriormente, las muestras se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

La integridad de ARN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% seguida de tinción con bromuro de etidio. El ARN total se usó para la síntesis de ADN

### III. 8. 2. Síntesis del ADNc mediante transcripción inversa (RT)

Esta técnica se basa en la síntesis de una hebra de ADN complementario (ADNc) de cadena simple a partir del ARN mensajero (ARNm) (Sambrook y col., 1989). Para ello se usa transcriptasa inversa que sintetiza el ADNc a partir de los sitios determinados por cebadores específicos.

Se mezclaron de 100 a 500 ng de ARN total con 1  $\mu\text{l}$  de solución de p (dT)<sub>n</sub> de 10  $\mu\text{g.}\mu\text{l}^{-1}$  o con 1  $\mu\text{l}$  de solución de cebador específico de 2  $\mu\text{g.}\mu\text{l}^{-1}$ .

La mezcla se incubó durante diez minutos a 70° C para desnaturalizar el ARN e inmediatamente se enfrió a 4° C, proceso durante el cual se hibrida el cebador. En ese momento se añadió una mezcla de 4  $\mu\text{l}$  de tampón de ditiotreitól 100mM, 1  $\mu\text{l}$  de inhibidor de nucleasas de ARN, 1  $\mu\text{l}$  de desoxinucleótidos (10mM), 1  $\mu\text{l}$  de transcriptasa inversa SuperScript II (Stratagen) y la cantidad de agua DEPC necesaria para un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ .

Las muestras se centrifugaron mediante un pulso y se incubaron en el termociclador a 42° C durante una hora a 70° C durante 15 minutos para terminar la reacción y se enfriaron a 4° C. El ADNc así obtenido pudo ser utilizado inmediatamente o guardado a -20° C hasta su utilización.

91

---

### III. 8. 3. Determinación de la expresión de *pfaI* mediante PCR semicuantitativa (QPCR)

Las reacciones de PCR semicuantitativa se realizaron en un termociclador Mx 3000P® (Stratagene) utilizando la mezcla maestra SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EEUU). Esta mezcla incorpora, como su nombre indica, el colorante SYBR® Green que detecta ADN de doble hélice, por lo que no es necesario el uso de sondas específicas. Este compuesto se une al ADN intercalándose en la doble hélice, y genera una señal fluorescente cuando la muestra se excita por una fuente de luz, pudiéndose cuantificar a tiempo real la cantidad de ADN que se va amplificando en cada muestra en la reacción de PCR.

Las muestras se amplificaron por duplicado en placas de 96 pocillos para reacciones ópticas. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 25  $\mu\text{l}$  con los siguientes componentes:

**Tabla 16.** Reactivos para la reacción de QPCR.

Componentes	Volumen (μl)
Agua destilada	8.44
Master Mix	12.5
StrataScript RT/ARNse	0.06
<i>Primer</i> directo (5μM) *	1 (concentración final 400nM)
<i>Primer</i> inverso (5μM) *	1 (concentración final 400nM)
ADNc	3

La amplificación se realizó aplicando el siguiente protocolo: un ciclo inicial de 2 minutos a 50° C, diez minutos a 95° C seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95° C, un minuto a 95° C, 65° C durante 30 segundos y una etapa final de 99° C durante 30 segundos.

Los cebadores específicos utilizados fueron los siguientes:

Como normalizador se usó el gen constitutivo que codifica el ARNr 18S humano. Para su amplificación, se utilizaron los cebadores 18S-F (directo) y 18S-R (inverso).

En primer lugar, se construyó una curva patrón utilizando diluciones decimales de una muestra de concentración conocida para el gen problema, así como para el gen normalizador amplificado en la misma placa. Las curvas se obtenían representando los valores de  $C_t$  (ciclo *threshold* o ciclo umbral) frente al logaritmo de la cantidad de ADNc molde de cada dilución. El  $C_t$  es el primer ciclo de amplificación en el que la señal de fluorescencia es mayor que el nivel mínimo de detección, indicando que los productos de la PCR comienzan a ser detectables, es decir, es el ciclo en el que empieza a detectarse el amplicón. Los resultados se normalizaron con los niveles de  $C_t$  obtenidos para el gen constitutivo ADNr 18S.

Los niveles de expresión relativa del gen problema se calcularon usando el método-Delta-Delta (Livak y Schmittgen, 2001), que se resume en la siguiente expresión matemática:

$$\text{Niveles de expresión} = \frac{\text{Exp. gen/Exp.basal gen}}{\text{Exp.endógeno/Exp.basal endógeno}} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Donde:  $\Delta C_t = C_t (\text{diana}) - C_t (\text{referencia})$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_t (\text{calibrador})$$

El calibrador fue la muestra que se usó para comparar.

### III. 8. 4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR permite la amplificación “*in vitro*” de fragmentos concretos de ADN utilizando cebadores específicos. Dependiendo de la enzima usada y de la secuencia a amplificar se aplican diferentes protocolos que tienen en común la existencia de un número de ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación. Para amplificar la secuencia codificante de *pfal*, se ejecutó el siguiente protocolo.

Se realizó mezclando en un Eppendorf:

- 2µl de ADNc
- 10µl del tampón de ADN polimerasa 5x
- 1µl de la mezcla de desoxinucleótidos
- 2µl de la solución de cloruro de magnesio,
- 1µl de una solución de 10 mM de cada cebador
- 0.5 µl de ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II y completamos hasta 50 µl con agua Milli Q estéril.

Se aplicó un pulso en la centrífuga para mezclar los componentes de la reacción y se colocaron los tubos en un termociclador aplicándosele las siguientes condiciones sucesivas: desnaturalización a 98° C durante 30 segundos, 30 ciclos de amplificación cada uno de los cuales se desarrolló a 98° C durante cinco segundos, hibridación a 55° C durante diez segundos, extensión a 72° C durante un minuto, y elongación final a 72° C durante diez minutos.

Los productos obtenidos fueron usados inmediatamente o conservados a -20° C hasta su uso.

### III. 8. 5. Electroforesis en gel de agarosa

La separación y detección de los productos de PCR se llevo a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% preparado en tampón TAE y revelado con bromuro de etidio (0.5 µg. ml<sup>-1</sup>).

**Tabla 17.** Composición del tampón TAE para geles de agarosa.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
Tris-Base	40 mM
Ácido acético	20mM
EDTA	1mM

### **III. 8. 6. Purificación de ADN de geles de agarosa**

Una vez seleccionado el fragmento de ADN amplificado mediante PCR, se purificó mediante QIAquick Gel Extraction Kit. Este método se basa en la unión del ADN a una matriz de silicagel contenida en una pequeña columna en presencia de altas concentraciones de sal y su posterior elución a bajas concentraciones de la misma. Brevemente, se recortó el ADN del gel de agarosa, usando una cuchilla estéril y se introdujo en un tubo eppendorf de 1.5 ml. A continuación se añadieron tres volúmenes del tampón de solubilización QG (suministrado por la casa comercial) para fundir la agarosa calentando a 50 °C durante diez minutos.

Posteriormente se añadió un volumen de isopropanol y se añadió a la columna de purificación. Primero se centrifugó la columna a 10.000 x g durante un minuto para que el ADN se uniera a la columna. Se lavó con Tampón PE (suministrado por la casa comercial) y se centrifugó para eliminar los restos de etanol que pudieran quedar. Finalmente se eluyó el ADN con 30 ó 50 µl de agua milliQ.

### **III. 8. 7. Clonación de fragmentos de ADN**

La clonación consiste en la fusión del plásmido con el fragmento de ADN y su posterior transformación en *E.coli* competente. La ligación entre el fragmento de ADN y el vector se realizó usando una relación molar inserto: vector de 3:1 y la ADN ligasa del fago T4 (Promega). Se incubó a 4° C durante 12 h.

**Tabla 18.** Composición de la mezcla de reacción de ligación al vector de clonación.

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen</b>
Tampón de ligación 2X	5µl
Vector	1µl
Producto de PCR	3µl
ADN Ligasa de T4	1µl

### **III. 8. 8. Preparación de células de *E. coli* XL1-Blue electrocompetentes y transformación**

Las ligaciones fueron transformadas en células de *E.coli* electrocompetentes. Para ello, se crecieron en 5 ml de medio de cultivo LB con tetraciclina ( $10 \text{ mg.ml}^{-1}$ ). Tras 24 horas,  $300 \mu\text{l}$  de este cultivo se utilizaron como inóculo para 30 ml de medio fresco y se incubó a  $37^\circ \text{C}$  en agitación hasta que la densidad óptica a  $600 \text{ nm}$  fue de 0.6.

El cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a  $4^\circ \text{C}$ , y se recuperaron las células. Las células fueron resuspendidas en 30 ml de agua Milli Q estéril y fría. Se repitió la centrifugación y el lavado con agua, se resuspendieron en  $600 \mu\text{l}$  de glicerol (10%) estéril y frío y se centrifugaron nuevamente. Finalmente, las células se resuspendieron en  $100 \mu\text{l}$  de glicerol (10%) y se procedió a la transformación.

La transformación se llevó a cabo mediante electroporación. A las células electrocompetentes frías, se les añadió  $10 \mu\text{l}$  de la ligación y sometieron a un pulso eléctrico de  $2.500 \text{ V}$  a  $16\text{-}19 \text{ kV/cm}^2$ . Inmediatamente, se les añadió medio de cultivo LB y se incubaron a  $37^\circ \text{C}$  durante 1 hora en agitación.

Tras la incubación, se sembraron alícuotas de las células transformadas en placas Petri de medio LB con los antibióticos adecuados en cada caso (ampicilina,  $100 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) u otros compuestos químicos necesarios (IPTG, 0.1M; X-gal, 1%) para la selección y visualización de las colonias transformadas.

### **III. 8. 9. Preparación de ADN plasmídico**

Para la obtención del ADN plasmídico en el que se incluye el inserto objeto de estudio, se utilizó el kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega), siguiéndose el protocolo recomendado por el fabricante. Este método se basa en la unión del ADN a una matriz de sílicagel a altas concentraciones de sal y su elución a bajas concentraciones. Brevemente,  $1.5 \text{ ml}$  de cultivo bacteriano crecido durante una noche ( $10^9 \text{ UFC. ml}^{-1}$ ) se precipitó mediante centrifugación. Tras eliminar el medio de cultivo, se resuspendieron las células en  $200 \mu\text{l}$  de la solución de suspensión y se añadió  $200 \mu\text{l}$  de la solución de lisis. A este lisado, se añadió  $350 \mu\text{l}$  de la solución de neutralización y se centrifugó a  $13.000 \text{ rpm}$  durante diez minutos. El sobrenadante se añadió a la columna de purificación, se lavó con  $750 \mu\text{l}$  de la solución de lavado y se eluyó con  $50 \mu\text{l}$  de agua Milli Q.

### III. 8. 10. Digestión con endonucleasas de restricción

Las endonucleasas son enzimas que reconocen secuencias diana en el ADN al que se unen y digieren. Se emplearon endonucleasas de tipo II (*Hind*III y *Bss*H II de NEB Biolabs) para digerir ADN plasmídico. En general, se digirieron de 1-10  $\mu$ l de ADN plasmídico (250 ng) con 10-20 unidades de enzima en un volumen total de 20  $\mu$ l con el tampón apropiado (suministrado por la casa comercial). Esta reacción se incubó durante 1-2 horas a 37° C. La reacción se detuvo mediante choque térmico o extrayendo el ADN usando fenol: cloroformo. La digestión fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa.

### III. 8. 11. Secuenciación de ADN

La secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante el método de Sanger en el servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neira (CSIC, Granada), utilizando un secuenciador automático de Applied Biosystems modelo 373 STRECHT. Brevemente, 400 ng de ADN plasmídico se mezclaron con 6.4 picomoles del cebador correspondiente, se completaron hasta 12  $\mu$ l y se secuenciaron con el reactivo BigDye Terminator de Applied Biosystems, que utiliza en la reacción de extensión la enzima AmpliTaq ADN polimerasa y emplea dideoxinucleótidos marcados con cromóforos fluorescentes.

96

### III. 9. Preparación de protoplastos y cotransformación de *A. niger*

Para la obtención de protoplastos, se creció *A. niger* (apartado II.4.2.) y se separó el micelio del medio de cultivo por filtración a través de un filtro de tejido Miracloth, se lavó con NaCl 9 g. l<sup>-1</sup>, se secó al aire y se resuspendieron en 20 ml. g<sup>-1</sup> de micelio de buffer Myc wash (Tabla 11). A esta solución se le añadieron 40 mg de enzimas líticas por g de micelio y se incubó a 30° C, 80 rpm durante dos horas, hasta que la aparición de protoplastos fue visible al microscopio. En este momento, los protoplastos se separaron del resto de micelio por filtración a través de filtro *Miracloth* y se lavaron de nuevo con el buffer *Myc Wash*.

Tabla 19. Composición del buffer Myc Wash para la cotrasnformación.

Componentes	Concentración
Na Cl	600mM
CaCl <sub>2</sub>	270mM

Sobre la suspensión de protoplastos se añadió un volumen de STC, se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4° C. El precipitado se resuspendió de nuevo en un volumen de STC. Tras los lavados, el precipitado se resuspendió en 200 µl de STC y se mantuvo en frío hasta la transformación. A continuación se recoge la composición del tampón TSC.

Componentes	Concentración
Sorbitol	1.33M
CaCl <sub>2</sub>	0.05M
Tris-HCl pH 7.5	0.01M

La cotransformación se llevó a cabo una cotransformación utilizando el vector pAB4-1, y el vector pAN52-4 portador del gen de la lacasa.

Se añadieron 10 µg de cada uno de los plásmidos, previamente, sobre 200 µl de la solución de protoplastos. Se agitó suavemente y se añadieron 50 µl de tampón PEG (STC más 250 g. l<sup>-1</sup> de polietilenglicol 6000). Se volvió a agitar suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la incubación se añadieron 2 ml de tampón PEG, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se añadieron 4 ml de tampón STC. Tras este tratamiento, los protoplastos se extendieron sobre placas de medio acetamida A, se incubaron a 30° C hasta la aparición de colonias.

97

Después de la cotransformación, *A. niger* se cultivó a 30° C en placas de medio sólido selectivo mínimo (sin uridina) que contiene por litro:

Componentes	Concentración
NaNO <sub>3</sub>	70 mM
KCl	7 mM
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
Glucosa	1% (w/v)
Elementos traza	1ml
Agar	8g

Componentes	Concentración
ZnSO <sub>4</sub>	76 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	178 mM
MnCl <sub>2</sub>	25 mM
FeSO <sub>4</sub>	18 mM
CoCl <sub>2</sub>	7.1 mM
CuSO <sub>4</sub>	6.4 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	6.2 mM
EDTA	174 mM

Elementos traza 1000 X:

Para la selección de los transformantes productores de lacasa, el medio fue suplementado con 0.2 mM de 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazolidine-6-sulfónico (ABTS).

### III. 10. Caracterización de la enzima recombinante y comparación enzimática con la lacasa nativa

98

La comparación enzimática entre las lacasas nativa y recombinante puras se realizó cuantificando (por triplicado) en cada caso la oxidación de ABTS en diferentes condiciones. Además se compararon las constantes cinéticas para la oxidación de ABTS y 2,6 DMP y se caracterizó la oxidación de los colorantes textiles.

#### III. 10. 1. Producción de lacasa de *P. flavido-alba* por *A. niger*

Las colonias crecidas en medio acetamida A, se replicaron en placas de medio acetamida ABTS mediante agotamiento de asa y se incubaron en las mismas condiciones. Los criterios de selección de transformantes fueron el crecimiento sobre acetamida como única fuente de carbono y la formación de halos de color verde de las colonias, como consecuencia de la oxidación del ABTS por la lacasa. Se inocularon  $1 \times 10^6$  esporas en un matraz de 300 ml. El cultivo se controló durante 5 días en incubación a 30° C y agitándose a 200 rpm. El pH se ajustó a cinco con ácido cítrico 1M.

Componentes	Concentración
NaNO <sub>3</sub>	70 mM
KCl	7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
Glucosa	10% (w/v)
Elementos traza	1ml

### III. 10. 2. pH óptimo y estabilidad frente al pH y temperatura

- **pH óptimo:** se determinó la oxidación de ABTS a diferentes pHs por la enzima nativa y recombinante por triplicado. Para ello, se midió la actividad de la enzima purificada (5 mM) a 30° C sobre ABTS en tampón Britton y Robinson 100 mM en un rango de pH de 2-9 (ajustado con NaOH).

**Tabla 20.** Composición del tampón Britton y Robinson (1932).

Componentes	Concentración
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.04 M
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.04 M
CH <sub>3</sub> COOH	0.04 M

- **Estabilidad al pH y a la temperatura:** Para determinar la estabilidad al pH, la solución de lacasa en tampón Britton y Robinson 100 mM se mantuvo 24 horas a 30° C a diferentes pHs (ajustado con NaOH entre 2.0 y 9.0). Después se cuantificó la oxidación del ABTS (5mM) en el mismo tampón a pH 5.0.
- La determinación de la estabilidad a la temperatura se realizó en forma análoga, incubando una hora la solución de lacasa a diferentes temperaturas en el rango de 30 a 60° C.

### III. 10. 3. Estabilidad a disolventes orgánicos:

La tolerancia a disolventes orgánicos fue determinada incubando 12 µl de enzima en tampón glicina-HCl 0.25 M a 30° C durante 3 horas, en presencia de 10 y 50 % de cada uno de los siguientes disolventes orgánicos: acetona, acetonitrilo, etanol, metanol, dimetil formamida (DMF) y dimetil sulfóxido (DMSO).

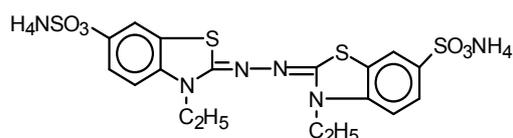
### III. 10. 4. Parámetros cinéticos $K_m$ y $V_{max}$

Los parámetros cinéticos se determinaron con 0.19 mg de enzima a 30° C y pH 3.0 en tampón glicina-HCl 0.25 M con tres sustratos: ABTS, 2,6-DMP y  $\text{FeSO}_4$  y a en un rango de concentraciones entre 0.575 y 11.5 mM. Los resultados se ajustaron a una hipérbola mediante regresión no lineal con el paquete informático Enzyme Kinetics, v.1.1 Macintosh, Trinity Software.

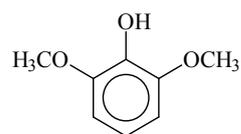
### III. 10. 5. Valoración de las actividades enzimática con distintos sustratos

La actividad enzimática se cuantificó según la unidad internacional ( $\mu\text{mol}$  de sustrato transformado por minuto). Las sustancias y coeficientes de extinción molar ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) utilizadas para la cuantificación espectrofotométrica de su oxidación por la lacasa fueron: ABTS ( $\epsilon_{456}=29300$ ); 2,6-dimetoxifenol ( $\epsilon_{468}=27500$ ). La estructura química de estos sustratos se representa en la **Figura 12**. Todas las determinaciones se llevaron a cabo a 30°C en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

100



2,2'-azino-bis(3-ethyl-6-sulfamoylbenzothiazole)  
(ABTS).



2,6 Dimetoxifenol  
(DMF)

**Figura 12:** Sustratos de la lacasa nativa y recombinante de *P. flavido-alba*.

### III. 10. 6. Efecto de los iones metálicos

Para determinar el efecto de los iones metálicos  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  (2mM) sobre la actividad lacasa, el ensayo se realizó en tampón acetato sódico 10 mM a pH 5, incubando la enzima (0.19 mg) a 30° C durante 24 horas. Alícuotas de

cada enzima (12  $\mu$ l) fueron transferidas a una mezcla de reacción estándar (138  $\mu$ l del tampón acetato sódico, 50  $\mu$ l de ABTS 93.5 mM).

### III. 10. 7. Efecto de los inhibidores

Se ensayaron varios inhibidores de lacasas descritos como azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ), EDTA (a concentraciones de 1, 5 y 10 mM), urea a 5M y SDS a 0.1 %. Cada inhibidor se disolvió en tampón acetato sódico 10 mM pH 5.0. A 12  $\mu$ l de solución enzimática se les añadieron 138  $\mu$ l de solución del inhibidor. Las mezclas se incubaron durante 15 minutos a 30° C. Se determinó la oxidación del ABTS en el momento de añadir el inhibidor y tras los 15 minutos de incubación.

### III. 11. Decoloración de colorantes textiles

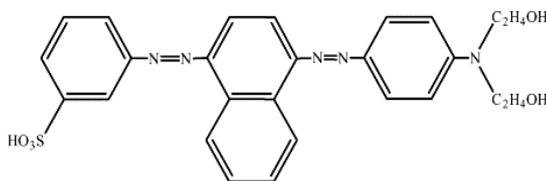
La decoloración de diferentes colorantes textiles: Remazol Brilliant Blue (RBBR, Anthraquinonic) y Acid Red 299 (NY1, diazo) por las lacasas nativa y recombinante de *P. flavido-alba*, se llevó a cabo en placas microtiter en un volumen de reacción de 200  $\mu$ l, la mezcla de reacción contenía 0.19 mg de proteína pura, 0.2 % (w/v) del colorante a ensayar, y tampón glicina-HCl pH 3.

Para evaluar la decoloración de los colorantes, se determinó la absorbancia a 590 nm para RBBR y a 520 nm para NY1 y fue calculada según Guo y col. (2008). La decoloración fue expresada en % con respecto al control sin enzima. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

101

#### III. 11.1. Colorantes textiles

El colorante textil diazo NY-1 ( $M_r = 519,16 \text{ g.mol}^{-1}$  **Figura 13**) fue obtenido de Yorkshire Europe (Tertre, Bélgica) y se ensayó 100  $\text{mg.l}^{-1}$ .



**Figura 13.** Estructura química del colorante NY-1 (ácido 3-(4-(4-(bis(2-hidroxietil) amino) fenildiazenil) naftalen-1-il) diazenil) benceno sulfónico.

### **III. 11. 2. Productos químicos y reactivos**

Se utilizó acetonitrilo y metanol (Scharlab, grado HPLC). El agua se obtuvo desde un sistema milli-Q (Synthesis A10). Las soluciones para HPLC se tamponaron con ácido fórmico al 0.1%. Cada muestra se filtró sobre filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  (celulosa).

Los productos de oxidación del tinte se separaron de los componentes del cultivo mediante extracción en fase sólida (SPE). Se utilizaron cartuchos C18 500mg. (Phenomenex) que se acondicionaron con metanol/agua. Se cargó un ml de muestra, se lavó tres veces con agua y se eluyeron los productos de oxidación del tinte con 3.0 ml de metanol.

Esta solución se concentró en rotavapor a 30° C y finalmente se añadió un ml de metanol, se filtró (0.45  $\mu\text{m}$ ) y se analizó por LC-MS.

### **III.12. Degradación del colorante textil NY1 por las lacasas nativa y recombinante**

#### **III. 12. 1. Preparación de las muestras**

200  $\mu\text{l}$  de una disolución de acetonitrilo: agua (50:50) con 0.1% de ácido fórmico se añadió a cada muestra para el análisis por HPLC.

#### **III. 12. 2. Análisis de los compuestos**

Se ha utilizado un cromatógrafo de líquidos (Alliance HT 2795. Waters) acoplado a un detector de Espectrometría de Masas ESI-TOF (LCT Premier Xe. Micromass technologies). La columna cromatográfica utilizado fue: Nova PaK C18 3.9mm X 150 mm. Tamaño de partícula de 4  $\mu\text{m}$ . La fase móvil (0.5 ml.min<sup>-1</sup>) fue para el Canal A: Agua con 0.1% de ácido fórmico y por el Canal B: Acetonitrilo con 0.1% de fórmico a un flujo de 0.5 ml.min<sup>-1</sup>.

El gradiente cromatográfico utilizado fue:

- Tiempo 0 min: 50% canal A y 50% canal B
- Tiempo 10 min: 0% canal A y 90% canal B
- Tiempo 20 min: 0% canal A y 90% canal B
- Tiempo 21 min: 50% canal A y 50% canal B

Condiciones del Espectrómetro de Masas: barrido de masas en modo negativo entre 100-700 uma.

### III.13. Referencias de Material y Métodos

**B**

---

**Ben Hamman, O., de la Rubia, T. y Martínez, J. (1999a).** The effect of manganese on the production of *Phanerochaete flavid-alba* ligninolytic peroxidases in nitrogen limited cultures. FEMS Microbiol. Lett. **177**: 137-142.

**Ben Hamman, O., de la Rubia, T. y Martínez, J. (1999b).** Decolorization of olive oil mill wastewaters by *Phanerochaete flavid-alba*. Environ. Toxicol. Chem. **18**: 2410-2415.

**Bonnarme, P. y Jeffries, T.W. (1990).** MnII regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 210-217.

**Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.

**Britton, H.T.K. y Robinson, R.A. (1932).** Universal buuffer solutions and the dissociation constant of veronal. J .Chem. Soc. 1456-1462.

103

---

**D**

---

**de la Rubia, T., Ruiz, E., Pérez, J. y Martínez, J. (2002).** Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavid-alba* induced by vanillin. Arch. Microbiol. **179**: 70-73.

**G**

---

**Gordon, C.L., Khalaj, V., Ram, A.F.J., Archer, D.B., Brookman, J.L., Trinci, A.P.J., Jeenes, D.J., Doonan, J.H., Wells, B., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J. y Robson, G.D. (2000).** Glucoamylase: fluorescent protein fusions to monitor secretion in *Aspergillus niger*. Microbiology **146**: 415-426.

Guo, M., Lu, F., Liu, M., Li, T., Pu, J., Wang, N., Liang, P. y Zhang, C. (2008). Purification of recombinant laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica* and its use for decolorization of anthraquinonic dye. *Biotechnol. Lett.* **30**: 2091-2096.

---

## K

Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E. y Farrel, R.L. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microbiol. Technol.* **8**: 27-32.

---

## L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* **25**: 402-408.

---

## N

Niku-Paavola, M.L., Karhunen, E., Salola, P. y Raunio, V. (1988). Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem. J.* **254**: 877-884.

---

## P

Pérez, J., Martínez, J. y de la Rubia, T. (1996). Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4263-4267.

Punt, P.J. y Van den Hondel, C.A. (1992). Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. *Methods Enzymol.* **216**: 447-457.

---

## S

Sambrock, J. y Russel, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

---

## V

van Hartingsveldt, W., Mattern, I.E., van Zeijl, C.M., Pouwels, P.H. y van den Hondel, C.A. (1987). Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. Mol. Gen. Genet. **206**: 71-81.



## **IV. Resultados**



Para aproximarnos a revelar la importancia de la lacasa producida por *P. flavido-alba*, hemos desarrollado dos estrategias; 1) definir particularidades de su regulación orientadas a aumentar la producción y, 2) desarrollar un sistema de expresión heteróloga. Finalmente hemos comparado las propiedades físico-químicas de las especies moleculares nativa y recombinante así como la capacidad de ambas enzimas para la decoloración y/o degradación de colorantes textiles de diferentes estructuras. Estos resultados demuestran que la enzima está inducida por sustratos aromáticos naturales como ocurre con otras lacasas fúngicas y como novedad que también su producción está regulada por inhibidores de histonas desacetilasas. La expresión heteróloga en *A. niger* aumentó 10 veces la actividad lacasa específica de los cultivos.

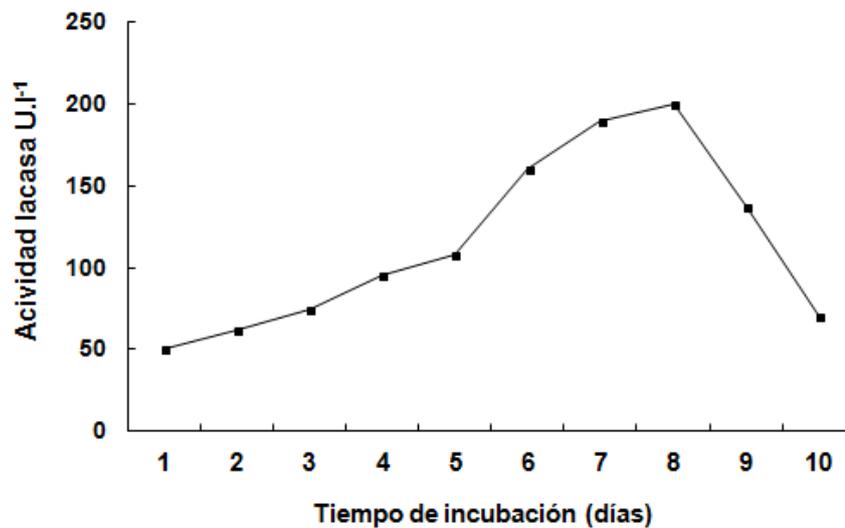
#### **IV.1. Inducción de la producción de la lacasa de *P. flavido-alba***

##### **IV.1.1. Inducción por sustratos aromáticos**

Con el fin de disponer de las herramientas adecuadas para estudios moleculares posteriores, el trabajo experimental de esta tesis doctoral se inició caracterizando aspectos básicos de la lacasa de *P. flavido-alba*. Para ello fue necesario utilizar cantidades relativamente grandes de enzima nativa. Para la producción y purificación de estas soluciones nos basamos en estudios previos (Rodríguez-Rincón y col., 2010). Como estrategia para aumentar el rendimiento de la producción utilizamos la inducción por vainillina en cultivos sobre el medio basal para la lacasa (BL), se purificó cromatográficamente, se comprobó la pureza del enzima y se identificó antigénicamente mediante SDS-PAGE y Western blot.

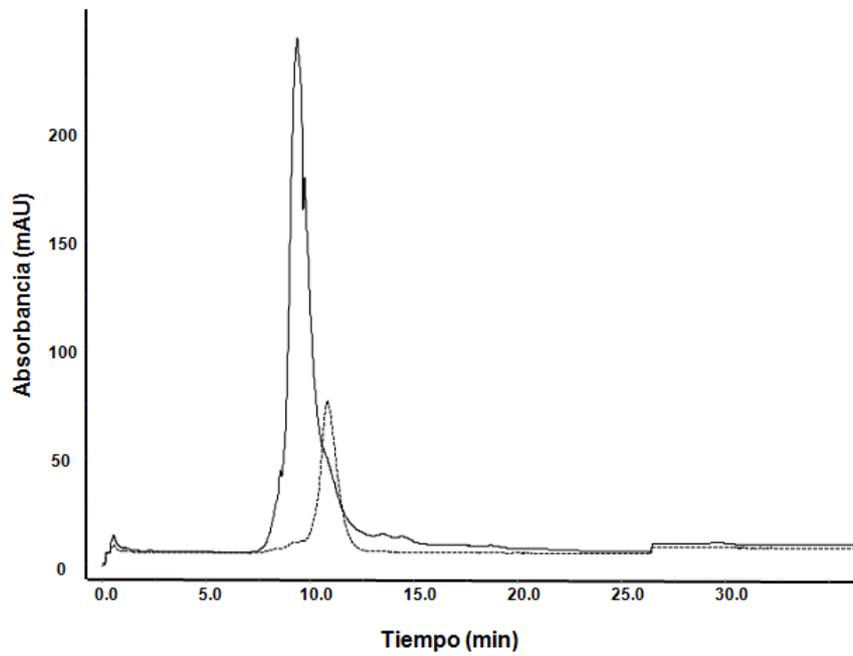
##### **IV.1.2. Producción y purificación de lacasa nativa en cultivos de *P. flavido-alba* añadidos de vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído)**

Para incrementar la producción de lacasa por *P. flavido-alba* se ensayó la vainillina y teniendo en cuenta que se trata de un compuesto de origen natural, su elección se basó en estudios previos sobre la oxidación de componentes fenólicos del alpechín por *P. flavido-alba* (Ben Hamman y col., 1999a y 1999b; Pérez y col., 1996; de la Rubia y col., 2002). La **Figura 14** muestra la producción de lacasa en cultivos de *P. flavido-alba* de diez días de incubación. La actividad lacasa aumentó rápidamente después de 4 días y gradualmente alcanzó un pico de 190 U.l<sup>-1</sup>. Finalmente la actividad disminuyó bruscamente después de 8 días.

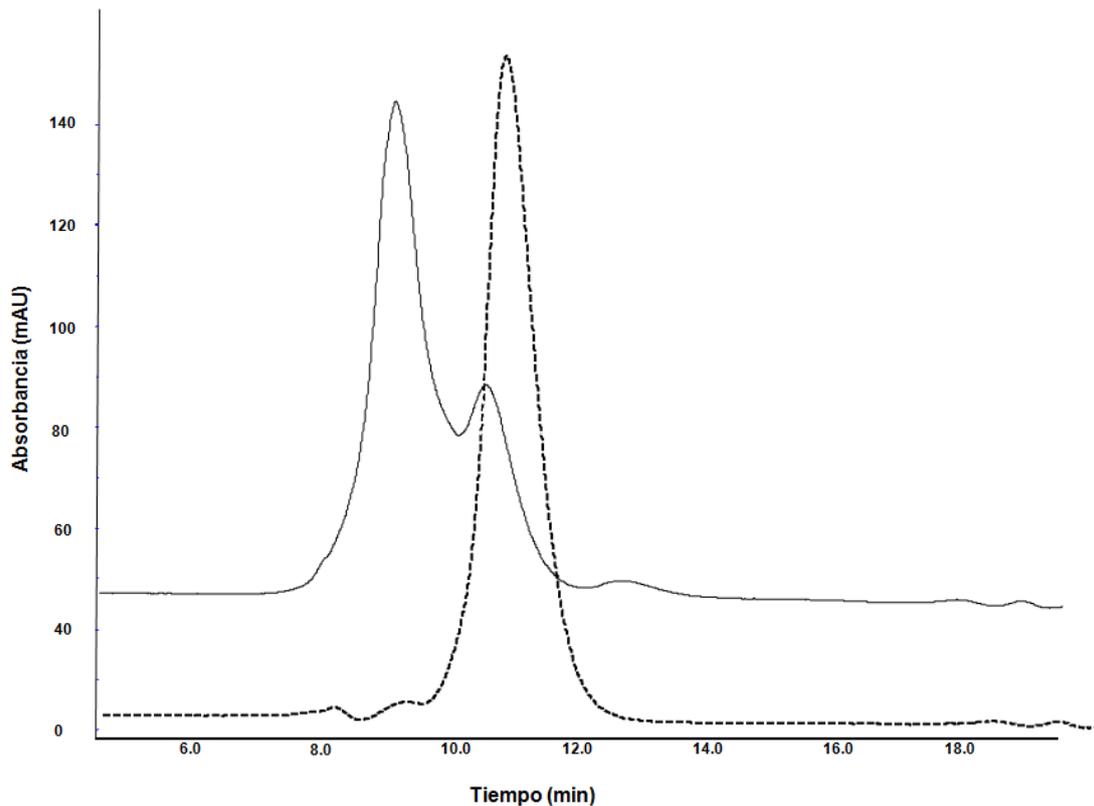


**Figura 14.** Acumulación de la actividad lacasa en los cultivos de 10 días de incubación (los resultados representan valores promedio y desviación estándar de tres repeticiones).

Los fluidos extracelulares se concentraron y purificaron primero por cromatografía de intercambio aniónico (**Figura 15**) y posteriormente por cromatografía de exclusión molecular (**Figura 16**).



**Figura 15.** Perfil cromatográfico de la columna de intercambio aniónico Hi-Trap (Amersham, Pharmacia) de la lacasa de *P. flavido-alba* crecido en medio BL suplementado con vainillina. Absorbancia a 280 nm (----) y a 405 nm (—).



**Figura 16.** Perfil cromatográfico de la columna Superosa 12 de exclusión molecular (Amersham, Pharmacia) de lacasa de *P. flavido-alba* crecido en medio BL suplementado con vainillina. Absorbancia a 280 nm (----) y a 405 nm (—).

La **Tabla 21** muestra el resumen de la purificación de la lacasa de *P. flavido-alba*.

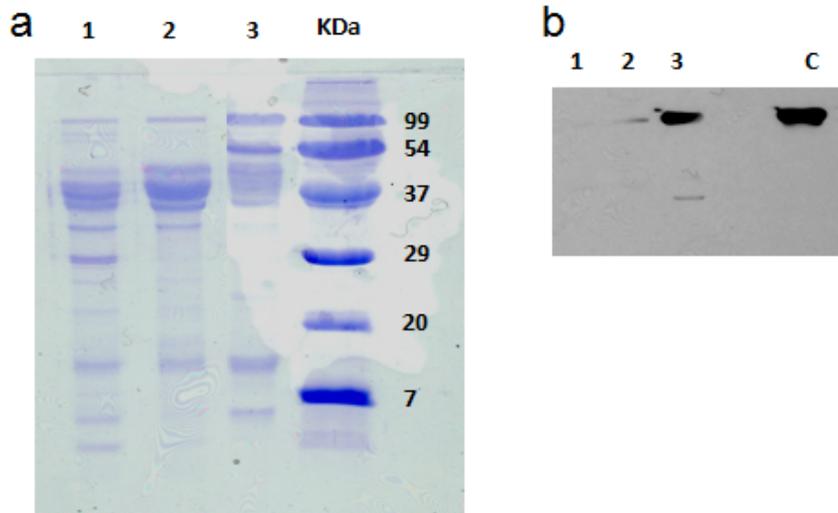
Seis litros de sobrenadante fueron concentrados con una recuperación de la actividad de 157.7%. Se llevo a cabo el primer paso de la cromatografía de intercambio aniónico con Acell, con una recuperación de 127.78 %, después se realizó los otros dos pasos de cromatografía (Hi-Trap y Superosa 12).

**Tabla 21.** Purificación de la lacasa PfaL. (U) unidad internacional de actividad.

Purificación	Volumen (ml)	Proteínas totales (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Grado de purificación	Rendimiento %
Crudo	6100	52.70	104.10	2.00	1	100
Concentrado	55.50	4.40	157.90	3.60	1.82	157.70
Centriplus	5.30	2.45	95.50	39	19.72	91.68
Acell	4.25	1.40	133	95	48.10	127.78
Centricón	0.40	1.56	226	145	73.40	217.10
Hi-Trap	13	0.70	103.50	147.70	74.80	99.39
Superosa 12	2	0.75	103.60	148	74.90	99.50

El efecto de la vainillina induciendo la producción de lacasa se demostró tras análisis de las soluciones purificadas mediante SDS-PAGE y Western-blotting. En los geles de SDS-PAGE, la proteína extracelular mayoritaria purificada mostró un tamaño de 97 kDa idéntico al descrito para la proteína no inducida (Pérez y col., 1996) (**Figura 17**).

Tras el Western-blotting usando anticuerpos policlonales de conejo demostramos la identidad inmunológica de las proteínas purificadas de los cultivos en presencia y en ausencia de las sustancias ensayadas como inductores, puesto que en los cultivos inducidos con vainillina solo se detectó reacción inmunológica con la proteína de 97 kDa (**Figura 17**).



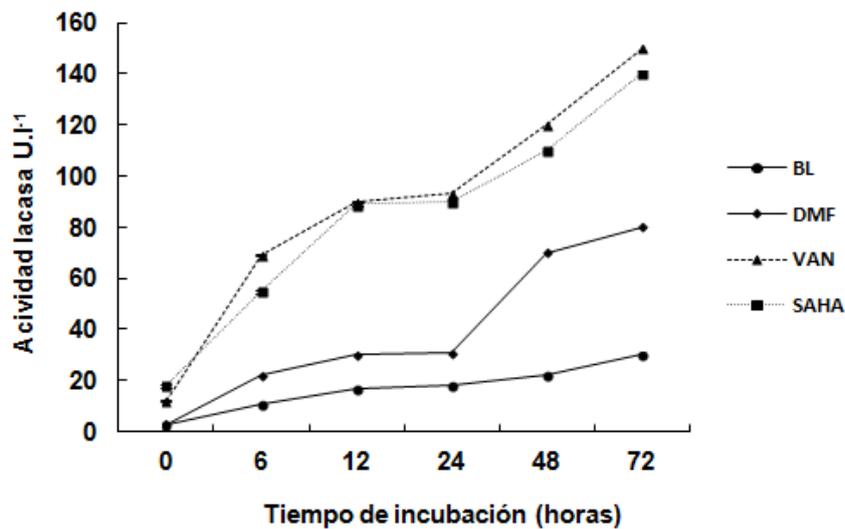
**Figura 17.** SDS-PAGE (a) de fluidos extracelulares de *P. flavido-alba*. Western blot (b), (1): control (cultivos sin inductor) (2): cultivos añadidos de NN-dimetil formamida, (3): cultivos añadidos de vainillina, (C): lacasa purificada de cultivos inducidos con vainillina.

#### IV.1.3. Inducción de la producción de la lacasa de *P. flavido-alba* por inhibidores de histona desacetilasas

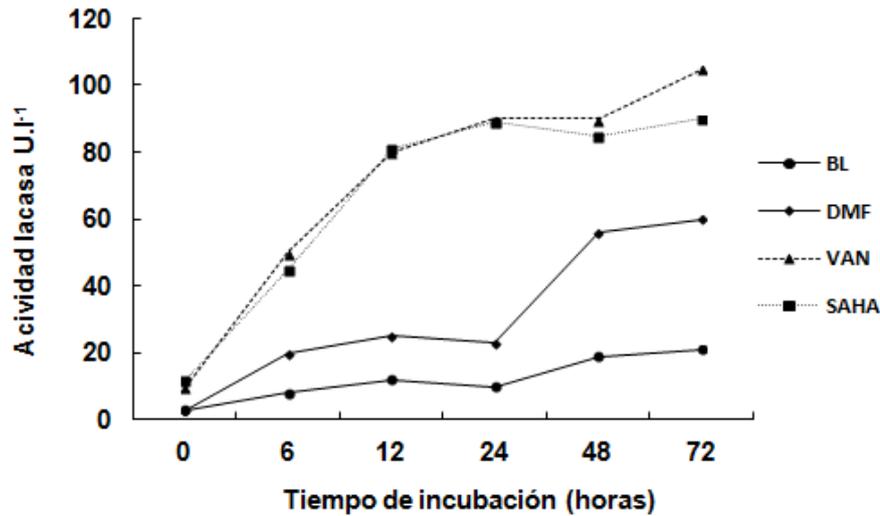
Dado el conocido papel regulador de la expresión genética de las histonas desacetilasas en los organismos eucariotas, y la ausencia relativa de estudios para conocer la posible utilidad de los inhibidores de estas enzimas para mejorar la producción de enzimas fúngicas de interés biotecnológico, hemos definido el efecto del ácido suberenilo hidroxámico (SAHA) sobre la inducción de la producción de lacasa en *P. flavido-alba*. El SAHA pertenece al grupo de los inhibidores de las histonas desacetilasas mejor conocido y para observar si la respuesta al SAHA pudiera ser particular de este hongo, se determinó al mismo tiempo el papel regulador sobre la producción de una de las lacasas de otro basidiomiceto: *Trametes versicolor*. Los experimentos incluyeron: 1) la determinación de los efectos sobre la actividad lacasa de los cultivos, 2) el análisis por SDS-PAGE de las proteínas extracelulares y 3) la cuantificación de la expresión del gen de la lacasa mediante PCR cuantitativa a tiempo real (QPCR). Los resultados demuestran por primera vez la inducción de la producción de lacasa por bajas concentraciones de inhibidores sintéticos de HDACs.

Para determinar el efecto del SAHA sobre la producción de la lacasa, se procedió en forma análoga a la descrita para la determinación de los efectos de la vainillina: los hongos fueron crecidos en medio basal (BL) durante 7 días a 30° C en reposo y añadidos al tercer día de SAHA. Con fines comparativos se añadieron cultivos inducidos con vainillina y cultivos añadidos de NN-dimetil formamida, el disolvente empleado para añadir estas sustancias a los cultivos

Tanto el SAHA como la vainillina proporcionaron un fuerte incremento en la producción de lacasa por los cultivos de *P. flavido-alba* alcanzando máximos de 150 U.l<sup>-1</sup> y 140 U.l<sup>-1</sup>) respectivamente. Resultados análogos se obtuvieron en los cultivos de *T. versicolor* aunque con menor actividad lacasa.



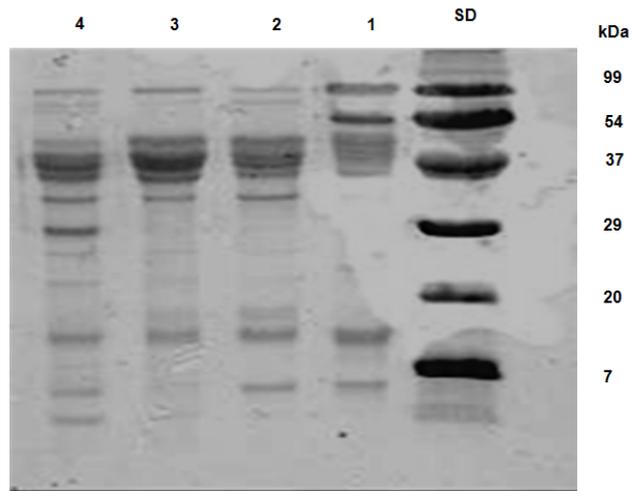
**Figura 18.** Actividad lacasa en cultivos de *P. flavido-alba* en medio basal (BL), y en medio basal añadidos de vainillina (VAN, 1mM), de SAHA (100  $\mu$ M) o de NN-dimetil formamida (DMF).



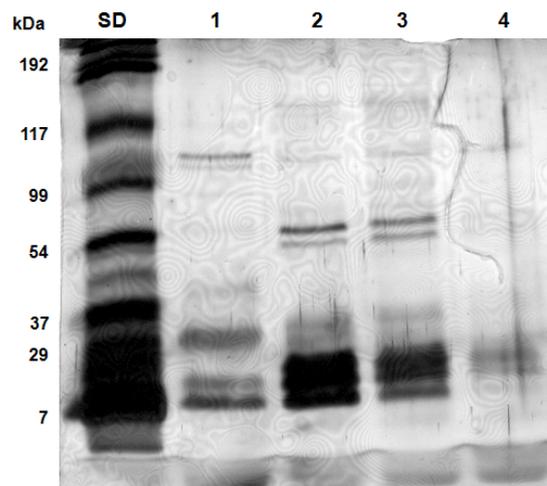
**Figura 19.** Actividad lacasa en cultivos de *T. versicolor* en medio basal (BL) y en medio basal añadidos de vainillina (VAN, 1mM), de SAHA (100  $\mu$ M) o de NN-dimetil formamida (DMF).

La estimación de la cantidad de lacasa por SDS-PAGE confirmó la mayor acumulación de esta proteína en los cultivos añadidos de SAHA en ambos hongos (**Figuras 20 y 21**). Las bandas de 97-99 kDa para *P. flavido-alba* y 54 kDa para *T. versicolor*.

Estos resultados describen por primera vez que el SAHA puede emplearse para aumentar la producción de lacasa en los dos hongos ensayados y por analogía, con otros posibles hongos productores de enzimas de interés biotecnológico. Como veremos a continuación el efecto de este inhibidor de HDACs sobre la producción de lacasa es consecuencia de su acción aumentando su expresión génica.



**Figura 20.** SDS-PAGE de los fluidos extracelulares de cultivos de 24 horas de *P. flavido-alba* cultivos añadidos de SAHA (1), cultivos añadidos de NN-dimetil formamida (2), cultivos añadidos de vainillina (3), control (cultivos sin inductor) (4).



**Figura 21.** SDS-PAGE de los fluidos extracelulares de cultivos de 24 horas de *T. versicolor*, cultivos añadidos de NN-dimetil formamida (1) cultivos añadidos de SAHA (2), cultivos añadidos de vainillina (3), control (cultivos sin inductor) (4).

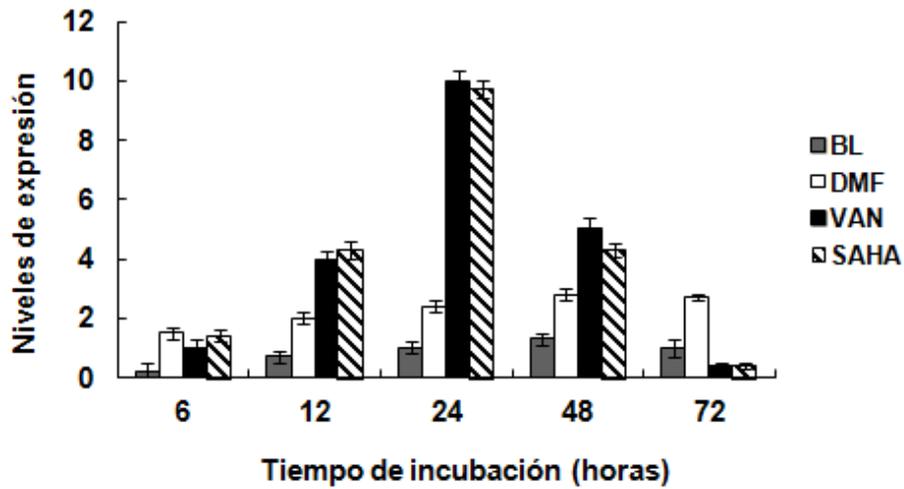
#### IV.1.4. Demostración del efecto inductor de vainillina y SAHA por cuantificación de la producción de ARNm

La confirmación directa de que el aumento de la producción de la lacasa por vainillina y por SAHA se debe a una inducción de la expresión génica de esta enzima, para ello, se cuantificaron los niveles de ARNm de la lacasa de ambos hongos mediante QPCR.

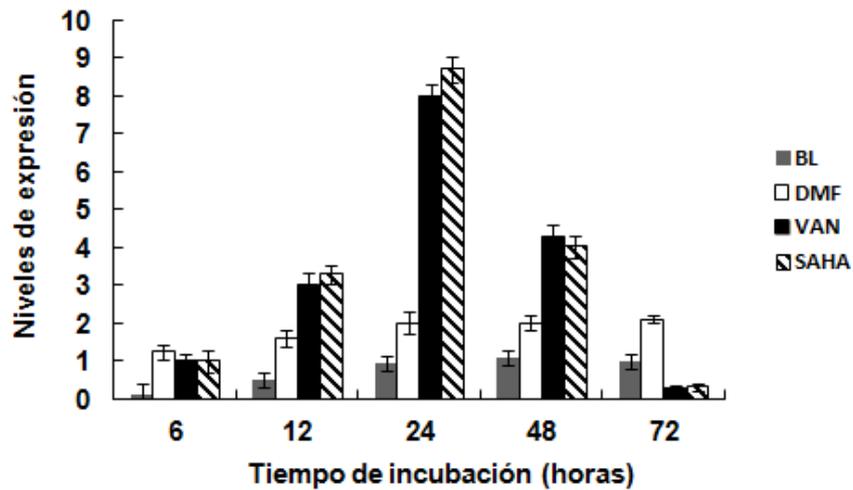
La cinética de la evolución del contenido en ARNm fue semejante durante las 72 horas tras la adición de los inductores en los cultivos de ambos hongos (**Figuras 22 y 23**). En ambos casos, la cantidad de ARNm fue máxima a las 24 horas de la adición de la vainillina o del SAHA y mínima a las 72 horas. Las cantidades de ARNm cuantificados en ambos hongos fue muy semejante para los cultivos en medio basal y en los cultivos añadidos del disolvente en el que se incorporan los inductores NN dimetil formamida.

Tomando estos resultados en conjunto, hemos demostrado que:

- a) El efecto de la vainillina incrementando la producción de la lacasa de *P. flavido-alba*, se debe a la inducción de la expresión del gen. Este aumento se produce también por un inhibidor de las HDACs.
- b) El efecto inductor de la producción de lacasa de *P. flavido-alba* por SAHA no es exclusiva de este hongo, abriendo la posibilidad de usar los inhibidores de HDACs para aumentar la producción de enzimas fúngicas de interés biotecnológico, sobre todo considerando las cantidades ínfimas de SAHA (100  $\mu$ M) que proporcionan un rendimiento semejante a concentraciones mil veces mayores de vainillina.



**Figura 22.** Niveles de expresión del gen *pfaL* a diferentes tiempos de incubación (6, 12, 24, 48 y 72 horas) en cultivos en medio basal (BL), en medio basal añadidos de NN-dimetil formamida (DMF), de vainillina (VAN) (1mM), y de SAHA (100  $\mu$ M).



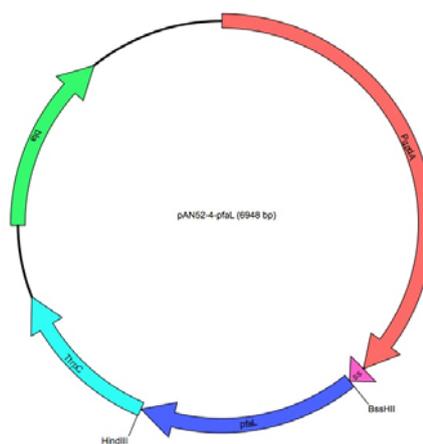
**Figura 23.** Niveles de expresión del gen *tvl* de *T. versicolor* a 6, 12, 24, 48 y 72 horas en cultivos en medio basal (BL), en medio basal añadidos de NN dimetilformamida (DMF), de vainillina (VAN 1mM), y de SAHA a 100  $\mu$ M.

## IV. 2. Expresión heteróloga del gen *pfaL* en *A. niger*

Este apartado describe la clonación y expresión de la secuencia codificante del gen *pfaL* así como la obtención de transformantes productores para la purificación de la lacasa (PfaLr) y su comparación con la nativa.

### IV. 2.1. Clonación de la secuencia codificante del gen *pfaL*

Para la expresión en *A. niger* se escogió el vector pAN52-4 que permite clonar en fase de lectura al péptido señal mediante las enzimas *Bss*HII y *Hind*III. Por ello, se diseñaron dos cebadores (AnigerPfalF, GCGCGCAGACACTGTCTCGCTTCCATCC; AnigerPfalR, AAGCTTCAGGCCGAGCATTGATCCAC) que incluían estas dianas (subrayadas) y se amplificó la secuencia con una ADN polimerasa que garantizara la fidelidad de la síntesis. El producto de PCR fue clonado en el vector de clonaje pGEM-T y enviado a secuenciar para comprobar la fidelidad del ADN amplificado. Una vez garantizada la calidad, se digirió con las enzimas *Bss*HII y *Hind*III, se purificó y se clonó en pAN52-4 (**Figura 24**).



**Figura 24.** Mapa del vector pAN52-4-pfaL indicando los puntos de corte y los elementos genéticos que porta. *PgpdA*, promotor; *ss*, secuencia señal; *pfaL*, gen de la lacasa; *trpC*, terminador transcripcional; *bla*, gen de la beta-lactamasa.

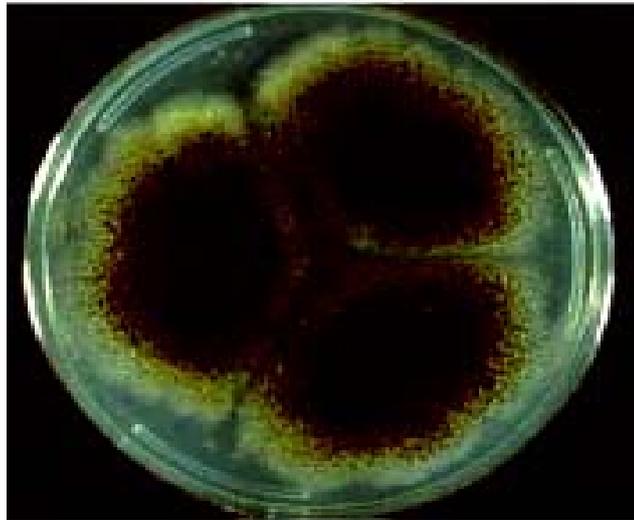
#### IV. 2.2. Obtención de transformantes

Al margen de las estrategias de estimulación de la producción de la lacasa nativa de *P. flavido-alba* que se han descrito en los apartados precedentes, hemos desarrollado con éxito un sistema heterólogo para la producción de la lacasa PfaL en *A. niger* similar al desarrollado para la producción de la lacasa de *P. cinnabarinus* (Record y col., 2002).

Básicamente consiste en la obtención de protoplastos de una cepa de *A. niger* deficiente en la secreción de diferentes tipos de proteasas (Mattern y col., 1992) y cotransformación con dos plásmidos, uno para la selección de transformantes (pAB4-1) y otro para la expresión de la secuencia codificante del gen *pfaL*.

El *screening* de transformantes se realizó en sucesivos aislamientos de las esporas en el medio selectivo (Agar acetamida ABTS) hasta obtener transformantes positivos para el marcador de selección (*pyrG*) y capaces de expresar la lacasa recombinante de *P. flavido-alba*. Esta enzima se detecta por la formación de halos verdes de oxidación del ABTS en medio Agar-ABTS (**Figura 25**). Así mismo se comprobó que los transformantes que solo contenían el pAB4-1 (con el marcador para la selección) carecían de actividad lacasa.

De todos los transformantes se seleccionaron los que producían los halos de oxidación más intensos. Posteriormente se evaluó la producción de lacasa en medio líquido por los transformantes seleccionados. El transformante que presentó mayor acumulación de actividad lacasa en los cultivos (2500 U.l<sup>-1</sup> **Figura 26**) después de 5 días, fue seleccionado para estudios posteriores, con la denominación transformante PfaLr.



**Figura 25.** Detección de transformantes de *A. niger* que expresan PfaLr (forman el halo verde de oxidación de ABTS) en Agar-ABTS.

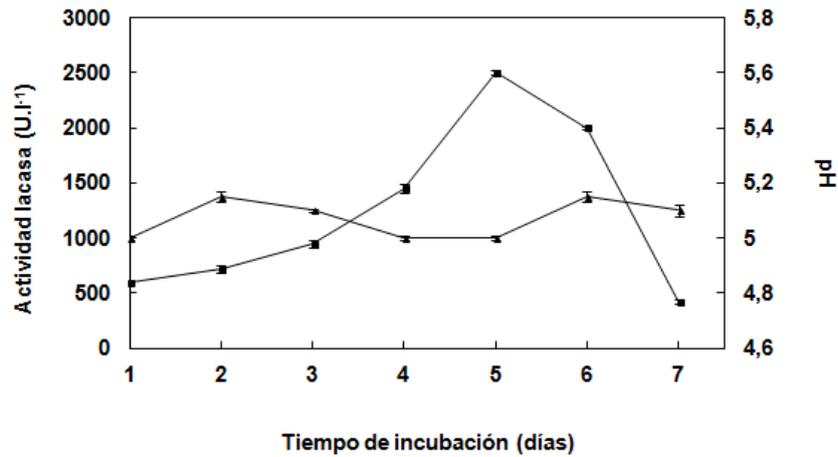
#### **IV.2.3. Producción y purificación de PfaLr**

122

En los cultivos en medio líquido, la actividad lacasa aumentó rápidamente después de 3 días de incubación a 30° C. Gradualmente alcanzó un pico de 2500 U.L<sup>-1</sup> (actividad específica 92.1 U.mg<sup>-1</sup>). Después del séptimo día, la actividad lacasa disminuyó bruscamente (**Figura 26**). Esta producción de lacasa es mucho mayor que la descrita para la producción de la lacasa nativa inducidos con vainillina (de 0.557 U.L<sup>-1</sup>, Pérez y col., 1998).

El pH de los cultivos fue mantenido alrededor de 5 para prevenir la degradación de la enzima. Aunque en general las lacasas fúngicas son estables a pH ácido, su actividad disminuye bruscamente cuando las condiciones son neutras como para la lacasa de *P. cinnabarinus* (Eggert y col., 1996).

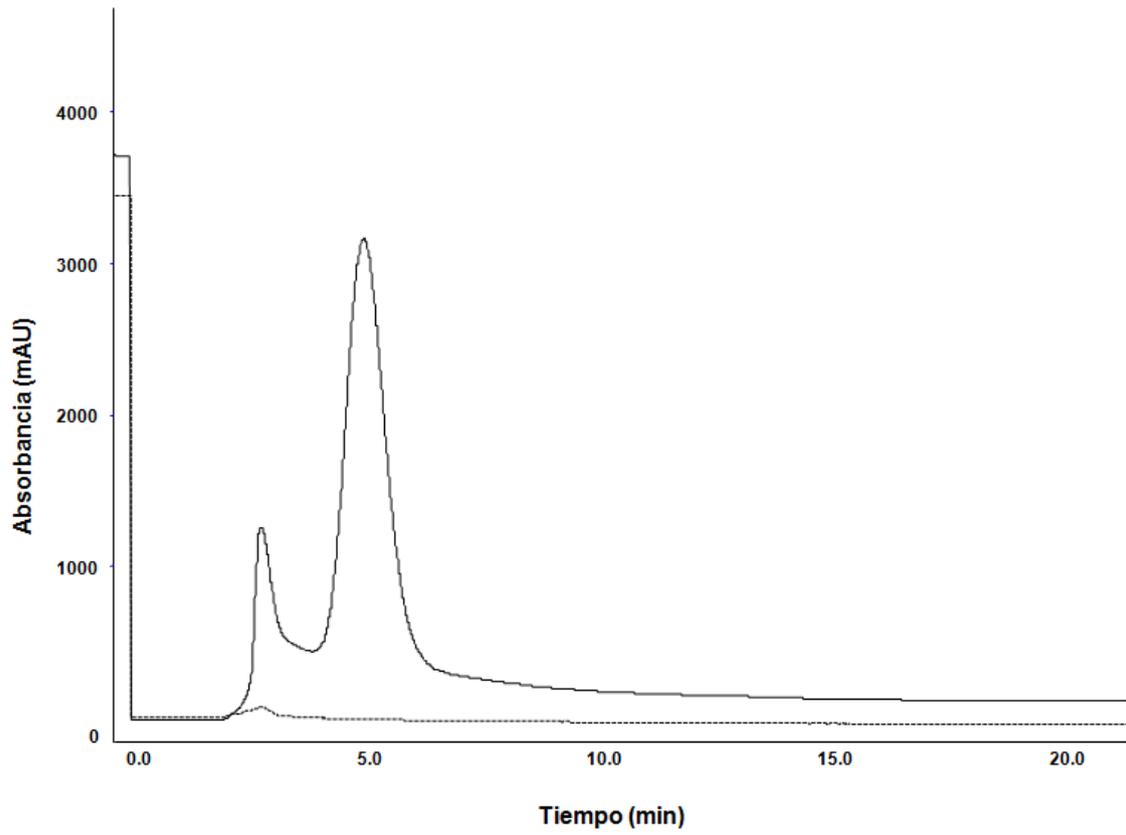
En relación a los parámetros medidos, se puede observar una ligera dependencia de la actividad lacasa en función del pH del medio, ya que aumenta conforme lo hace el pH y comienza a disminuir cuando los valores del pH están por debajo de cinco. Por esta razón el pH fue mantenido y controlado alrededor de cinco al objeto de prevenir su inactivación.



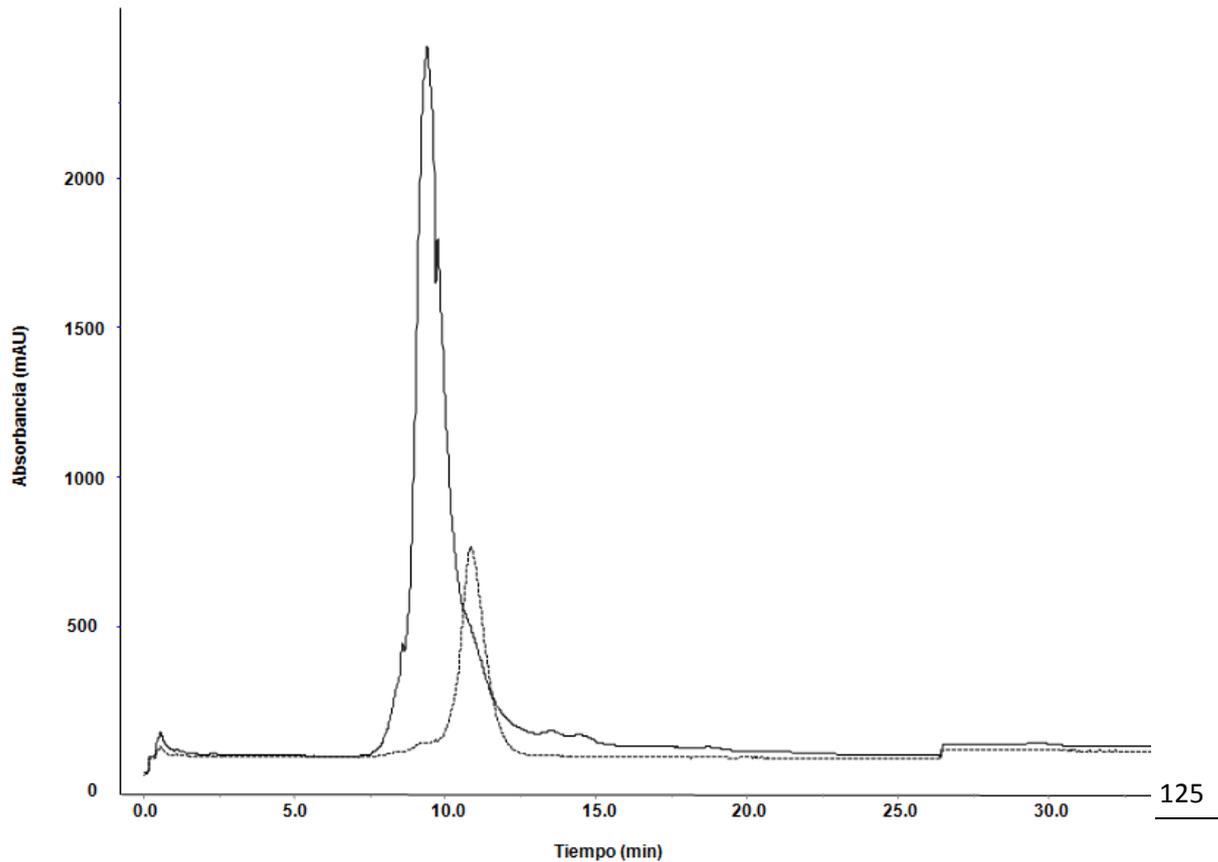
**Figura 26.** Cinética de acumulación de la actividad lacasa recombinante (■) en cultivos de *A. niger*. La actividad se determinó por (oxidación de ABTS). (▲) pH de los cultivos.

#### IV.2.4. Purificación de la lacasa recombinante

La lacasa recombinante (PfaLr) se purificó a partir de extractos crudos de cultivos de *A. niger* de 5-6 días, utilizando cromatografía de intercambio aniónico (columna Hi-Trap) seguida de cromatografía de exclusión molecular (Superosa 12) (**Figuras 27 y 28**).



**Figura 27.** Perfil cromatográfico obtenido en la columna de intercambio aniónico de las preparaciones crudas de PfaLr. Absorbancia a 280 nm (—) y a 450 nm (.....).



**Figura 28.** Perfil cromatográfico obtenido en la columna de exclusión molecular Superosa 12 de los sobrenadantes semipurificados de PfaLr. Absorbancia a 280 nm (—) y a 450 nm (····).

La **Tabla 22** muestra los distintos pasos de la purificación de la lacasa recombinante.

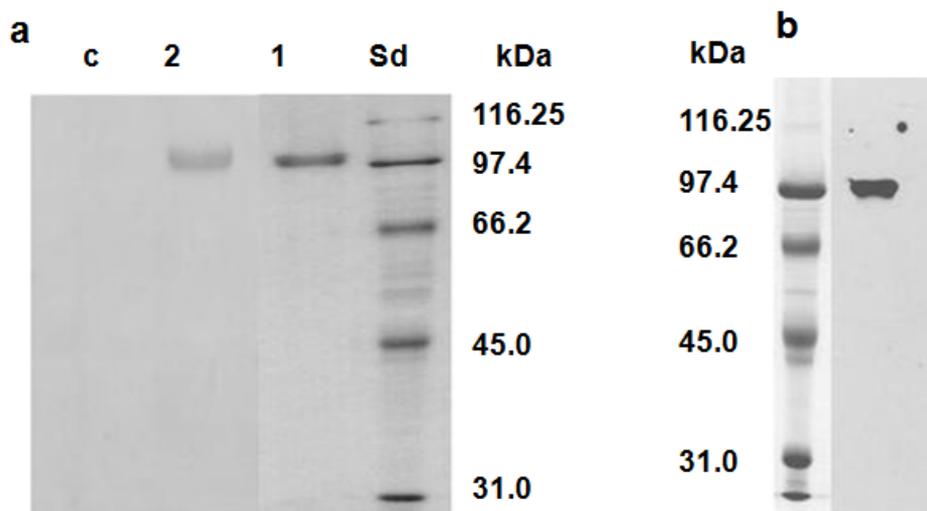
Un litro del sobrenadante de los cultivos fue concentrado 40.8 veces por ultrafiltración con una recuperación de 1890 U de actividad total y un rendimiento del 75.6%. Tras el primer paso de intercambio aniónico Hi-Trap se recuperó 973 U de actividad total y un rendimiento de 38.92 % en 19.7 mg de proteínas totales. La concentración y cromatografía de exclusión molecular proporcionó a PfaLr con una

actividad específica de 92.1 U.mg<sup>-1</sup>, mucho mayor que la conseguida para la lacasa nativa (Pérez y col., 1996).

**Tabla 22.** Purificación de la PfaLr producida por *A. niger*. IU unidad internacional de actividad.

Purificación	Volumen (ml)	Proteínas totales (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Rendimiento %	Grado de purificación
Cultivo filtrado	1000	320.5	2500	7.8	100	1
Ultrafiltración	6	106.7	1890	17.71	75.6	2
Hi-Trap	10	19.7	973	49.39	38.92	6
Superosa	2	3.8	350	92.1	14	12

La pureza de la PfaLr purificada se confirmó mediante SDS-PAGE y tinción de plata (**Figura 29a**). Su masa molecular fue de 97 KDa similar a la de la lacasa nativa. La figura muestra además el análisis de SDS-PAGE del medio de cultivo de *A. niger*. Este análisis mostró que PfaLr era la enzima mayoritaria secretada por la cepa transformada. El análisis por Western blot (**Figura 29b**) utilizando anticuerpos policlonales de conejo frente a la lacasa nativa de *P. flavido-alba* mostró una sola banda de hibridación, la correspondiente a la proteína de 97 kDa, lo que confirma las semejanzas entre la lacasa nativa y recombinante (Pérez y col., 1996).



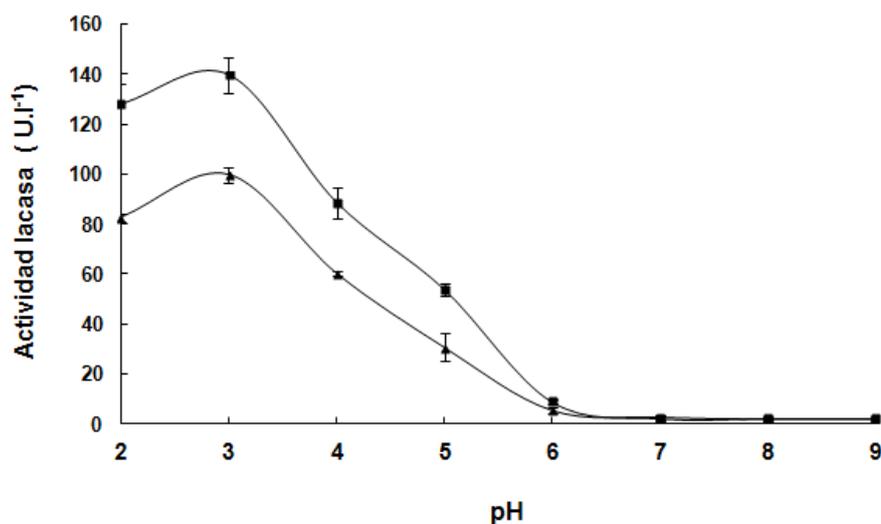
**Figura 29.** SDS-PAGE **(a)** de la PfaLr purificada y Western blot **(b)**. 1: PfaLr purificada; 2: concentrado del fluido extracelular de los cultivos de *A. niger* PfaLr (c) *A. niger* sin transformar.

#### IV. 2.5. Comparación de los enzimas nativo y recombinante

Para conocer las posibles diferencias entre la lacasa nativa y la recombinante se compararon las siguientes propiedades de ambas: pH óptimo, estabilidad frente al pH, a la temperatura, a la inactivación por disolventes orgánicos y sensibilidad a inhibidores. Los resultados se ofrecen a continuación.

##### IV.2.5.1. pH óptimo

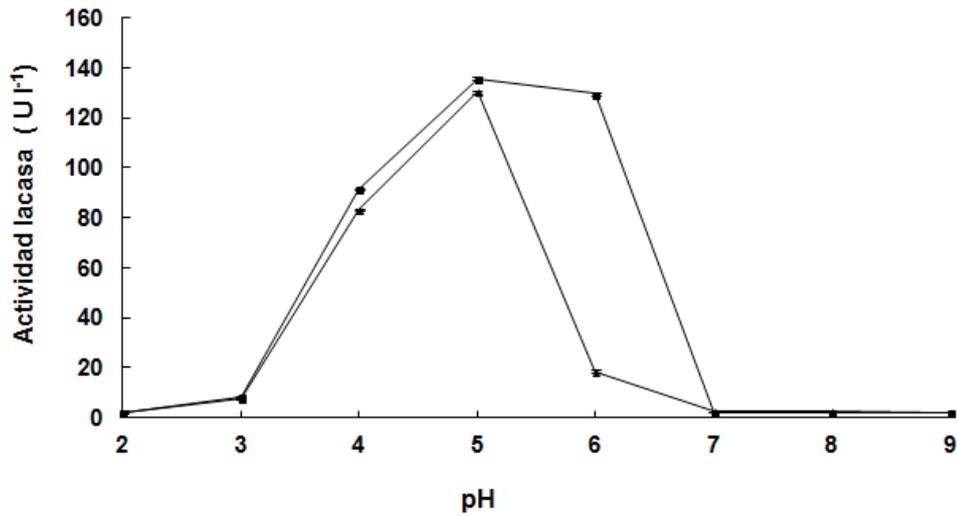
La sensibilidad al pH de la oxidación de ABTS por la lacasa nativa y por PfaLr fue muy semejante (**Figura 30**). El pH óptimo detectado fue de 3.0, muy similar también al de la lacasa nativa (Pérez y col., 1996).



**Figura 30.** Oxidación de ABTS a diferentes pHs por la lacasa nativa *de P. flavidoalba* (▲ ) y por PfaLr (■).

#### IV.2.5.2. Estabilidad frente al pH

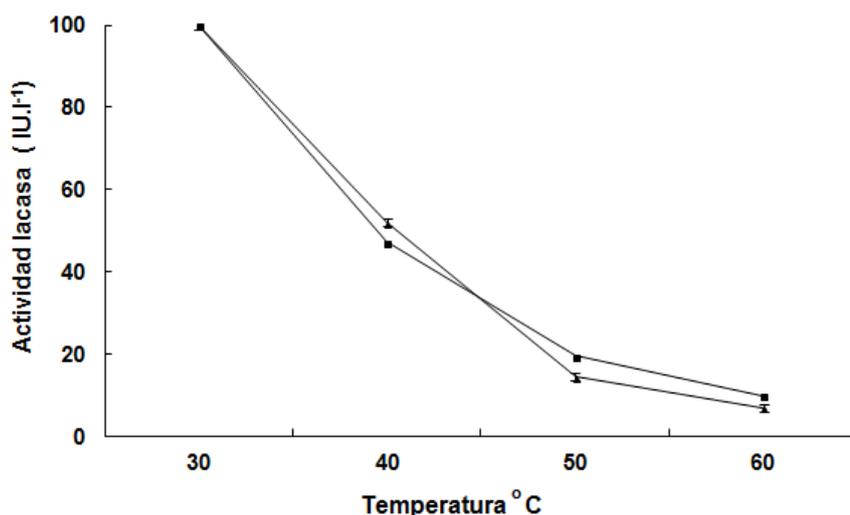
La estabilidad frente al pH se evaluó determinando la actividad enzimática residual de la lacasa recombinante y la nativa incubada 24 horas a 30° C a diferentes pH en el tampón Britton y Robinson 100 mM. Como se puede observar en la **Figura 31**, la lacasa recombinante retuvo mayor actividad enzimática en el rango de pH de 5.0-6.0.



**Figura 31.** Estabilidad enzimática frente al pH (durante 24 horas a 30° C) de la lacasa recombinante (PfaLr) (■) y la nativa (▲).

#### IV.2.5.3 Estabilidad frente a la temperatura

La termostabilidad fue determinada a pH 5.0 tras mantener el enzima durante 60 minutos entre 30° C y 60° C. La **Figura 32** demuestra que tanto la lacasa recombinante como la nativa fueron estables durante una hora a 30 ° C con una actividad lacasa de 100 U.l<sup>-1</sup>. Ambas enzimas disminuyeron su actividad cuando se incubaron a más temperatura 50 U.l<sup>-1</sup> a 40° C, y 10 U.l<sup>-1</sup> a 60° C (**Figura 32**).

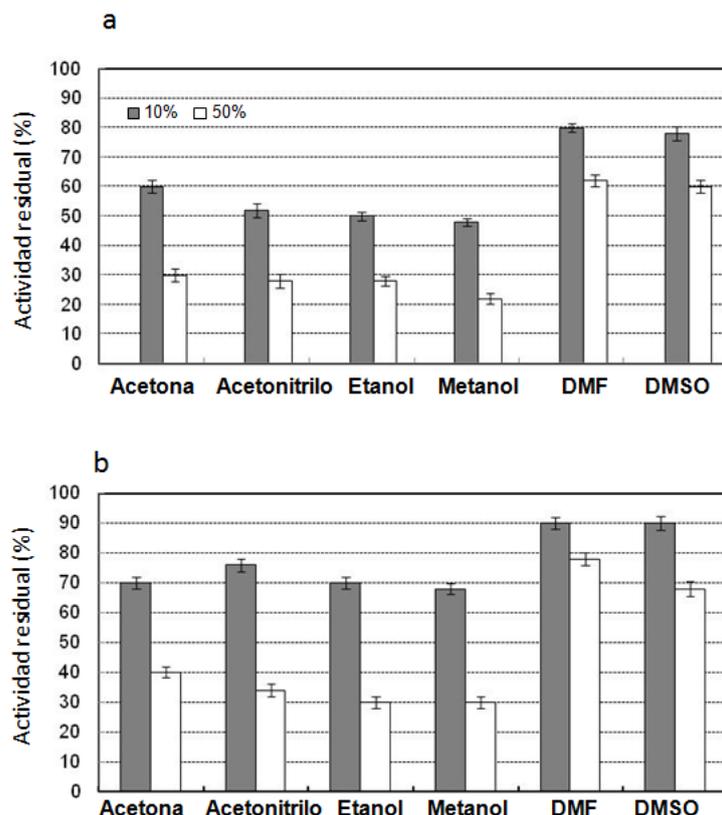


**Figura 32.** Actividad enzimática residual de soluciones de PfaLr (■) y de lacasa nativa (▲) mantenidas una hora a diferentes temperaturas.

#### IV.2.5.4. Estabilidad en disolventes orgánicos

Hemos determinado el efecto sobre la actividad enzimática de diferentes disolventes orgánicos que forman mezclas acuosas en las que es estable el catión radical del ABTS (Alcalde y col., 2005) que se origina cuando lo oxida la lacasa. Los disolventes ensayados fueron acetonitrilo, acetona, etanol, metanol, (DMF) y (DMSO).

La lacasa nativa (**Figura 33 a**) fue relativamente estable solo en presencia de (DMF) y (DMSO), disolventes en los que se retuvo un 60% y 50 % de actividad respectivamente (**Figura 33 b**), con unos valores más bajos comparándoles con la recombinante. Por otro lado la forma recombinante, también fue más estable en todos los disolventes ensayados.



**Figura 33.** Efecto de los disolventes orgánicos en la actividad de la lacasa nativa **(a)** y la actividad de la lacasa recombinante **(b)**. NN dimetilformamida (DMF) Dimetilsulfóxido (DMSO). La actividad sin la adición de los disolventes orgánicos fue considerada al 100%.

#### IV.2.5.5. Constantes cinéticas

La determinación de la  $K_m$  de las enzimas se realizó a temperatura ambiente usando ABTS, 2,6-DMP (2,6-dimetoxifenol) y  $\text{FeSO}_4$  como sustratos a concentraciones entre 0.575 y 11.5 mM asumiendo la cinética Lineweaver-Burk. La mayor afinidad de ambas lacasas fue por el 2,6-DMF ( $K_m$  de 0.8 mM y de 0.65 mM para la recombinante y la nativa respectivamente). La menor afinidad la mostraron ambas enzimas para la oxidación del FeII (**Tabla 23**). Sin embargo la lacasa recombinante y nativa presenta menos afinidad respecto a  $\text{FeSO}_4$ .

**Tabla 23.** Constantes cinéticas de las reacciones de oxidación de tres sustratos catalizadas por la lacasa recombinante y nativa.

Sustratos	Lacasa nativa				Lacasa recombinante			
	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U.mg <sup>-1</sup> )	$K_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{cat}/K_m$	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U.mg <sup>-1</sup> )	$K_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{cat}/K_m$
ABTS	1.07	800	70.16	65.57	0.89	770	67.54	75.88
2,6-DMP	0.8	320	28.07	35.08	0.65	300	26.31	40.47
Fe SO <sub>4</sub>	4.0	980	85.96	21.49	3.0	900	78.94	26.31

#### IV.2.5.6. Sensibilidad a inhibidores

Se han ensayado dos tipos de sustancias como posibles inhibidores de la actividad lacasa por su interferencia en la oxidación de ABTS, un grupo fueron diferentes sustancias orgánicas y las otras diferentes sales metálicas.

##### IV.2.5.6.1. Interferencia de moléculas orgánicas en la oxidación del ABTS.

132

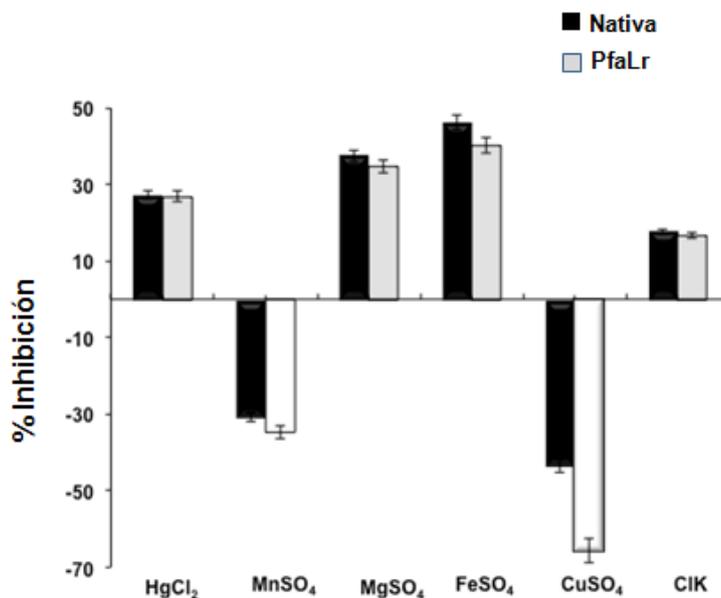
Para la determinación de la inhibición de la actividad lacasa para las dos enzimas, se cuantificó la oxidación del ABTS en ausencia y en presencia del supuesto inhibidor tras 15 minutos de incubación a 30° C. La sensibilidad a la inhibición de la actividad fue menor para la forma recombinante que para la nativa (**Tabla 24**). La mayor inhibición la proporcionó azida sódica a 10 mM (inhibió el 80% de la actividad de la forma recombinante y el 90% de la forma nativa). Por otro lado el EDTA a 10 mM inhibió un 40% y 33.3% para *P. flavido alba* y *A. niger* respectivamente, sin embargo a 1 mM el EDTA incremento la oxidación del ABTS tanto por la enzima recombinante que por la enzima nativa.

**Tabla 24.** Interferencia de varias sustancias de la oxidación de ABTS por la lacasa recombinante y nativa

Inhibidor	Lacasa recombinante		Inhibidor	Lacasa nativa	
	Concentración	Inhibición (%)		Concentración	Inhibición (%)
NaN <sub>3</sub>	1mM	25	NaN <sub>3</sub>	1mM	30
	5mM	66.66		5mM	70.7
	10mM	83.33		10mM	90
EDTA	1mM	-16	EDTA	1mM	-20
	5mM	16.66		5mM	20
	10mM	33.34		10mM	39.9
Urea	5mM	16	Urea	5mM	20
SDS	0.1%	1	SDS	0.1%	5
MnSO <sub>4</sub>	1mM	-8.33	MnSO <sub>4</sub>	1mM	-10.5
	5mM	-25		5mM	-30
	10mM	-50		10mM	-60

#### IV.2.5.6.2 Interferencia de metales en la oxidación del ABTS

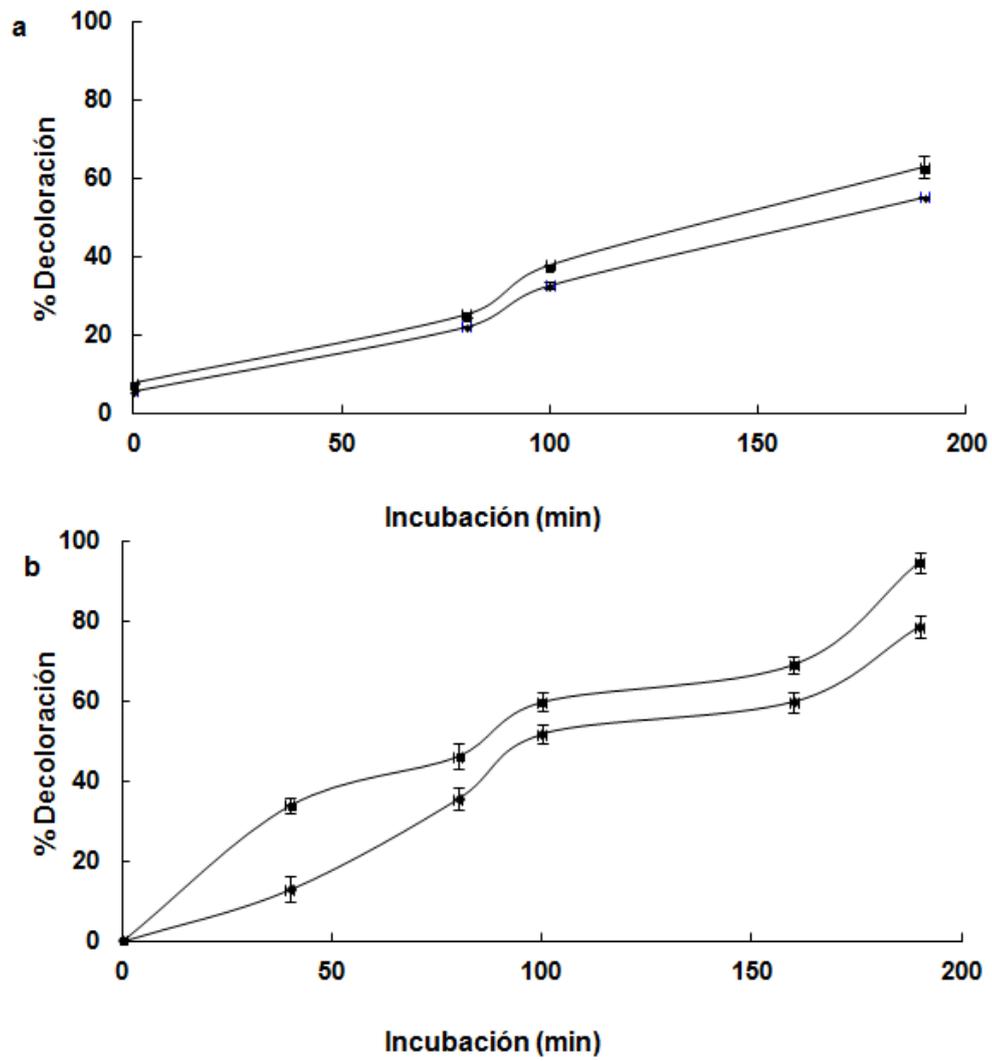
Ninguno de los metales ensayados disminuyó la actividad enzimática de ninguna de las dos formas del enzima. Por el contrario Cu<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> incrementaron la oxidación, más para la forma recombinante que para la nativa (**Figura 34**).



**Figura 34.** Influencia de diferentes metales en la oxidación del ABTS por las lacasas recombinante y nativa.

### IV.3. Decoloración de tintes textiles

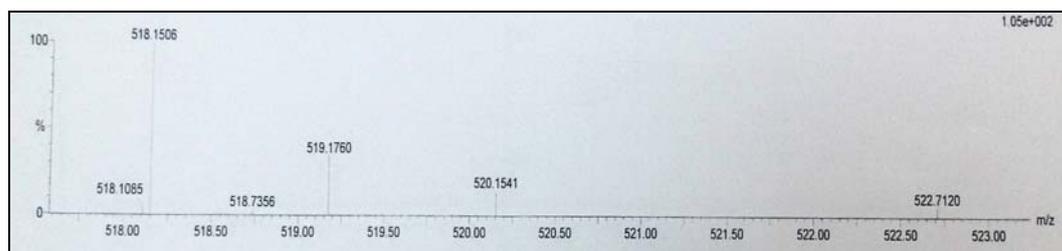
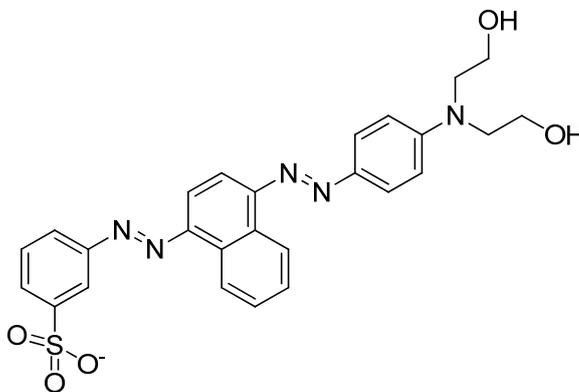
Se ha estudiado la decoloración de dos tintes textiles (RBBR y NY1) de diferente estructura química y se ha determinado la modificación estructural asociada a la decoloración del tinte más sensible (NY1). Como se muestra en la figura Res 23 ambos tintes fueron decolorados tanto por la enzima recombinante como por la nativa. Después de tres horas de incubación la decoloración del RBBR alcanzó un 60 % para ambas enzimas. Sin embargo la decoloración del NY1 fue más rápida (60 % en una hora) por la lacasa recombinante. Después de tres horas, la enzima recombinante decoloró totalmente la solución de NY1 (**Figura 35**).



**Figura 35.** Decoloración de RBBR (a) y NY1 (b) por la lacasa recombinante (■) y nativa (▲).

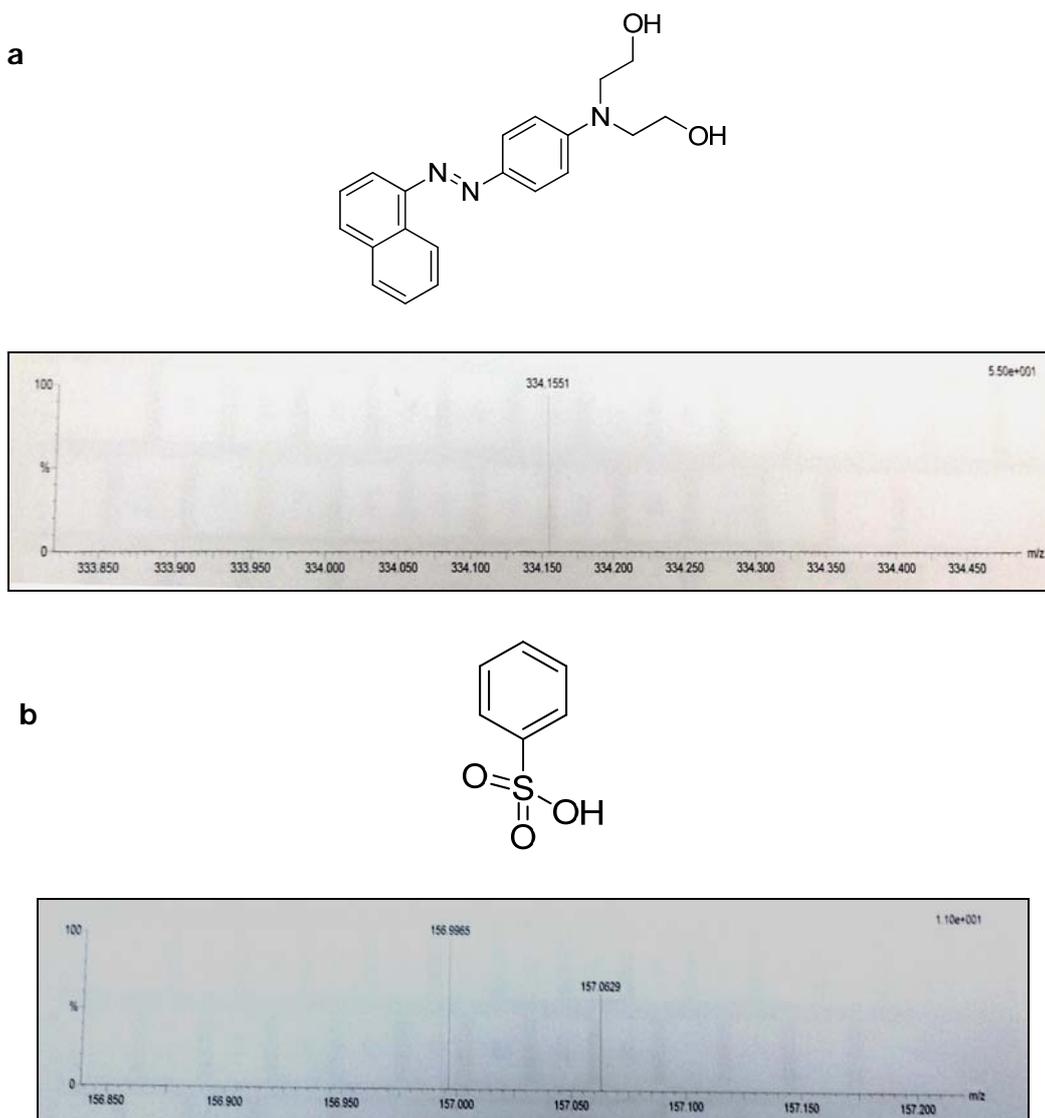
El análisis por LC-MS muestra diferentes resultados dependiendo de la lacasa usada para la decoloración del tinte NY-1. (**Figura 36**) HRMS (ESI,  $m/z$ )= 518.1506  $[M-H]^{-1}$ , calculado para  $C_{26}H_{24}N_5O_5S$  }.

En la **Figura 36** observamos el espectro de masas correspondiente a NY-1, el ion molecular  $m/z=518.1506$  corresponde a  $(M^{-1})$



**Figura 36.** Espectro de masa del tinte textil NY-1

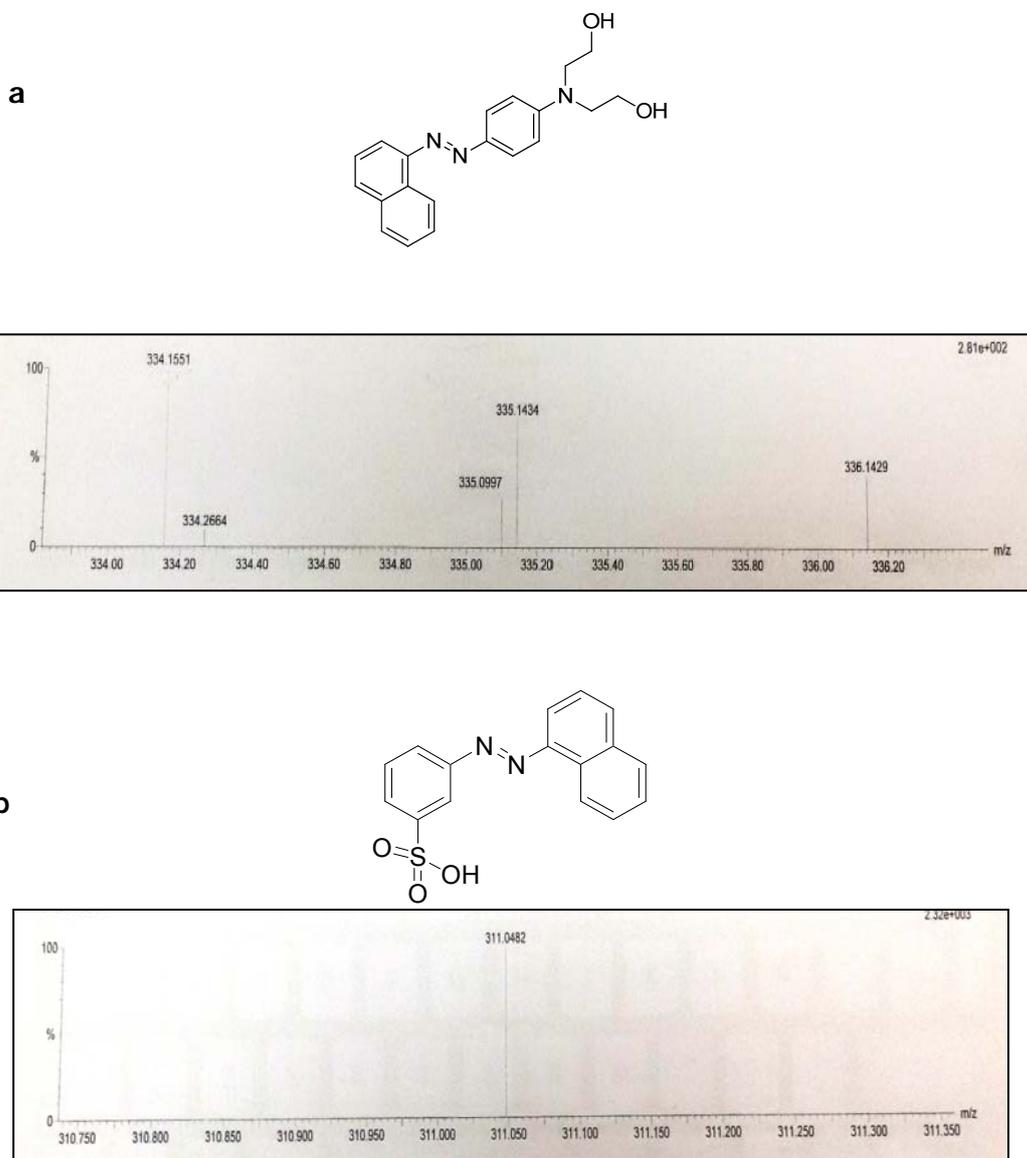
El colorante NY-1 es un derivado diazo. La oxidación por la lacasa nativa originó dos derivados parcialmente oxidados (**Figura 37**), **a**= HRMS (ESI,  $m/z$ )= 334.1551  $[M-H]^{-1}$ , calculado para  $C_{20}H_{20}N_3O_2$  334.1556; **b**= HRMS (ESI,  $m/z$ )= 311.0482  $[M-H]^{-1}$ , calculado para  $C_{16}H_{11}N_2O_3S$  311.0490.



**Figura 37.** Espectro de masa del tinte NY1 decolorado por la lacasa nativa.

Sin embargo los resultados ilustrados en la **Figura 38** muestran que la oxidación de NY-1 con la lacasa recombinante dio como resultado, dos componentes metabolitos parcialmente oxidados (**Figura 38**) **a**= HRMS (ESI,  $m/z$ )= 334.1551  $[M-H]^{-1}$ , calculado para  $C_{20}H_{20}N_3O_2$  334.1556; **b**= HRMS (ESI,  $m/z$ )= 311.0482  $[M-H]^{-1}$ , calculado para  $C_{16}H_{11}N_2O_3S$  311.0490, y un metabolito total<sup>1</sup>, calculado para  $C_6H_5O_3S$  156.9959.

Dado que el producto b no fue encontrado en las soluciones oxidadas por la lacasa nativa, se concluye una oxidación más eficiente del grupo azo por la lacasa recombinante que por la nativa.



**Figura 38.** Espectro de masa del tinte NY1 decolorado por la lacasa recombinante. Producto de oxidación parcial.

#### IV. 4. Referencias de los Resultados

### A

---

**Alcalde, M., Bulter, T., Zumarraga, M., Garcia-Arellano, H. Mencia, M. y Plou, F.J. (2005).** Screening mutant libraries of fungal laccases in the presence of organic solvents. *J Biomol. Screen.* **10**: 624-631.

### B

---

**Ben Hamman, O., de la Rubia, T. y Martínez, J. (1999a).** The effect of manganese on the production of *Phanerochaete flavid-alba* ligninolytic peroxidases in nitrogen limited cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**: 137-142.

**Ben Hamman. O., de la Rubia, T. y Martínez, J. (1999b).** Decolorization of olive oil mill wastewaters by *Phanerochaete flavid-alba*. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 2410-2415.

---

139

### D

---

**de la Rubia, .T, Ruiz, E., Pérez, J. y Martínez, J. (2002).** Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavid-alba* induced by vanillin. *Arch. Microbiol.* **179**: 70-73.

### M

---

**Mattern, I.E., Vannoort, J.M., Vandenberg, P., Archer, D.B., Roberts, I.N. y van den Holden, C.A.M.J.J. (1992).** Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Mol. Gen. Gent.* **234**: 332-336.

### P

---

**Pérez, J., Martínez, J. y de la Rubia, T. (1996).** Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavid-alba*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4263-4267.

**Pérez, J., de la Rubia, T., Ben Hamman, O. y Martínez, J. (1998).** *Phanerochaete flavido-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill waste waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2726-2729.

---

## R

**Record, E., Punt, P.J., Chamkha, M., Labat, M., van den Hondel, C.A. y Asther, M. (2002).** Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **269**: 602-609.

**Rodríguez-Rincón, F., Suarez, A., Lucas, M., Larrondo, L.F., de la Rubia, T., Polaina, J. y Martínez, J. (2010).** Molecular and structural modeling of the *Phanerochaete flavido-alba* extracellular laccase reveals its ferroxidase structure. *Arch. Microbiol.* **192**: 883-892.

## **V. DISCUSIÓN**



La discusión que a continuación se describe nos permite valorar el conocimiento que nuestros resultados han aportado al pequeño mundo de las proteínas de cobre (Mcos); en concreto estas proteínas, que como PfaL, se catalogan entre ferroxidasas y lacasas.

Nuestros resultados obtenidos en esta tesis doctoral, han permitido conocer otros aspectos de la lacasa de *P. flavido alba*, en primer lugar la regulación de la expresión de esta enzima por inhibidores de las histonas desacetilasas (HDACs) y el efecto de inductores aromáticos sobre la producción de la enzima nativa. El trabajo continúa con la descripción de un sistema de expresión heteróloga en *A. niger* del gen de lacasa de *P. flavido-alba* lo que ha permitido su caracterización físico-química y la capacidad del enzima recombinante para degradar colorantes textiles sin la utilización de mediadores de oxidación. Finalmente discutiremos como los resultados presentados confirman el potencial del enzima en estrategias de biorremediación.

### **V.1. Inducción de la lacasa de *P. flavido-alba* y de *T. versicolor* por vainillina y por SAHA.**

143

---

La discusión de este apartado se ha organizado en dos partes, primero sobre los aspectos metodológicos y por otro se discuten los resultados de la propia inducción.

#### **V.1.1. Aspectos metodológicos**

Antes de detallar los resultados conviene mencionar tres aspectos metodológicos en relación a la incorporación de las sustancias ensayadas como inductores. El estudio de inductores de la producción de lacasas fúngicas se ha realizado bajo dos condiciones experimentales ligeramente diferentes: en unos casos el inductor se incorpora en el medio de cultivo (Palmieri y col., 2000; Elisachvili y col., 2010) mientras que en los estudios más recientes, el inductor se añade a cultivos obtenidos tras una primera fase de crecimiento (Xiao y col., 2005; Dekker y col., 2007; Jiang y col., 2013).

La razón del cambio está en que las lacasas forman parte del metabolismo secundario del hongo, por lo que en la medida de lo posible, la adición en la idiofase (tras la fase de crecimiento del metabolismo primario) puede ayudar a comprender

mejor los resultados obtenidos. Esta es la justificación de haber empleado esta metodología en la realización de los experimentos que se discuten.

Otro aspecto metodológico que merece consideración es el empleo de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos imprescindibles para eliminar el problema que supone incorporar al cultivo sustancias de solubilidad limitada en agua, como es el caso de muchas de las moléculas propuestas como inductores. En consecuencia los experimentos deben incluir unos cultivos control que garanticen la identificación del posible efecto de las pequeñas cantidades del disolvente solubilizador que pudieran producirse en los cultivos añadidos de inductor.

En la literatura se ha descrito el empleo de soluciones acuosas de etanol y de DMF como disolventes (Mozhaev y col., 1989; Farnet y col., 2008).

No se ha encontrado información del efecto de la DMF sobre la transcripción de lacasas fúngicas, pero si existe información sobre la transcripción de otra enzima ligninolítica, la MnP de *P. chrysosporium* (Li y col., 1995) tanto la DMF (en concentraciones análogas a las utilizadas en este trabajo) como el etanol, inducen la transcripción de la MnP. Obviamente los niveles de expresión de la MnP son mayores en las soluciones de DMF que contienen inductores que en los que no los contienen.

En nuestros experimentos hemos utilizado una solución acuosa de DMF como disolvente para incorporar los inductores ensayados. En consecuencia en los cultivos que contienen los compuestos ensayados, la vainillina y el SAHA, el efecto sobre la transcripción incluye no solo el efecto de este, sino también el de la DMF. Como veremos más adelante nuestros resultados confirman el aumento de producción de lacasa, la inducción de la producción y la regulación de la expresión de lacasa por vainillina y por SAHA en cultivos de *P. flavido-alba* y en los de *T. versicolor*.

El otro aspecto metodológico de interés es la introducción de *T. versicolor* en algunos experimentos. El empleo de este hongo está basado en la introducción de SAHA como posible inductor de la lacasa, no estudiado en el momento de iniciar esto estudios. Pareció oportuno introducir un hongo diferente a *P. flavido-alba* para descartar que el posible efecto observado fuese específico de este hongo. Como veremos los resultados fueron análogos en ambos hongos.

### **V.1.2. Inducción de la lacasa por vainillina y por SAHA**

La vainillina es un metoxifenol aldehídico (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) muy común en el reino vegetal y así se ha identificado, entre otros, como intermediario de la degradación de la lignina (Tai y col., 1990) y en subproductos de elaboraciones agroalimentarias como por ejemplo en el alpechín (Martinez-Nieto y col., 1992).

Previamente hemos demostrado que los cultivos de *P. flavido-alba* añadidos de vainillina u otros compuestos aromáticos de bajo peso molecular estructuralmente relacionados con las fracciones fenólicas de la lignina, inducen la producción de lacasa (de la Rubia y col., 2002), pero se desconocían los mecanismos moleculares de esta inducción.

La regulación de la expresión de los genes de las lacasas difiere de un organismo a otro probablemente como reflejo de los diferentes papeles que ejercen las lacasas en los hongos (Collins y Dobson 2002; Mansur y col., 1998).

Reiteradamente se ha demostrado que la acumulación de lacasa extracelular en cultivos de basidiomicetos, está asociada al aumento de la cantidad del mRNA específico, como se ha demostrado en *Volvariella volvacea* (Chen y col., 2003), en *Trametes* (Terrón y col., 2004) o en *P. ostreatus* (Pezzella y col., 2013) entre otros. La situación es diferente para la regulación por cobre de la lacasa de *P. ostreatus*, donde el transcrito aumenta continuamente pero no aumenta la actividad extracelular de enzima (Palmieri y col., 2000), resultado atribuido a una secreción ineficiente o a la degradación proteolítica de la lacasa secretada (Mazumder y col., 2009).

En varias lacasas fúngicas, la inducción por compuestos fenólicos se corresponde con el aumento de la transcripción del mRNA (Chen y col., 2003; Terrón y col., 2004; Xiao y col., 2006; Yang y col., 2013).

La adición de vainillina y de SAHA a cultivos de *P. flavido-alba* y de *T. versicolor* incrementaron la actividad lacasa y la transcripción del mRNA de *P. flavido-alba* y de *T. versicolor* (Figuras 10 y 11). De hecho la información disponible describe que prácticamente son simultáneos el máximo de acumulación de mRNA y el máximo de actividad enzimática en la producción de lacasa por *T. trogii* (Colao y col., 2003), por *T. pubescens* (Galhaup y col., 2002) por *V. volvaceae* (Chen y col., 2004) o durante la producción de una lacasa recombinante de *Coprinus congregatus* (Kim y col., 2001; Xiao y col., 2006).

Algunos trabajos han demostrado que la expresión de la actividad lacasa es una función de la composición del medio de cultivo, del tiempo de incubación y de la concentración de los inductores (Schell y col., 2000). Frecuentemente las lacasas se producen en pequeñas cantidades en condiciones de suficiencia en nutrientes, pero se ha descrito que la inducción por inductores aromáticos provoca un incremento en la actividad lacasa. Como para otros hongos de la podredumbre blanca de la madera, *P. sajor-caju* (Lo y col., 2001), *P. eringii* (Muñoz y col., 1997) y *T. modesta* (Nyanhongo y col., 2002), la producción de lacasa por *P. flavido-alba* y *T. versicolor* aumentó en presencia de compuestos aromáticos (**Figuras 18 y 19**).

Hasta la fecha no hay en la bibliografía descripciones de la inducción de la actividad lacasa y de la transcripción del mRNA por inhibidores de las histonas desacetilasas como el SAHA por lo que no hemos podido comparar nuestros resultados y solo lo hemos podido realizar a nivel general por compuestos aromáticos.

Algunos estudios (Thurston, 1994; Youn y col., 1995) sugirieron que uno de los principales papeles que ejercen las lacasas fúngicas es el de proteger frente a compuestos fenólicos tóxicos producidos durante la degradación de la lignina. No obstante los resultados son contradictorios lo que demuestra que el papel protector de la lacasa aún permanece sin esclarecerse.

## V.2. Expresión heteróloga de *pfal* en *A. niger*

En *P. flavido-alba*, como en la mayor parte de las lacasas producidas por hongos, su nivel de expresión es demasiado bajo para hipotéticos usos biotecnológicos, y requieren la expresión heteróloga para obtener mejor producción de la enzima.

Para la expresión en un sistema heterólogo, se eligió *A. niger* como hospedador, ya que este hongo ha sido utilizado en otras ocasiones para la producción heteróloga de diferentes proteínas con buenos resultados tanto con proteínas de origen fúngico (Conesa y col. 2000; Record y col. 2002), como con proteínas de otros orígenes (Contreras y col. 1991; Archer y col. 1995).

Aunque los hongos filamentosos son capaces de producir grandes cantidades de enzimas (Punt y col. 2002), la producción de proteínas heterólogas es más limitada, lo que implica la necesidad de uso de diferentes estrategias, como la fusión de genes para aumentar el rendimiento (Gouka y col. 1997). Para la expresión extracelular del cDNA de *P. flavido-alba* se utilizó un sistema basado tanto en la introducción del propio péptido señal de la lacasa, como en la fusión *pfal* con la

secuencia señal de la glucoamilasa de *A. niger*. La detección extracelular de la enzima confirmó su funcionalidad, lo que apoya la idea de una localización extracelular de la enzima en *P. flavido-alba*, la sustitución por el de la glucoamilasa de *A. niger* provocó un incremento de 10 veces en la actividad específica encontrada en los cultivos, lo que indica que el uso de este péptido señal mejora la producción de enzimas heterólogas en *A. niger*. Los mejores resultados para la producción heteróloga de PfaLr se han obtenido combinando esta estrategia con el uso de una cepa de *A. niger* deficiente en proteasas extracelulares, de acuerdo con los mejores rendimientos encontrados por otros autores utilizando este tipo de hospedadores (Téllez-Jurado y col., 2006)

En esta tesis doctoral describimos por primera vez la expresión heteróloga de *pfaL* (GenBank EF4461611, Rodríguez-Rincón y col., 2010) en *A. niger* y la secreción de la lacasa recombinante (PfaLr) en el medio de cultivo gracias a la fusión de la preprosecuencia de la glucoamilasa de *A. niger*, que permite la secreción de otras enzimas fúngicas recombinantes (Record y col., 2002; Sigoillot y col., 2004; Téllez-Jurado, 2006; Piumi y col., 2014).

La producción extracelular de PfaLr por *A. niger* alcanzó los 30 mg.l<sup>-1</sup>, 1000 veces mayor que la producción de lacasa nativa por *P. flavido-alba* (Pérez y col., 1998). Este incremento de la producción es coherente con trabajos anteriores (Record y col., 2002, Sigoillot y col., 2004, Yaver y col., 1999), y ligeramente mayor que las producciones heterólogas de otras lacasas en levaduras (Cassland y Jonsson, 1999; Otterbein y col., 2000). Por ejemplo, la producción de la lacasa de *P. cinnabarinus* por *P. pastoris* alcanzó alrededor de 20 mg l<sup>-1</sup> (Madzak y col., 2005), mientras que en *A. niger* alcanzó 70 mg l<sup>-1</sup> (Record y col., 2002).

### V.2.1. Purificación de la lacasa recombinante

La purificación de la lacasa recombinante fue realizada en dos pasos de cromatografía: intercambio aniónico y exclusión molecular, mientras que la enzima nativa requiere para su purificación completa un proceso de tres pasos de cromatografía. Esta mayor facilidad de purificación puede ser explicado porque *A. niger* produce mayoritariamente esta enzima en el medio extracelular (**Figura 26**), mientras que en los cultivos de *P. flavido-alba* se acumulan extracelularmente cantidades significativas de otras enzimas, entre otras, peroxidasas ligninolíticas (LiP y MnP, (Pérez y col., 1996). El SDS-PAGE y el análisis de Western blott de las enzimas recombinante y nativa purificadas no sólo confirmó la homogeneidad de la

enzima, sino también que ambas, la enzima recombinante y la nativa presentaron un peso molecular muy similar (**Figura 29**).

### **V.2.2. Comparación de la enzima nativa y recombinante**

Se han descrito modificaciones de algunas de las propiedades de la enzima recombinante comparada con la forma nativa (Otterbein y col., 2000; Sigoillot y col., 2004; Madzak y col., 2005). En este sentido PfaLr mostró una actividad específica de  $92.10 \text{ U.mg}^{-1}$ , bastante mayor que la descrita para la enzima nativa ( $18.4 \text{ U.mg}^{-1}$ , Pérez y col., 1996). El aumento de este parámetro podría ser explicado por la mayor estabilidad de la enzima recombinante comparándola con la enzima nativa, como se verá en el siguiente apartado de estabilidad al pH, a la temperatura y a disolventes orgánicos.

#### **V.2.2.1. pH óptimo y estabilidad al pH**

La oxidación de ABTS de la mayoría de lacasas fúngicas ocurre en un rango de pH ente 2.0 y 7.0 (Baldrian, 2006). PfaLr mostró un pH óptimo para la oxidación de ABTS de 3.0 el mismo que para la enzima nativa (Pérez y col., 1996) y similar al de lacasas de otros basidiomicetos (Garzillo y col., 1998; Giardina y col., 1999; Soden y col., 2002; Galhaup y col., 2002; Chen y col., 2004; Park y col., 2014; You y col., 2014).

En general, las lacasas fúngicas son estables a pH ácido y su actividad disminuye bruscamente al aproximarse a pH alcalino como ocurre con la lacasa de *P. cinnabarinus* cuya actividad casi desaparece a pH 6.0 (Eggert y col., 1996). La estabilidad al pH fue diferente para las enzimas recombinante y nativa de *P. flavido-alba*. La enzima nativa tiene una estabilidad máxima a pH 5.0 con una disminución de su actividad del orden del 85 % a pH 6.0. Sin embargo la enzima recombinante mantuvo casi el 100 % de actividad a pH 5.0 y 6.0, algo similar ocurrió a la lacasa de *G. lucidum* donde la actividad lacasa se mantuvo al 90% a pH 7.0 (You y col., 2014).

#### **V.2.2.2. Estabilidad frente a la temperatura**

Las formas nativa y recombinante de la lacasa de *P. flavido-alba* proporcionan una mayor actividad a  $30^\circ \text{C}$  que a  $40^\circ \text{C}$ . La enzima recombinante fue más estable que la enzima nativa conservando más del 50% de actividad a  $40^\circ \text{C}$  similar a la lacasa recombinante de *G. lucidum* TR6 (You y col., 2014). Entre las temperaturas de  $50^\circ \text{C}$

y 60° C ambas actividades se inactivaron en el mismo porcentaje (80%) e igual a la lacasa recombinante de *G. lucidum* 7071-9 donde la actividad lacasa disminuye bruscamente a 45° C y 55° C (Sun y col., 2012). La mayor estabilidad del enzima recombinante de *P. flavido-alba* puede superar la limitación del enzima nativo para su uso biotecnológico.

#### V.2.2.3. Estabilidad en disolventes orgánicos

La utilización industrial de los enzimas requieren que estos catalizadores sean estables a altas concentraciones de disolventes orgánicos, pero la mayoría de los enzimas pierde su actividad bajo estas condiciones, fundamentalmente debido a un inapropiado plegamiento (Klibanov, 2001). Así lacasas de hongos como *P. anserina*, *A. bisporus*, *T. versicolor* y *G. lucidum* son inactivadas en disolventes orgánicos y por tanto poco útiles comercialmente (Huang y col., 2011).

Así mismo la estabilidad a disolventes orgánicos es fundamental para la utilización de enzimas en síntesis orgánica (Farnet y col., 2008). Nuestros resultados muestran que la lacasa recombinante (PfaLr) fue más estable a todos los solventes ensayados, que la enzima nativa. Así conservó más del 70% de su actividad después de tres horas en (DMF y DMSO al 50%) y la actividad residual fue mucho menor en los otros disolventes ensayados. En este sentido, las lacasas nativas Lcc1A y Lcc2B de *L. edodes* presentaron una estabilidad similar en diferentes disolventes orgánicos (Wong y col., 2012). Por otro lado, gran parte de la actividad de la lacasa de *Ganoderma fornicatum* se conservó tras cierto tiempo en solventes orgánicos (Huang y col., 2011), pero la de *Fusarium solani* conservó aproximadamente el 75-80% de su actividad en acetonitrilo y metanol al 5% y se inactiva casi totalmente en los demás disolventes ensayados (Wu y col., 2010). El comportamiento de la lacasa nativa de *P. flavido-alba* a esos solventes ensayados, fue mejor que el descrito en la lacasa de *Myrothecium verrucaria* que pierde toda su actividad en acetona y acetonitrilo al 20% (Zhao y col., 2012). En conclusión la mayor estabilidad que presenta la enzima recombinante (PfaLr) en solventes orgánicos sustenta su posible empleo en la síntesis orgánica.

#### V.2.2.4. Constantes cinéticas

La expresión en *P. pastoris* de las lacasas de *G. lucidum* TR6 y de *P. cinnabarinus* (You y col., 2014; Sigoillot y col., 2004), proporciona enzimas recombinantes menos afines a los sustratos que las respectivas enzimas nativas. La expresión de la lacasa de *P. flavido-alba* en *A. niger* proporcionó una enzima recombinante de

mayor actividad específica (18.4 para la enzima nativa y de 92.1 U.mg<sup>-1</sup> para la enzima recombinante), lo que podríamos relacionar con la mayor estabilidad de la enzima recombinante. Esta observación fue apoyada por los valores de los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) (**Tabla 23**): la lacasa recombinante presentó un  $K_m$  y  $V_{max}$  inferior a la de la enzima nativa, esto es una mayor afinidad de sustrato/enzima.

#### V.2.2.5. Sensibilidad a inhibidores

Los compuestos que generalmente se describen como inhibidores típicos de las lacasas incluyen SDS, azida sódica, DDT y L-cisteína que suele tener un efecto muy potente, mientras que los agentes quelantes de iones como el EDTA y el ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) no se comportaron como eficaces inhibidores de las lacasas purificada (Halburgi y col., 2011). La azida sódica es un inhibidor de metaloenzimas (Sugumaran, 1995), que inactiva la lacasa de *C. subvermispora* (Fukushima y Kirk, 1995), de *L. edodes* (D'Annibale y col., 1996), de *T. versicolor* (Johannes y Majcherczy, 2000) y de los hongos de la familia *Coprinaceae*.

Nosotros hemos analizado el efecto de estos inhibidores sobre la actividad de ambas lacasas de *P. flavido-alba* utilizando ABTS como sustrato.

150

Como se ha descrito para las lacasas de *Chaetomium thermophilum* y de especies de *Pleurotus* (Chefetz y col., 1998; More y col., 2011), los estudios de inhibición de la actividad lacasa por metales y otros compuestos aromáticos muestran que la azida sódica fue el inhibidor más efectivo. Así, PfaL y PfaLr fueron más sensibles para la azida sódica que para el EDTA. Resultados similares se han obtenido con azida sódica y EDTA sobre la lacasa de *Peniophora* sp. (Niku-Paavola y col., 2004). Así como también se ha establecido que 0.1mM de azida sódica provoca la completa inactivación de la actividad lacasa de *T. versicolor* (Johannes y Majcherezyk 2000).

En general la sensibilidad de las lacasas a la inhibición por EDTA es variable: a 200 mM no inactiva la lacasa de *T. hirsuta* (Abadulla y col., 2000), a 4 mM no inactiva la lacasa de *P. cinnabarinus* (Eggert y col., 1996), a 3 mM solo inactiva parcialmente las lacasas de *T. versicolor*, *P. ostreatus*, y *B. cinerea* (Bollag y Leonowicz, 1984) y a 2mM inactiva completamente la lacasa de *C. subvermispora* (Salas y col., 1995). El comportamiento de PfaL y PfaLr a la inactivación por EDTA fue diferente a otras lacasas, la menor concentración ensayada (1 mM) provocó un aumento en la oxidación de ABTS y a 5 y 10 mM solo se inactivaron entre un 16 a un 39%.

#### V.2.2.6. Efecto de los iones metálicos

Las aguas residuales de la industria textil contienen altas concentraciones de diferentes iones metálicos (Rodríguez-Couto y col., 2005). Con objeto de utilizar las lacasas en el tratamiento de aguas residuales industriales, es muy importante determinar y considerar el efecto de los iones metálicos sobre la actividad y evaluar la capacidad de las lacasas en tolerar los diferentes iones metálicos.

En relación al efecto de los iones metálicos sobre la enzima, parece ser que se estos, o bien se unen a la enzima y o bien, la estabilizan o la desestabilizan, de este modo provocan cambios en la actividad. En algunos trabajos se demuestra que los iones metálicos son inhibidores de la lacasa (Hu y col., 2014; Zhang y col 2013). En este trabajo se determinó el efecto de iones sobre la actividad laccasa de *P. flavido-alba* (Figura 34). La lacasa recombinante mostró una mayor tolerancia a los iones metálicos a concentración de 2 mM que la enzima nativa. Mientras que algunos iones como  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{ClK}$  se comportaron como inhibidores, el  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  aumentaron la oxidación del ABTS, más para la enzima recombinante que para la nativa. Resultados similares se han demostrado para la lacasa de *T. versicolor*, para la cual la adición de  $\text{Cu}^{2+}$  estimula la actividad a bajas concentraciones (Lorenzo y col., 2005). Un efecto similar ha sido descrito para la lacasa de *Bacillus vallismorti* con no solo  $\text{Cu}^{2+}$  sino también con  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  (Zhang y col., 2013).

#### V.3. Decoloración de colorantes textiles por la enzima recombinante

Los efluentes textiles contienen diferentes colorantes la mayoría de los cuales tienen efectos tóxicos (Hu y Wu, 2001; Dogan y col., 2005). La decoloración de colorantes por métodos fisicoquímicos tiene numerosas desventajas por lo que los procesos basados en tratamientos enzimáticos puede ser una alternativa para decolorar y eliminar colorantes de los efluentes. La lacasa es la principal enzima con actividad decoloradora de tintes textiles (Rodríguez-Couto y Herrera. 2006).

Algunas lacasas fúngicas solas o formando parte de los denominados "sistema de lacasa-mediador" son útiles para la decoloración de los tintes, como el tinte antraquinónico RBBR (Wong y Yu 1999; Palmieri y col., 2005; Hsu y col., 2012).

Las lacasas purificadas de *P. flavido-alba* (nativa y recombinante) decoloran de manera eficiente las soluciones de colorantes de diferente estructura química (RBBR

y NY1) sin necesidad de mediadores de oxidación propiedad que comparten con algunas otras lacasas como es el caso de la lacasa de *F. trogii*, (Deveci y col., 2004), la lacasa de *P. sajor-caju* (Murugesan y col., 2006.) que fue capaz de decolorar tres colorantes azo sin la adición de mediador o la lacasa recombinante de *Coprinus comatus* que decolora 20 colorantes sintéticos de estructuras azo, antraquinónica y trifenilmetano sin adición de mediadores (Bao y col., 2013); y la diferencian de aquellas que requieren mediadores para la decoloración de los colorantes textiles, como la lacasa de *G. lucidum* que requiere la adición de 1-hidroxibenzotriazol (Murugesan y col., 2007), la lacasa de *T. versicolor* (Guo y col., 2008), la de *Trametes hirsuta* (Rodríguez-Couto y col., 2005), o las lacasas de otros basidiomicetos (Claus y col., 2002).

En nuestro trabajo hemos determinado no solo la decoloración sino también la degradación de los colorantes textiles ensayados por ambas enzimas de *P. flavido-alba*.

La identificación de los productos de degradación es muy importante porque una vez que se conocen es posible estudiar su toxicidad y así decidir si el tratamiento enzimático es realmente una alternativa al tratamiento fisicoquímico. Hasta ahora en nuestro trabajo no se ha estudiado la toxicidad de los metabolitos de degradación del colorante NY1 debido a la falta de concentración de los metabolitos por lo que actualmente nos encontramos realizando el escalado de los estudios de degradación para obtener cantidad suficiente de metabolitos para los estudios de toxicidad.

#### **V.4 Consideración final**

La lacasa de *P. flavido-alba* puede producirse con mayor rendimiento en la cepa utilizada de *A. niger*. La lacasa recombinante tiene propiedades mejoradas respecto a la forma nativa, como son: mayor estabilidad a pH menos ácido, en presencia de inhibidores y en disolventes orgánicos. Además, decolora eficientemente y degrada colorantes textiles sin necesidad de mediadores redox. Estas propiedades avalan que la lacasa recombinante podría ser usada en tratamientos biotecnológicos de efluentes industriales que contengan colorantes textiles.

## V.5. Referencias de la Discusión

**A**

---

**Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.M., Cavaco-Paulo, A. y Gubitz, G.M. (2000).** Decoloration and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3257-3362.

**Archer, D.B., MacKenzie, D.A. y Ridout, M.J. (1995).** Heterologous protein secretion by *Aspergillus niger* growing in submerged culture as dispersed or aggregated mycelia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 157-160.

**B**

---

**Bao, W.H. (2011).** Expression, characterization and 2,4,6-trichlorophenol degradation of laccase from *Monilinia Fructigena*. *Mol. Bio. Rep.* **39**: 3871-3877.

**Bao, S., Teng, Z. y Ding, S. (2013).** Heterologous expression and characterization of a novel laccase isoenzyme with dyes decolorization potential from *Coprinus comatus*. *Mol. Biol. Rep.* **40**: 1927-1936.

153

---

**Baldrian, P. (2006).** Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 215-242.

**Bollag, J.M. y Leonowicz, A. (1984).** Comparative studies of extracelular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 849-854.

**C**

---

**Cassland, P. y Jönsson, L.J. (1999).** Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 393-400.

**Chefetz, B., Chen, Y. y Hadar, Y. (1998).** Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3175-3179.

**Chen, S., Ge, W. y Buswell, J.A. (2004).** Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. Eur. J. Biochem. **271**: 318-328.

**Chen, S., Ma, D., Ge, W. y Buswell, J.A. (2003).** Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. FEMS Microbiol. Lett. **218**: 143-148.

**Chen, S., Ge, W. y Buswell, J.A. (2004).** Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. FEMS Microbiol. Lett. **30**: 171-176.

**Claus, H., Faber, G. y Konig, H. (2002).** Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. Appl. Microbiol. Biotechnol. **59**: 672-678.

**Colao, M., Garzillo, A.M., Buonocore, V., Schiesser, A. y Ruzzi, M. (2003).** Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes trogii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **63**: 153-158.

154

**Collins, P.J. y Dobson, A.D.W. (1997).** Regulation of laccase gene expression in *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 3444-3450.

**Collins, P.J. y Dobson, A. (2002).** Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. Enzyme. Microbiol. Tech. **31**: 3-9.

**Conesa, A., van den Holden, C.A.M.J.J. y Punt, P.J. (2000).** Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3023-3026.

**Contreras, R., Carrez, D., Kinghorn, J.R., van den Holden, C.A.M.J.J. y Fiers, W. (1991).** Efficient KEX2-like processing of a glucoamylase-Interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature Interleukin-6. Nat. Biotech. **9**: 378-381.

**D**

---

**D'Annibale, A., Celletti, D., Felici, M., Dimattia, E. y Giovannozzi-Sermanni, G. (1996).** Substrate-specificity of laccase from *Lentinus edodes*. Acta. Biotechnol. **16**: 257-270.

**de la Rubia, T., Ruiz, E., Pérez, J. y Martínez, J. (2002).** Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavido-alba* induced by vanillin. Arch. Microbiology **179**: 70-73.

**Dekker, R.F.H., Barbosa, A.M., Giese, E.C., Godoy, S.D.S. y Covizzi, L.G. (2007)** Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Int. Microbiol. **10**: 177-185.

**Deveci, T., Unayayar, A. y Mazmanci, M.A. (2004).** Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800. J. Mol. Catal. B: Enzym. **30**: 25-32.

**Dogan, E.E., Yesilada, E., Ozata, L. y Yologlu, S. (2005).** Genotoxicity testing of four textile dyes in two crosses of *Drosophila* using wing somatic mutation and recombination test. Drug. Chem. Toxicol. **28**: 289-301.

---

## E

**Eggert, C., Temp, U. y Eriksson, K.E. (1996).** The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. Appl. Environ. Microbiol. **62**:1151-1158.

---

155

**Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Khardziani, T. y Agathos, S.N. (2010).** Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by White rot basidiomycetes. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **37**: 1091-1096.

---

## F

**Farnet, AM., Gil, G. y Ferre, E. (2008).** Effects of pollutants on laccase activities of *Marasmius quercophilus*, a white-rot fungus isolated from a mediterranean sclerophyllous litter. Chemosphere **70**:895-900.

**Fukushima, M. y Kirk, T.K. (1995).** Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 872-876.

---

## G

**Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C.K., Strauss, J. y Haltrich, D. (2002).** Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* **148**: 2159-2169.

**Garzillo, A.M., Colao, M.C., Caruso, C., Caporale, C., Celletti, D. y Buonocore, V. (1998).** Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 545-551.

**Giardina, P., Palmieri, G., Scalon, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G. y Sanna, G. (1999).** Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.* **341**: 655-663.

**Gouka, R.J., Punt, P.J. y van den Holden, C.A.M.J.J. (1997).** Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 1-11.

**Guo, M., Lu, F., Liu, M., Li, T., Pu, J., Wang, N., Liang, P. y Zhang, C. (2008).** Purification of recombinant laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Biotechnol.* **30**: 2091-2096.

---

## H

**Halaburgi, V.M., Sharma, S., Sinha, M., Singh, T.P. y Karegoudar, T.B. (2011)** Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochem.* **46**: 1146-1152.

**Hu, X., Wang, C., Wang, L., Zhang, R. y Chen, H. (2014).** Influence of temperature, pH and metal ions on guaiacol oxidation of purified laccase from *Leptographium quinlingensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 1199-1206.

**Hu, T.L. y Wu, S.C. (2001).** Assessment of the effect of azo dye RP2B on the growth of nitrogen fixing *cyanobacterium-Anabaena* sp. *Biores. Technol.* **77**: 93-95.

**Huang, W.T., Tai, R., Hseu, R.S. y Huang, C.T. (2011).** Overexpression and characterization of a thermostable pH stable and organic solvent-tolerant *Ganoderma fornicatum* laccase in *Pichia pastoris*. *Process Biochem.* **46**: 1469-1474.

**Hsu, C.A., Wen, T.N., Su, Y.C., Jiang, Z.B., Chen, C.W. y Shyur, L.F. (2012).** Biological degradation of anthraquinonic and azo dyes by a novel laccase from *Lentinus* sp. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 5109-5117.

---

**J**

**Jiang, M., Ten, Z. y Ding, S. (2013).** Decoloration of synthetic dyes by crude and purified laccases from *Coprinus comatus* grown under different cultures: the role of major isoenzyme in dyes decolorization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169**: 660-672.

**Johannes, C. y Majcherczyk, A. (2000).** Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator system. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 524-528.

---

**K**

**Kim, S., Leem, Y., Kim, K. y Choi, H. (2001).** Cloning of an acidic laccase gene (*clac2*) from *Coprinus congregatus* and its expression by external pH. *FEMS. Microbiol. Lett.* **195**: 151-156.

157

---

**Klibanov, A. (2001).** Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature.* **409**: 241-246.

---

**L**

**Lo, A.S.C., Ho, Y.S. y Buswell, J.A., (2001).** Effect of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* and partial characterization of a major laccase component. *Mycologia.* **93**: 413-421.

**Lorenzo, M., Moldes, D., Rodriguez-Couto, S. y Sanromán, M. (2005).** Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere* **60**: 1124-1128.

**Li, D., Alic, M., Brown, J.A. y Gold, M.H. (1995).** Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 341-345.

---

**M**

Madzak, C., Otterbein, L., Chamkha, M., Moukha, S., Asther, M., Gaillardin, C. y Beckerich, J.M. (2005). Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Res. 5: 635-646.

Martínez-Nieto, L., Ramos-Cormenzana, A., García-Pareja, M., Garrido-Hoyos, S. (1992). Biodegradación de compuestos fenólicos del alpechín con *Aspergillus terreus*. Grasas y Aceites. 43: 75-81.

Mansur, M., Suarez, T. y González, A.E. (1998). Differential gene expression in the laccase gene family from *Basidiomycete* I-62 (CECT 20197). Appl. Environ. Microbiol. 64: 771-774.

Mazumder, S., Basu, S.K. y Mukherjee, M. (2009). Laccase production in solid-state and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus*. Eng. Life Sci 9: 45-52.

More, S.S., Renuka, P.S., Pruthvi, K., Swetha, M., Malini, S. y Veena, S.M. (2011). Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. Enzyme Res. 2011: 1-9.

158

Mozhaev, V.V., Khmel'nitsky, K.L., Sergeeva, M.V., Belova, A.B., Klyachko, N.L., Levashov, A.V. y Martinek, K. (1989). Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures. Alpha-chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents. Euro. J. Biochem. 184: 597-602.

Muñoz, C., Guillén, F. y Martínez, A.T. (1997). Induction and characterization of lacases in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Curr.Microbiol. 34: 1-5.

Murugesan, K., Arulmani, M., Nam, I.H., Kim, Y.M., Chang, Y.S. y Kalaichelvan, P.T. (2006). Purification and characterization of laccase produced by a White rot-fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dye. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 939-946.

Murugesan, K., Nam, I.H., Kim, Y.M. y Chang, Y.S. (2007). Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. Enzyme Microbial. Tech. 40:1662-1672.

**N**

**Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M. y Enei, H. (2002).** Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 327-335.

**Niku-Paavola, M.L., Fagerström, K., Kruus, K. y Viikari, L. (2004).** Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. *Enzyme Microb. Tech.* **35**: 100–102.

**Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gubitz, G., Zvauya, R., Read, J.S. y Steiner, W. (2002).** Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Biores.Technol.* **84**: 259-263.

---

## O

**Otterbein, L., Record, E., Longhi, S., Asther, M. y Moukha, S. (2000).** Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1619-1625.

---

## P

**Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. y Sannia, G. (2000).** Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 920-924.

**Palmieri, G., Cennamo, G. y Sannia, G. (2005).** Remazol Brilliant Blue R decolorisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme Microb. Tech.* **36**: 17-24.

**Park, N. y Park, S.S. (2014).** Purification and characterization of a novel laccase from *Fomitopsis pinicola* mycelia. *Int. J. Biol. Macro. Mol.* **70**: 583-589.

**Pérez, J., de la Rubia, T., Ben Hamman, O. y Martínez, J. (1998).** *Phanerochaete flavido alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wasters. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2726-2729.

Pérez, J., de la Rubia, T. y Martínez, J. (1996). Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavid-alba*. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 4263-4267.

Pezzella, C., Lettera, V., Piscitelli, A., Giardina, P. y Sannia, G. (2013). Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* Laccases genes. Appl. Microbiol. Biotechnol. **97**: 705-717.

Piumi, F., Levasseur, A., Navarro, D., Zhou, S., Mathieu, Y., Ropartz, D., Ludwig, R., Faulds, C.B. y Record, E. (2014). A novel glucose dehydrogenase from the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: production in *Aspergillus niger* and physicochemical characterization of the recombinant enzyme. Appl. Microbiol. Biotechnol. **98**: doi: 10.1007/s00253-0145891-4.

Punt, P.J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., y van den Holden, C.A.M.J.J. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. Trends. Biotechnol. **20**: 200-206.

---

## R

160

Record, E., Punt, P.J., Chamkha, M., Labat, M., van den Hondel, C.A. y Asther, M. (2002). Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. Eur. J. Biochem. **269**: 602-609

Rodríguez-Couto, S., Sanromán, M. y Gübilt, G.M. (2005). Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. Chemosphere **58**: 417-422.

Rodríguez-Couto, S. y Toca-Herrera J.L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnol. Adv. **24**: 500-513.

Rodríguez-Rincón, F., Suárez, A., Lucas, M., Larrondo, L.F., de la Rubia, T., Polaina, J. y Martínez, J. (2010) Molecular and structural modeling of the *Phanerochaete flavid-alba* extracellular laccase reveals its ferroxidase structure. Arch. Microbiol. **192**: 883-892.

---

## S

**Salas, C., Lobos, S., Larrain, J., Salas, L., Cullen, D. y Vicuña, R. (1995).** Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete *Ceriporiopsis Subvermispora*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **21**: 323-333.

**Schell, T., Hofer, M., Ludwig, S. y Holker, U. (2000).** Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 686-691.

**Sigoillot, C., Record, E., Belle, V., Robert, J.L., Levasseur, A., Punt, P.J., van den Hondel, C.A., Fournel, A., Sigoillot, J.C. y Asther, M. (2004)** Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 346-352.

**Soden, D.M., O'Callaghan, J. y Dobson, A.D.W. (2002).** Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology* **148**: 4003-4014.

**Sugumaran, M. (1995).** A caution about the azide inhibition of enzymes associated with electrophilic metabolites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**: 834-839.

161

---

**Sun, J., Peng, R.H., Xiong, AS., Tian, Y., Zhao, W., Xu, H., Liu, D.T., Chen, J.M y Yao, Q.H. (2012).** Secretory expression and characterization of a soluble laccase from the *Ganoderma lucidum* strain 7071-9 in *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Rep.* **39**: 3807-3814.

## T

---

**Tai, D., Terazawa, M., Chen, C. y Chang, H. (1990).** Lignin biodegradation products from birch wood by *Phanerochaete chrysosporium*. Part 2. The constituents of ether-soluble low-molecular-weight fractions. *Holzforschung* **44**: 257-262.

**Terrón, M.C., González, T., Carbajo, J.M., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., Dobson, A.D.W. y González, A.E. (2004).** Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on *lcc* gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes sp.* I-62. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 954-962.

**Thurston, C.F. (1994).** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26.

---

## W

---

**Wong, K.S., Huang, Q., Au, C.H., Wang, J. y Kwan, H.S. (2012).** Biodegradation of dyes and polyaromatic hydrocarbons by two allelic forms of *Lentinula edodes* laccase expressed from *Pichia pastoris*. *Bioresource Technol.* **104**: 157-164.

**Wong, Y.X. y Yu, J. (1999).** Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* **33**: 3512-3520.

**World Bank. (2007).** Environmental, Health, and Safety Guidelines for Textile Manufacturing. International Finance Corporation, World Bank Group 2007.

**Wu, Y.R., Luo, Z.H, Chow, R.K.K. y Vrijmoed, L.L.P. (2010).** Purification and characterization of an extracellular laccase from the anthracene-degrading fungus *Fusarium solani* MAS2. *Bioresource Technol.* **101**: 9772-9777.

162

---

## X

---

**Xiao, Y.Z., Hong, Y.Z., Li, J.F., Hang, J., Tong, P.G., Fang, W. y Zhou, C.Z. (2006)** Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analysis of their differential expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 493-501.

## Y

---

**Yang, Y., Wei, F., Zhuo, Rui., Fan, F., Liu, H., Zhang, C., Ma, L., Jiang, M., y Zhang, X. (2013).** Enhancing the laccase Production and laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological applications by different metal ions and aromatic compounds. *PLoS One* , **8**: e79307.

**Yaver, D.S., Overjero, M.D., Xu, F., Nelson, B.A., Brown, K.M., Halkier, T., Bernauer, S., Brown, S.H. y Kauppinen, S. (1999.)** Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase lcc1. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4943-4948.

**You, L.F., Liu, Z.M., Lin, J.F., Guo, L.Q., Huang, X.L. y Yang, H.X. (2014).** Molecular cloning of a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and heterologous expression in *Pichia pastoris*. *J. Basic. Microbiol.* **54**: 134-141.

---

**Z**

**Zhao, D., Zhang, X., Cui, D. y Zhao, M. (2012).** Characterization of a novel white laccase from the deuteromycete fungus *Myrothecium verrucaria* NF-05 and its decolourisation of dyes. *Plos ONE* **7**: e38817. doi:10.1371/journal.pone.0038817.

**Zhang, C., Zhang, S., Diao, H., Zhao, H., Zhu, X., Lu, F. y Lu, Z. (2013).** Purification and characterization of a temperature and pH stable laccase from the spores of *Bacillus vallismortis* fmb-103 and its application in the degradation of malachite Green. *J. Agric. Food. Chem.* **61**: 5468-5473.



## **VI. CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos en esta tesis podemos formular las siguientes conclusiones.

1. Compuestos aromáticos como la vainillina y el SAHA son buenos inductores de la actividad lacasa de. Ambos aumentan la producción de lacasa estimulando la transcripción del gen.
2. Aunque el efecto los inhibidores de histona desacetilasas solo lo hemos definido para cepas de dos especies de hongos filamentosos, los resultados sugieren la generalización de su efecto inductor y posible utilidad incrementando la transcripción de los genes de lacasa de hongos filamentosos de interés biotecnológico.
3. Por primera vez hemos logrado la expresión heteróloga del gen de la lacasa de *P.flavido-alba* en *Aspergillus niger* y la secreción de la lacasa recombinante en el ambiente extracelular del cultivo.
4. La purificación del enzima recombinante de los cultivos de *A. niger* es más fácil y con mayor rendimiento que la de la forma nativa.
5. La comparación de ambas enzimas concluye que la lacasa recombinante mejora varias propiedades de la enzima nativa.
  - 5.1. Ambas enzimas muestran el mismo pH óptimo de actividad pero la enzima recombinante fue más estable a pHs entre cinco y seis que la nativa.
  - 5.2. En relación a la estabilidad a disolventes orgánicos, la enzima recombinante fue más estable a todos los disolventes ensayados que la enzima nativa.
  - 5.3. La enzima recombinante se mostró menos sensible a los inhibidores ensayados que la enzima nativa. Para ambas enzimas fue la azida sódica el compuesto que más inhibición provoco sobre la actividad de ambas enzimas.
  - 5.4. La lacasa recombinante mostró una mayor tolerancia a los iones que la enzima nativa. Mientras que algunos iones como se comportaron como inhibidores, el  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  aumentaron la oxidación del ABTS (probablemente

se comportan como inductores), más para la enzima recombinante que para la nativa.

5.5. En cuanto a las constantes cinéticas de ambas enzimas:  $K_m$  y  $V_{max}$ , la enzima recombinante presentó mayor afinidad por ambos sustratos ABTS y 2,6-DMF es decir menores valores de  $K_m$ . No obstante ambas enzimas fueron más afines para el 2,6-DMF que para el ABTS y menos para el hierro es decir son verdaderas lacasas con menor actividad ferroxidasa.

5.6. Ambas enzimas decoloraron los colorantes textiles ensayados (NY1 y RBBR) aunque solo la enzima recombinante fue capaz de degradar el NY1. Que se sepa es la primera vez que se describe la degradación de este colorante por una lacasa.

5.7. Para nuestro mejor conocimiento este trabajo supone la primera demostración de la oxidación del tinte textil NY1 por una lacasa fúngica, si bien solo por la forma recombinante de la enzima.

## Conclusions

A partir des résultats obtenus dans cette thèse, nous pouvons formuler les conclusions suivantes

1. Des composés aromatiques comme la vanilline (2,3, diméthoxybenzylalcohol) et le SAHA (histone désacétylase) sont considérés comme de bons inducteurs de l'activité lacase de *Phanerochaete flavido-alba* et de *Trametes versicolor*. En effet, les deux composés ont permis d'augmenter la production de la lacase en stimulant la transcription du gène correspondant.
2. Bien que, nous avons seulement définis l'effet des inhibiteurs des histones désacétylase pour les deux espèces de champignons filamenteux, les résultats relatifs à son effet inducteur pourraient être étendus à d'autres espèces pour étudier la possibilité d'augmenter la transcription des gènes codant pour les laccases en général.
3. Ces travaux décrivent pour la première fois, l'expression hétérologue du gène de la lacase de *P. flavido-alba* chez *Aspergillus niger*.
4. La purification de l'enzyme recombinante à partir des cultures de *A. niger* est plus facile qu'avec la lacase native. De plus, le rendement de purification s'est révélé être plus élevé qu'avec la protéine native.
5. On peut conclure, à partir de la comparaison des propriétés des enzymes native et recombinante, que ces deux protéines possèdent quelques différences.
  - 5.1. Les deux enzymes ont par exemple le même pH d'activité optimum, mais l'enzyme recombinante est plus stable à pH 5-6.
  - 5.2. En ce qui concerne la stabilité aux solvants organiques, l'enzyme recombinante est stable à tous les solvants testés.
  - 5.3. L'enzyme recombinante s'est montrée moins sensible aux inhibiteurs testés. Pour les deux enzymes, l'azide de sodium est le composé majeur inhibant l'activité des deux enzymes.
  - 5.4. La lacase recombinante a une plus grande tolérance aux ions que l'enzyme native. Pour exemple, le  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  ont permis d'augmenter l'oxydation de l'ABTS (ils se comportent probablement comme inducteurs). Cet effet positif est plus marqué pour l'enzyme recombinante.

5.5. En ce qui concerne les constantes cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$  des deux enzymes), l'enzyme recombinante présente une plus grande affinité par les deux substrats ABTS et 2,6-DMF. Cependant, les laccases recombinante et native présentent moins d'affinité pour le fer ce qui nous permis de dire que la laccase de *P.flavido-alba* est une vraie laccase avec une activité ferroxidase faible.

5.6. Les deux enzymes ont permis de décolorer les colorants textiles testés (NY1 et RBBR) bien que seulement l'enzyme recombinante a été capable de dégrader le NY1.

5.7. C'est le premier travail démontrant l'oxydation du colorant textile NY1 par une laccase fongique, bien que seulement par la forme recombinante de l'enzyme soit active sur ce colorant.



## VII. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b><u>Figuras:</u></b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema de la localización de los principales componentes de la pared celular de los tejidos leñosos vegetal. P: pared primaria, S1-S3: capas de la paredes celular secundarias y ML: lámina media (Kirk y Cullen, 1998).	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Precursores fenilpropano de la unidad estructural de la lignina.	<b>5</b>
<b>Figura 3.</b> Modelo estructural de la lignina de coníferas basado en el propuesto por Adler (1977). Se indica con una flecha el tipo de enlace mayoritario $\beta$ -O-4.	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Ciclo catalítico de la LiP tomado de Wong, 2009.	<b>10</b>
<b>Figura 5.</b> Ciclo catalítico de la MnP tomado de Hofrichter, 2002.	<b>11</b>
<b>Figura 6.</b> Ciclo catalítico de la lacasa tomado de Baldrian, 2006.	<b>24</b>
<b>Figura 7. A)</b> Estructura tridimensional de la lacasa de <i>Trametes versicolor</i> mostrando los canales de entrada de oxígeno y salida de agua (esferas de color rojo) (tomado de Piontek y col., 2002). <b>B)</b> Representación del centro T2/T3 de la lacasa de <i>T. troggi</i> mostrando la superficie del canal de oxígeno (en la parte superior) y del canal de agua (en la parte inferior) (tomado de Matera y col., 2008).	<b>24</b>
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática del ciclo de oxidorreducción de sustratos catalizado por el sistema lacasas-mediador.	<b>26</b>
<b>Figura 9.</b> Estructuras químicas más comunes de los colorantes textiles.	<b>37</b>
<b>Figura 10.</b> 3 metoxi bencil alcohol.	<b>85</b>
<b>Figura 11.</b> Ácido suberanilo hidroxámico: Vorinostar (SAHA).	<b>85</b>
<b>Figura 12.</b> Sustratos de la lacasa nativa y recombinante de <i>P. flavido-alba</i> .	<b>103</b>
<b>Figura 13.</b> Estructura química del colorante NY-1 (ácido 3-(4-(4-(bis(2-hidroxietil) amino) fenildiazenil) naftalen-1-il) diazenil) benceno sulfónico.	<b>105</b>

**Figura 14.** Acumulación de la actividad lacasa en los cultivos de 10 días de incubación (los resultados representan valores promedio y desviación estándar de tres repeticiones). **114**

**Figura 15.** Perfil cromatográfico de la columna de intercambio aniónico Hi-Trap (Amersham, Pharmacia) de la lacasa de *P. flavido-alba* crecido en medio BL suplementado con vainillina. Absorbancia a 280 nm (----) y a 405 nm (—). **115**

**Figura 16.** Perfil cromatográfico de la columna Superosa 12 de exclusión molecular (Amersham, Pharmacia) de lacasa de *P. flavido-alba* crecido en medio BL suplementado con vainillina. Absorbancia a 280 nm (----) y a 405 nm (—). **116**

**Figura 17.** SDS-PAGE (a) de fluidos extracelulares de *P. flavido-alba*. Western blot (b), (1): control (cultivos sin inductor) (2): cultivos añadidos de NN-dimetil formamida, (3): cultivos añadidos de vainillina, (C): lacasa purificada de cultivos inducidos con vainillina. **118**

**Figura 18.** Actividad lacasa en cultivos de *P. flavido-alba* en medio basal (BL), y en medio basal añadidos de vainillina (VAN, 1mM), de SAHA (100  $\mu$ M) o de NN-dimetil formamida (DMF). **119**

172

**Figura 19.** Actividad lacasa en cultivos de *T. versicolor* en medio basal (BL) y en medio basal añadidos de vainillina (VAN, 1mM), de SAHA (100  $\mu$ M) o de NN-dimetil formamida (DMF). **120**

**Figura 20.** SDS-PAGE de los fluidos extracelulares de cultivos de 24 horas de *P. flavido-alba* cultivos añadidos de SAHA (1), cultivos añadidos de NN-dimetil formamida (2), cultivos añadidos de vainillina (3), control (cultivos sin inductor) (4). **121**

**Figura 21.** SDS-PAGE de los fluidos extracelulares de cultivos de 24 horas de *T. versicolor*, cultivos añadidos de NN-dimetil formamida (1) cultivos añadidos de SAHA (2), cultivos añadidos de vainillina (3), control (cultivos sin inductor) (4). **122**

**Figura 22.** Niveles de expresión del gen *pfal* a diferentes tiempos de incubación (6, 12, 24, 48 y 72 horas) en cultivos en medio basal (BL), en medio basal añadidos de NN-dimetil formamida (DMF), de vainillina (VAN) (1mM), y de SAHA (100  $\mu$ M). **123**

**Figura 23.** Niveles de expresión del gen *TvL* de *T. versicolor* a 6, 12, 24, 48 y 72 horas en cultivos en medio basal (BL), en medio basal añadidos de NN dimetilformamida (DMF), de vainillina (VAN 1mM), y de SAHA a 100  $\mu$ M. **124**

<b>Figura 24.</b> Mapa del vector pAN52-4-pfaL indicando los puntos de corte y los elementos genéticos que porta. <i>PgpdA</i> , promotor; <i>ss</i> , secuencia señal; <i>pfaL</i> , gen de la lacasa; <i>TrpC</i> , terminador transcripcional; <i>bla</i> , gen de la beta-lactamasa.	<b>125</b>
<b>Figura 25.</b> Detección de transformantes de <i>A. niger</i> que expresan PfaLr (forman el halo verde de oxidación de ABTS) en Agar-ABTS.	<b>126</b>
<b>Figura 26.</b> Cinética de acumulación de la actividad lacasa recombinante (■) en cultivos de <i>A. niger</i> . La actividad se determinó por (oxidación de ABTS). (▲) pH de los cultivos.	<b>128</b>
<b>Figura 27.</b> Perfil cromatográfico obtenido en la columna de intercambio aniónico de las preparaciones crudas de PfaLr. Absorbancia a 280 nm (azul) y a 450 nm (rojo).	<b>129</b>
<b>Figura 28.</b> Perfil cromatográfico obtenido en la columna de exclusión molecular Superosa 12 de los sobrenadantes semipurificados de PfaLr. Absorbancia a 280 nm (azul) y a 450 nm (rojo).	<b>130</b>
<b>Figura 29.</b> SDS-PAGE (a) de la PfaLr purificada y Western blot (b). 1: PfaLr purificada; 2: concentrado del fluido extracelular de los cultivos de <i>A. niger</i> PfaL. (C): <i>A. niger</i> sin transformar.	<b>132</b>
<b>Figura 30.</b> Oxidación de ABTS a diferentes pHs por la lacasa nativa de <i>P. flavidoalba</i> (▲) y por PfaLr (■).	<b>133</b>
<b>Figura 31.</b> Estabilidad enzimática frente al pH (durante 24 horas a 30°C) de la lacasa recombinante (PfaLr) (■) y la nativa (▲).	<b>134</b>
<b>Figura 32.</b> Actividad enzimática residual de soluciones de PfaLr (■) y de lacasa nativa (▲) mantenidas una hora a diferentes temperaturas.	<b>135</b>
<b>Figura 33.</b> Efecto de los disolventes orgánicos en la actividad de la lacasa PfaLr (a) y la lacasa nativa (b). NN dimetilformamida (DMF) Dimetilsulfóxido (DMSO). La actividad sin la adición de los disolventes orgánicos fue considerada al 100%.	<b>136</b>
<b>Figura 34.</b> Influencia de diferentes metales en la oxidación del ABTS por las lacasas recombinante y nativa.	<b>139</b>
<b>Figura 35.</b> Decoloración de RBBR (a) y NY1 (b) por la lacasa recombinante (■) y nativa (▲).	<b>140</b>

<b>Figura 36.</b> Espectro de masa del tinte textil NY-1.	<b>141</b>
<b>Figura 37.</b> Espectro de masa del tinte NY1 decolorado por la lacasa nativa.	<b>142</b>
<b>Figura 38.</b> Espectro de masa del tinte NY1 decolorado por la lacasa recombinante. Producto de oxidación parcial.	<b>143</b>

<b><u>Tablas:</u></b>	<b>Pág.</b>
-----------------------	-------------

<b>Tabla 1.</b> Posible función biológica de las principales oxidasas multicobre tipo lacasa descritas en procariotas (Modificado de Sharma y col., 2007).	<b>15</b>
<b>Tabla 2.</b> Lacasas expresadas heterológicamente.	<b>28</b>
<b>Tabla 3.</b> Preparaciones comerciales de lacasas disponibles para uso industrial (tomado de Osma y col., 2010).	<b>34</b>
<b>Tabla 4.</b> Medio YMPG.	<b>77</b>
<b>Tabla 5.</b> Composición de la solución de elementos traza del medio de cultivo MB.	<b>78</b>
<b>Tabla 6.</b> Composición de nutrientes orgánicos del medio de cultivo MB.	<b>79</b>
<b>Tabla 7.</b> Medio de cultivo para ascomicetos.	<b>80</b>
<b>Tabla 8.</b> Solución de sales con nitrógeno (50X) para el medio de cultivo de ascomicetos.	<b>81</b>
<b>Tabla 9.</b> Solución de elementos traza (1000X) para el medio de cultivo de ascomicetos.	<b>81</b>
<b>Tabla 10.</b> Medio de Luria-Bertrani.	<b>83</b>
<b>Tabla 11.</b> Composición de los geles de acrilamida al 12%.	<b>88</b>
<b>Tabla 12.</b> Composición del tampón de electroforesis de carrera para SDS.	<b>88</b>

<b>Tabla 13.</b> Composición del tampón para hervir la muestra para SDS .	<b>89</b>
<b>Tabla 14.</b> Composición de los patrones de proteínas (Pharmacia) para SDS.	<b>89</b>
<b>Tabla 15.</b> Composición del tampón PBST para Western Blot.	<b>91</b>
<b>Tabla 16.</b> Reactivos para la reacción de QPCR.	<b>93</b>
<b>Tabla 17.</b> Composición del tampón TAE para geles de agarosa.	<b>96</b>
<b>Tabla 18.</b> Composición de la mezcla de reacción de ligación al vector de clonación.	<b>97</b>
<b>Tabla 19.</b> Composición del buffer Myc Wash para la cotrasnformación.	<b>99</b>
<b>Tabla 20.</b> Composición del tampón Britton y Robinson.	<b>102</b>
<b>Tabla 21.</b> Purificación de la lacasa PfaL. U unidad internacional de actividad.	<b>118</b>
<b>Tabla 22.</b> Purificación de la PfaLr producida por <i>A. niger</i> . IU unidad internacional de actividad.	<b>131</b>
<b>Tabla 23.</b> Constantes cinéticas de las reacciones de oxidación de tres sustratos catalizadas por la lacasa recombinante y nativa.	<b>137</b>
<b>Tabla 24.</b> Interferencia de varios sustancias de la oxidación de ABTS por la lacasa recombinante y nativa.	<b>138</b>

## Production of the *Phanerochaete flavido-alba* laccase in *Aspergillus niger* for synthetic dyes decolorization and biotransformation

Lamia Benghazi · Eric Record · Antonio Suárez ·  
José A. Gomez-Vidal · José Martínez ·  
Teresa de la Rubia

Received: 13 May 2013 / Accepted: 15 July 2013  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

**Abstract** We investigated the expression of *Phanerochaete flavido-alba* laccase gene in *Aspergillus niger* and the physical and biochemical properties of the recombinant enzyme (rLac-LPFA) in order to test it for synthetic dye biotransformation. *A. niger* was able to produce high levels of active recombinant enzyme ( $30 \text{ mgL}^{-1}$ ), whose identity was further confirmed by immunodetection using Western blot analysis and N-terminal sequencing. Interestingly, rLac-LPFA exhibited an improved stability at pH (2–9) and organic solvents tested. Furthermore, the percentage of decoloration and biotransformation of synthetic textile dyes, Remazol Brilliant Blue R (RBBR) and Acid Red 299 (NY1), was higher than for the native enzyme. Its high production, simple purification, high activity, stability and ability to transform textile dyes make rLac-LPFA a good candidate for industrial applications.

**Keywords** Laccase · Heterologous expression · *Phanerochaete flavido-alba* · Solvent-tolerant · Dye biotransformation

### Introduction

Laccases have been intensively investigated during the last decades due to their multiple industrial and biotechnological applications, as well as to their ability of act on wide range of substrates (Kunamneni et al. 2008a; Martínez et al. 2009; Arora and Sharma 2010). Regarding this, laccases are currently considered as high-valued industrial enzyme. Some promising industrial applications for laccases include decolorization and detoxification of textile dyes, pulp bleaching, wine clarification, biosensors, bioremediation, organic synthesis and others (Mayer and Staples 2002; Kunamneni et al. 2008b; Mikolasch and Schauer 2009).

The textile industry accounts for two-thirds of the total dyestuff market (Riu et al. 1998) and consume large volumes of water and chemicals for wet processing of textiles. The discharges of wastewater are the main cause of the harmful environmental impact of the textile industry. Robinson et al. (2001) estimated about 10–15 % of textile dyes are discharged into waterways as effluent and effluents discharged from such industries consist of high sodium, chloride, sulphate, hardness and carcinogenic dye ingredients. Major pollution by textile wastewater comes from dyeing and wastewater is characterized by high suspended solids, chemical oxygen demand (COD), heat, colour, acidity and other soluble substances (World Bank 2007).

Many teams have reported the production of laccases from wild-type filamentous fungi but the main bottleneck to using laccases in industrial processes is their low production yield (Gianfreda et al. 1999; Kunamneni et al.

L. Benghazi · J. Martínez · T. de la Rubia (✉)  
Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University  
of Granada, Campus Cartuja, 18071 Granada, Spain  
e-mail: dlrubia@ugr.es

E. Record  
INRA, Polytech Marseille, UMR 1163 de Biotechnologie des  
Champignons Filamenteux, Aix Marseille Université, CP 925,  
13228 Marseille cedex 09, France

A. Suárez  
Department of Biochemistry and Molecular Biology 2,  
University of Granada, Campus Cartuja, 18071 Granada, Spain

J. A. Gomez-Vidal  
Department of Organic Chemical, Faculty of Pharmacy,  
University of Granada, Campus Cartuja, 18071 Granada, Spain

2008b), which means productivity is generally low and the final cost of the enzymes is too high for applications in the biotechnology sector.

To reach higher production levels, genetically modified strains have been developed with fungal hosts that are naturally able to producing high amounts of extracellular enzymes. Various filamentous fungi such as *Aspergillus* and *Penicillium* offer a number of advantages for heterologous protein production, including their ability to secrete large amounts of proteins in culture media, and several studies have compiled a substantial volume of data on their large-scale cultivation (Demain and Vanishnav 2009).

To improve production yield, heterologous production of fungal laccases has been carried out in various hosts such as *Aspergillus oryzae* (Yaver et al. 1996), *Aspergillus niger* (Record et al. 2002) and *Trichoderma reesei* (Kiskinen et al. 2004), and various yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* (Piscitelli et al. 2005), *Pichia pastoris* (Hong et al. 2007), *Pichia methanolica* (Guo et al. 2005), *Yarrowia lipolytica* (Madzak et al. 2005) and *Kluyveromyces lactis* (Piscitelli et al. 2005).

Recombinant laccases have been widely applied in bioremediation purposes, especially for the treatment of synthetic dyes (Lu et al. 2009), thus, the purified recombinant LccI from *Trametes trogii*, produced in *P. pastoris* differently decolorizes several synthetic textile dyes, depending on their chemical structures. Moreover, this enzyme has proved to be stable and active in the presence of moderate amounts of organic solvents (Colao et al. 2006). A potential use of a recombinant *Pycnoporus sanguineus* laccase produced in *P. pastoris* for the treatment of dye-containing effluents has also suggested by Lu et al. 2009 in light of its remarkable ability to degrade, at different extents, four synthetic dyes belonging to different classes (azo, anthraquinone, triphenylmethane and indigo (Lu et al. 2009).

In previous studies, our group showed that the white-rot fungus *P. flavido-alba* produces a laccase (Pérez et al. 1996) that has been biochemical and molecular characterized (de la Rubia et al. 2002), and the corresponding gene has been cloned and sequenced (Rodríguez-Rincón et al. 2010). The present study shows the heterologous expression of the laccase gene from *P. flavido-alba* in *A. niger* in order to study the main enzyme properties of the recombinant and test its ability to decolorize synthetic dyes in optimal conditions.

## Materials and methods

### Organisms and culture media

*Escherichia coli* XLI-blue (Stratagene, Heidelberg, Germany) was maintained on Luria-Bertani medium (LB)

with 20 % glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$ . This strain was used for construction and propagation of vectors.

*Aspergillus niger* strain D15#26 (*pyrG*<sup>-</sup>) (Gordon et al. 2000) was used for heterologous expression and maintained at  $4^{\circ}\text{C}$  as a spore suspension in 0.9 % NaCl. After co-transformation with vectors containing the *pyrG* gene and laccase encoding cDNA, respectively, *A. niger* was grown at  $30^{\circ}\text{C}$  on selective minimal medium plates (without uridine) containing, per liter, 70 mM NaNO<sub>3</sub>, 7 mM KCl, 11 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, glucose 55 mM), 1 ml of trace elements (1,000 × stock solution consists of: 76 mM ZnSO<sub>4</sub>, 178 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 25 mM MnCl<sub>2</sub>, 18 mM FeSO<sub>4</sub>, 7.1 mM CoCl<sub>2</sub>, 6.4 mM CuSO<sub>4</sub>, 6.2 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 174 mM EDTA) and 8 g Agar, pH 5.0. For assays screening for laccase-producing transformants, this medium was supplemented with 0.2 mM 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazolidine-6-sulfonic acid (ABTS).

### Expression vector construction

*Phanerochaete flavido-alba* was cultivated in induced culture medium (de la Rubia et al. 2002), frozen to  $-80^{\circ}\text{C}$ , and its RNA was extracted using the RNeasy Plant mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. The RNA was subsequently reverse-transcribed using oligo (dT) primer and superscript reverse transcriptase (Life Technologies, Madrid, Spain). The cDNA encoding for *P. flavido-alba* laccase was amplified with primers GCGCG CAGACACTGTCTCGCTTCCATCC (*AnigerPfalF*) and AAGCTTCAGGCCGAGCATTGATCCAC (*AnigerPfalR*), (restriction sites, *Bss*HIII and *Hind*III, are underlined) using a high fidelity DNA polymerase (Applied Biosystem). The PCR product was cloned in pGEM-T (Promega, Madison, USA) and checked by sequencing (GenBank: EF446161.1). The correct PCR product was then recovered from pGEM-T after digestion with *Bss*HIII and *Hind*III and ligated to the vector pAN52-4 that was predigested with the same restriction enzymes (EMBL Z32750). The resulting expression vector was named pLac-pfa.

In pLac-pfa, the codes of the 25 amino acids of the laccase signal peptide were replaced by the 24-amino-acid glucoamylase (GLA) preprosequence from *A. niger*. In this construct, the *A. nidulans* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gpdA*) promoter, the 5' untranslated region of the *gpdA* mRNA, and the *A. nidulans trpC* terminator were used to drive the expression of the laccase-encoding sequence.

### *Aspergillus* transformation and screening of the transformants

Fungal cotransformation was basically carried out as described by Punt and van den Hondel (1992), using the

laccase expression vector (10 µg) pLac-pfa and the vector pAB4-1 (van Hartingsveldt et al. 1987) containing the *pyrG* selection marker in a 10:2 ratio. Transformants were selected for uridine prototrophy. Agar plates containing a selective medium (minimal medium without uridine) with 200 µM ABTS were used for the selection of laccase-secreting transformants. Plates were incubated for 10 days at 30 °C and checked for development of a green zone around the colonies that indicates laccase activity.

In order to test laccase production in liquid medium, 50 ml of culture medium (70 mM NaNO<sub>3</sub>, 7 mM KCl, 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, glucose 10 % (w/v), 1 ml of trace elements, adjusted to pH 5 with a 1 mM citric acid solution) were inoculated by 1 × 10<sup>6</sup> spores/ml in a 300 ml flask. The culture was monitored for 5 days at 30 °C in a shaker incubator (200 rpm). pH was adjusted daily to 5 with 1 mM citric acid. For protein purification, 1,000 ml of culture was prepared in 300 ml flasks under the same conditions.

#### Recombinant laccase production in submerged fermentation

In order to test laccase production, pH was adjusted daily to 5 with 1 mM citric acid. To assay laccase activity, aliquots (1 ml of culture medium) were collected daily and the cells removed by filtration (0.45 µm). Laccase activity was then measured by monitoring the oxidation of 500 µM ABTS at 436 nm to the respective radical ( $\epsilon_{436} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) in the presence of 50 mmol<sup>-1</sup> sodium tartrate pH 3 (optimum pH for *P. flavido-alba* laccase) at 30 °C as described in Sigoillot et al. (1999). Activity is indicated in international units (U) as the amount of laccase that oxidizes 1 µmol of substrate per min.

Agar plates containing a selective medium (minimal medium without uridine) with 200 µM ABTS were used for the selection of laccase-secreting transformants. Plates were incubated for 10 days at 30 °C and checked for development of a green zone around the colonies that indicates laccase activity.

#### Purification of recombinant laccase produced by *A. niger*

In order to get an homogenous fraction of the recombinant laccase, 1,000 ml of culture medium (2,500 U l<sup>-1</sup>) was filtered (0.45 µm) and concentrated by ultrafiltration through a cellulose membrane (molecular mass cut-off of 10 kDa) in a Filtron system (Pall, Madrid, SP) and dialyzed twice against 10 mM sodium acetate buffer (pH 5) for 3 h at 4 °C. After dialysis, the concentrate (6 ml) was applied onto a HiTrap for anion-exchange (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) equilibrated with a 10 mM sodium

acetate buffer (pH 5). The column was washed with the same buffer at a flow rate of 2 ml min<sup>-1</sup> to remove unbound proteins. Bound laccase was eluted from the column with a salt gradient (1 M NaCl) in the same buffer at a flow rate of 2 ml min<sup>-1</sup>. Elution was monitored for absorbance at 450 and 280 nm for protein detection. The fractions showing laccase activity were pooled, concentrated, and dialyzed against a 10 mM sodium acetate buffer (pH 5). The concentrate was then applied onto a gel filtration superose 12 PC column (GE Healthcare) in a 0.2 mol l<sup>-1</sup> sodium acetate buffer (pH 5) and eluted at a flow rate of 0.5 ml min<sup>-1</sup> in the same buffer. Fractions containing laccase activity were pooled, concentrated, dialyzed, and stored at -20 °C.

#### Characterization of the recombinant laccase

##### Protein assay and N-terminal sequencing

Protein concentration was determined using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Heidmannstrabe, Munich, Germany) based on the Bradford procedure, using bovine serum albumin as standard. Protein purification was followed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 12 % gel (Laemmli 1977). Protein bands were stained using silver Staining Plus kit (Bio-Rad). Polyacrylamide gels were performed using a molecular mass standard (GE Healthcare). The N-terminal (3 first amino acids) was determined according to Edman degradation (Edman et al. 1950). Analysis was carried out on an Applied Biosystems model 470.

##### Western blot analysis and laccase immunodetection

Purified proteins were electrophoresed on a 12 % SDS polyacrylamide gel at 150 V and blotted onto a nitrocellulose membrane at 100 V at room temperature for 1 h (Sambrook et al. 1989). The membranes were subsequently blocked at room temperature for 1 h with PBST buffer (100 mM NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 80 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Tween 20, pH 7.2) supplemented with skimmed milk (5 % v/v). We raised polyclonal antibodies by immunizing rabbits against native purified *P. flavido-alba* laccase. Membranes were incubated with a 1:100 dilution of rabbit polyclonal antibodies for 2 h at 37 °C. After three washes with PBST buffer, the membranes were incubated with the solution of skimmed milk and peroxidase-conjugated goat anti-immunoglobulin G (rabbit Ig) (SIGMA-ALDRICH) (1:3,000) for 2 h at 37 °C. After three washes with PBST buffer, the membranes were developed using Enhance ChemiLuminescence detection reagent (GE Healthcare).

#### Optimum pH, temperature and pH stability of the laccase

The optimum pH and effect of pH on enzyme stability of laccase were studied. The optimum pH was studied by incubating purified laccase in 100 mM Britton and Robinson buffer (0.04 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.04 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.04 M CH<sub>3</sub>COOH) in a pH range between 2 and 9 (adjusted with NaOH) at 30 °C. Aliquots (12 µl) of purified laccase were transferred in standard reaction mixture (138 µl buffer, 50 µl of ABTS 93.2 mM) to determine laccase activity in triplicate. Enzymatic activity between recombinant and native enzyme was compared under the same conditions.

The effect of pH on laccase stability was studied by incubating purified laccase in 100 mM Britton and Robinson buffer in a pH range between 2 and 9 (adjusted with NaOH) for 24 h at 30 °C. Purified laccase 12 µl (2.1 U), was assayed in a standard reaction mixture (138 µl buffer, 50 µl of ABTS 93.2 mM) to determine laccase activity in triplicate. Thermal stability of the enzyme was determined in the same conditions at pH 5 in the temperature range 30–60 °C for 60 min. Purified laccase 12 µl (2.1 U), was tested in a standard reaction mixture (138 µl buffer, 50 µl of ABTS 93.2 mM) to determine laccase activity in triplicate. The activity determined before preincubation was taken as 100 %. Enzymatic activity between recombinant and native enzyme was compared under the same conditions.

#### Organic solvent-tolerance of the laccase

Organic solvent-tolerance was tested by incubating 12 µl (2.1 U) of purified laccase at 30 °C from 1 to 3 h in the presence of 10 and 50 % (v/v) of a panel of organic solvents, including acetonitrile, acetone, ethanol, methanol, dimethylformamide (DMF) and dimethyl sulfoxide (DMSO). The activity was assayed as described above, in standard conditions.

#### Dye decolorization

Purified recombinant and native laccases were tested for decolorization of two dyes: an anthraquinonic dye (Remazol Brilliant Blue (RBBR); Sigma, Deisenhofen, Germany) and a diazo dye (Acid Red 299 (NY1), Yorkshire Europe, Tetre, Belgium). The decolorization assay was performed in microtiter plates in a reaction volume of 200 µl per well. The reaction mix contained 0.19 mg purified enzyme and 0.2 % (w/v) dye in pH 3 glycine–HCl buffer. Samples were incubated for 220 min at 30 °C under mild shaking conditions. To evaluate dye decolorization, absorbance was measured at 590 nm for RBBR and 520 nm for NY1, and calculated according to Guo et al. (2008). Decolorization was expressed as a % in respect to

enzyme-free control samples. The assays were performed in triplicate.

#### LC–MS analysis

The removal studies were performed in microtiter plates in a reaction volume of 200 µl per well. The reaction mix contained 0.19 mg of purified native, recombinant enzyme and the dye NY1 (Acid Red 299 (NY1) at final concentration of 1 g l<sup>-1</sup> previously prepared in glycine–HCl buffer (pH 3.0 corrected). After 3 h at room temperature, the mixture was purified using RP-C18 cartridge. Samples was collected and analyzed in a LC–MS instrument. The liquid chromatograph (Alliance HT 2795, waters) was connected to a ESI-TOF detectors (LCT Premier Xe, Micromass Technologies). A RP-C18 HPLC was used (3.9 mm × 150 mm, Nova Pak). The LC was set up as follows: channel A containing water + 0.1 % formic acid; channel B containing acetonitrile (ACN) + 0.1 % formic acid; flow rate 0.5 ml min<sup>-1</sup>; time 0 (50:50 H<sub>2</sub>O/ACN), time 20 (10:90 H<sub>2</sub>O/ACN), time 21 (50:50 H<sub>2</sub>O/ACN). The LC–MS analysis was set up in a scan negative mode and masses of 100–700 amu were investigated.

## Results

#### Heterologous expression of *P. flavido-alba* laccase cDNA in *A. niger*

##### *Transformation and screening*

In a cotransformation experiment, *A. niger* D15#26 was transformed with a mixture of the expression vector pLac-pfa and the plasmid pAB4-1, containing the *pyrG* gene used for selection. Transformants were selected for their ability to grow on minimal medium plates without uridine. Approximately 100 uridine prototrophic transformants were obtained per 10 µg of expression vector. Cotransformants were tested for laccase production by growth on minimal medium plates supplemented with ABTS. Recombinant-expressing clones were identified by the appearance of a green zone around the colonies after 5–6 days of growth at 30 °C. Twenty positive clones were assayed for optimal laccase production. Results for laccase activity ranged from 100 to 2,500 U l<sup>-1</sup> after 5 days in culture. The best clone was selected for further larger scale investigation.

#### Time-course of recombinant laccase production in *A. niger*

The selected clone demonstrated laccase activity in the culture medium, confirming that laccase was being secreted

by *A. niger*. Activity was not found in the control culture (*A. niger* transformed with pAB4-1, without *P. flavido-alba* laccase gene construct pLac-pfa). In liquid culture medium, laccase activity increased rapidly after 3 days of incubation at 30 °C, and then gradually reached a peak of 2,500 U l<sup>-1</sup> that remained stable until day 5 of culture. There was a decrease on the enzyme production (up to 500 U l<sup>-1</sup>) from 5 to 7 days. The abrupt decline of laccase activity after 5 days could be due for the presence of proteolytic activity in the culture medium. Previous results reported a production of 0.557 U l<sup>-1</sup> laccase obtained from *P. flavido-alba* culture (Pérez et al. 1996).

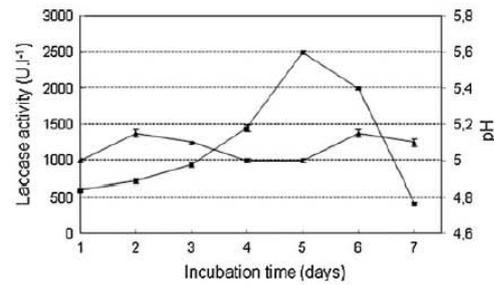
#### Protein purification and physical–chemical characterization

The recombinant laccase (rLac-LPFA) was purified from culture medium of *A. niger* by two successive chromatographic steps. Table 1 shows the purification yield of rLac-LPFA. One liter of culture medium was concentrated 40.8-fold by ultrafiltration with a yield recovery of 75.6 %. The concentrated culture medium was then loaded onto a Hi-Trap column (recovery of 38.92 %) and subsequently onto a Superose gel filtration column with final yield of 3.8 mg of rLac-LPFA and a specific activity of 92.1 U mg<sup>-1</sup>, compared to 18.4 U mg<sup>-1</sup> of native laccase (Pérez et al. 1996) (Fig. 1).

SDS-PAGE analysis confirmed the homogeneity of the enzyme (Fig. 2a). Purified rLac-LPFA constituted a single band of 97 kDa similar to the native enzyme (data not shown). In addition, SDS-PAGE analysis of the crude culture medium showed that the recombinant laccase was the main enzyme secreted by *A. niger*. Western blot analysis (Fig. 2b) using polyclonal antibodies raised against the native laccase showed also a unique band of 97 kDa, confirming the similarity between the native and recombinant laccases (Pérez et al. 1996). We also sequenced the first amino acids (GPHGQ) of the N-terminal sequence that were confirmed and corresponded to the laccase of *P. flavido-alba*.

#### Effect of pH and temperature on catalytic activity and stability

To determine the optimal pH of rLac-LPFA, enzymatic activity was measured at various pH values (pH 2–9) using



**Fig. 1** Time course of the recombinant laccase activity detected in the *A. niger* culture medium (filled square) and culture pH medium (filled triangle). The laccase activity was determined by ABTS oxidation. Results shown were the average of three independent experiments  $\pm$  SD

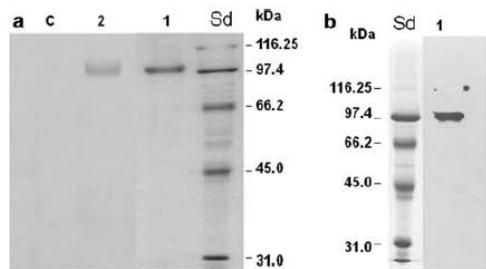
ABTS as substrate (Fig. 3a). The optimal pH value driving the maximum activity of the recombinant enzyme was pH 3, i.e. very similar to the native enzyme (Pérez et al. 1996), pH stability was studied between pH 2 and 9. Our results showed that the recombinant laccase was stable at pH 5 for 24 h. The pH activity profile (Fig. 3b) was very similar to native laccase from *P. flavido-alba* (Pérez et al. 1996) and gave a bell-shaped profile peaking at pH 5. However, rLac-LPFA was also stable at pH 6, while the native protein was only stable at pH 5 and retained only 20 % of the activity at pH 6 (Fig. 3b). Thermostability was investigated at pH 5 for 60 min at temperatures between 30 and 60 °C (Fig. 3c). Both rLac-LPFA and native laccase conserved 50 % residual activity after 60 min incubation at 40 °C, but activity decreased to less than 20 % at 50 °C.

#### Effect of different organic co-solvents

We investigated the effect of different water-organic solvents (acetonitrile, acetone, ethanol, methanol, DMF and DMSO) widely used in industrial applications (Fig. 4). While rLac-LPFA showed a better stability to most organic solvents retaining more than 70 % of its activity in DMF and DMSO (50 % V/V) after 3 h incubation at 30 °C acetone, acetonitrile, ethanol and methanol (50 % V/V) were less than 40 %.

**Table 1** Purification of the laccase from *P. flavido-alba* produced in *Aspergillus niger*

Purification step	Volume (mL)	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery %	Purification factor
Culture filtrate	1,000	320.5	2,500	7.8	100	1
Ultrafiltration	6	106.7	1,890	17.71	75.6	2
High-Trap	10	19.7	973	49.39	38.92	6
Superose	2	3.8	350	92.1	14	12



**Fig. 2** **a** SDS-PAGE gel and **b** Western blot analysis of the laccase production in the *A. niger* culture medium. Lanes: (1) purified laccase, (2) culture medium with recombinant laccase and (C) control culture *A. niger* transformed with pAB4-1 without pLac-pfa. *Sd* Standard molecular mass (Bio Rad). Gel stained with Staining Plus kit (Bio-Rad)

#### Dye decolorization

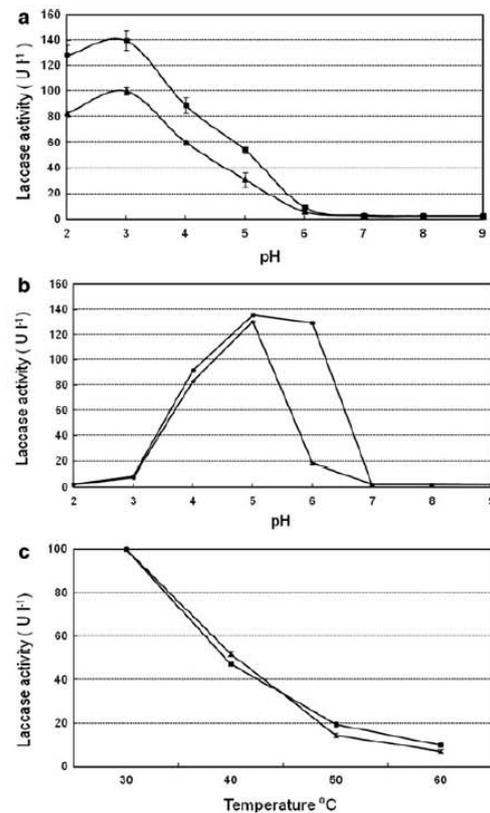
Recombinant and native laccases were compared for their ability to decolorize two synthetic dyes of different structures (RBBR and NY1). As shown in Fig. 5, both dyes were decolorized by both enzymes though were more effective in removing NY1 (70–100 %) than RBBR (40–60 %) of decolorization. While RBBR decolorization by both enzymes showed a similar time-course (Fig. 5a), NY1 decolorization was faster with rLac-LPFA (Fig. 5b). After 40 min incubation, NY1 decolorization was over 30 % for rLac-LPFA, but only 13 % for the native enzyme.

#### LC-MS results

LC-MS analysis affords different results depending on the laccase used for the NY-1 oxidation (Fig. 6, HRMS (ESI,  $m/z$ ) = 518.1506 [M-H]<sup>-1</sup>, calculated for C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S). The oxidation of the diazo dye NY1 by native laccase from *P. flavidio alba* led to the detection of two partially oxidized azo compounds (Fig. 7, a = HRMS (ESI,  $m/z$ ) = 334.1551 [M-H]<sup>-1</sup>, calculated for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 334.1556; b = HRMS (ESI,  $m/z$ ) = 311.0482 [M-H]<sup>-1</sup>, calculated for C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S 311.0490) and one fully oxidized sulfonic acid (Fig. 7, c = HRMS (ESI,  $m/z$ ) = 156.9965 [M-H]<sup>-1</sup>, calculated for C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S 156.9959). However, the oxidation mediated by recombinant laccase only showed the products a and c (Fig. 8). The product b was not detected indicating a more efficient oxidation of the azo group placed near the sulfonic acid on the diazo dye. Thus recombinant laccase is slightly more efficient than the native enzyme.

#### Discussion

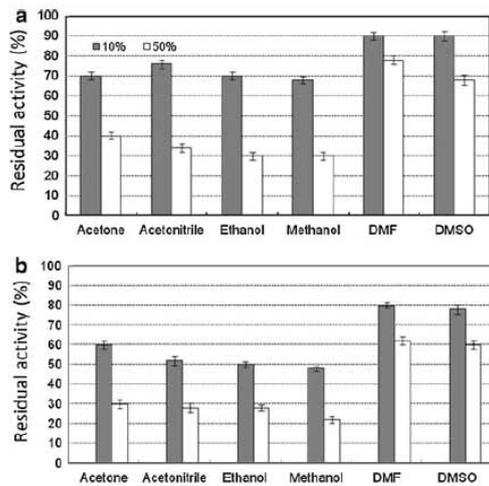
This work described the heterologous expression of *P. flavidio-alba* laccase in *A. niger* and its characterization as recombinant enzyme.



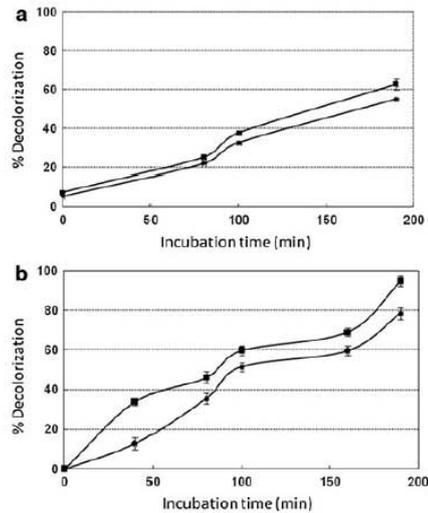
**Fig. 3** **a** Effect of pH on the activity of the purified proteins. **b** Effect of pH and **c** temperature, on the stability of the purified proteins. Recombinant (filled square) and native laccase (filled triangle). Results shown were the average of three independent experiments  $\pm$  SD

In our previous study, *P. flavidio-alba* laccase gene (GenBank accession number EF446161.1) was characterized and isolated in order to gain insight into laccase-encoding gene expression (Rodríguez-Rincón et al. 2010). However, like most laccases produced by fungi, its expression level was very low. Therefore, heterologous expression of functional *P. flavidio-alba* laccase is required to increased production for industrial application of this enzyme.

The sequence encoding the mature laccase protein of *P. flavidio-alba* was fused in frame with the *glaA* signal sequence, thereby replacing the native laccase signal sequence, under the control of the *glaA* gene promoter, generating vector pLac-pfa. This fusion system was proved to be efficient for heterologous expression of other fungal



**Fig. 4** Effect of different organic solvents on **a** the activity of the purified recombinant and **b** native laccase. Activity without addition of organic solvents was considered as 100 %. Results shown were the average of three independent experiments  $\pm$  SD



**Fig. 5** Time course for: **a** the Remazol brilliant blue R (RBBR) and **b** Acid red 299 (NY1) decolorization of the purified recombinant (filled square) and native laccase (filled triangle). Results shown were the average of three independent experiments  $\pm$  SD

laccases (Record et al. 2002; Sigoillot et al. 2004). With this construct, laccase activity was found in the extracellular medium of transformed *A. niger* cultures, and production level reached  $30 \text{ mg l}^{-1}$ . This is a 1,000-fold improvement compared with laccase production by

*P. flavido-alba*. This yield is similar to those obtained for fungal laccases in previous reports (Yaver et al. 1999; Record et al. 2002; Sigoillot et al. 2004), and slightly higher than in the yeast system (Cassland and Jönsson 1999; Otterbein et al. 2000; Madzak et al. 2005).

Attempts to establish a faster purification system were successful. Whereas the native enzyme requires a three-step chromatographic process for complete purification, rLac-PFA was purified in only two chromatography steps, i.e. ion exchange and gel filtration. This is explained by the fact that *A. niger* extracellular culture medium mostly consisted of rLac-PFA while *P. flavido-alba* secretes a complex mixture of ligninolytic peroxidases (Pérez et al. 1996). SDS-PAGE and Western blotting confirmed that the protein preparation was homogeneous and that the recombinant and native enzymes share very similar molecular weight.

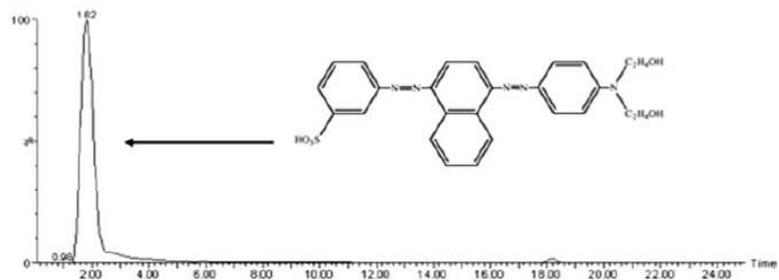
It is well known that fungal laccases are glycoproteins and that their sugar moieties are involved in the stabilization process against proteolysis (Yoshitake et al. 1993; Benoit et al. 2006). Consequently, it is necessary to produce these enzymes in eukaryotic microorganisms able to perform such post-translational modifications even if the ultimate sugar composition should be different. The physical-chemical properties of the heterologously-produced enzyme may consequently be altered by this modification, as suggested in previous studies (Otterbein et al. 2000; Sigoillot et al. 2004; Madzak et al. 2005). For instance, rLac-LPFA showed higher specific activity ( $92.10 \text{ U mg}^{-1}$ ) than the native enzyme ( $18.4 \text{ U mg}^{-1}$ ) (Pérez et al. 1996). This higher specific activity could be explained by the fact that the recombinant enzyme was more stable than the native enzyme, as discussed below.

The physical and biochemical properties of rLac-PFA were tested. Thermal stability was similar between recombinant and native laccase. Interestingly, rLac-PFA showed a higher organic-solvent stability and a wider pH range of enzymatic activity than the native enzyme, and retained nearly 100 % activity at pH 6.

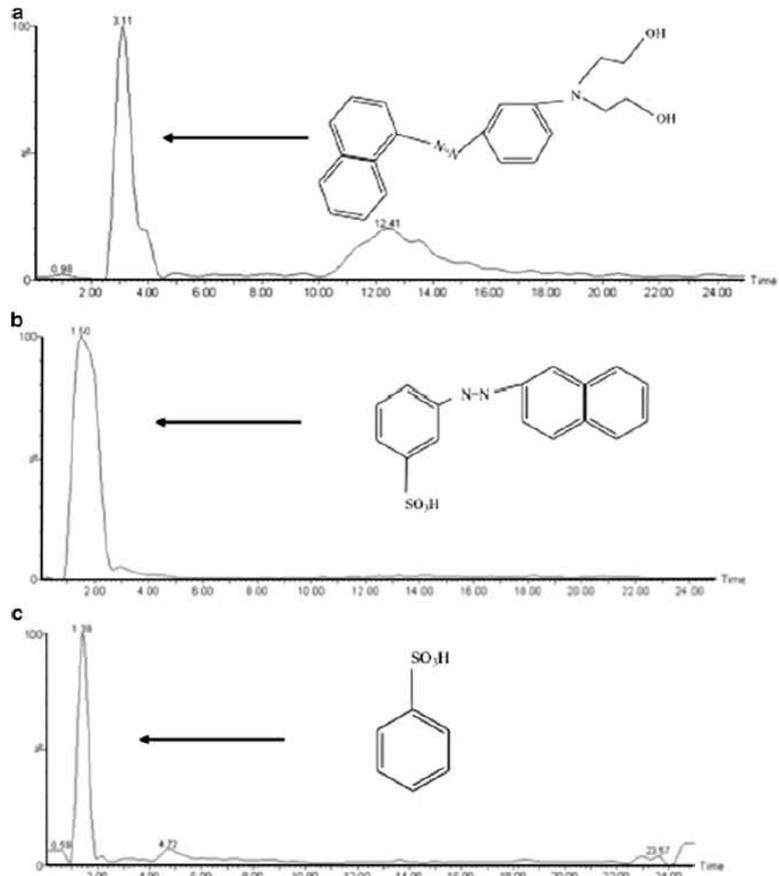
Thus catalytic assays performed in the presence of organic solvents indicated that rLac-PFA tolerates high amounts of organic solvents better than other fungal laccases such as those from *Trametes trogii* (Colao et al. 2006), *T. versicolor* and *P. ostreatus* (Keum and Li 2004).

The presence of organic solvents is required for the oxidation of hydrophobic substrates such as the polycyclic aromatic hydrocarbons, for what several studies evaluated a homogenous aqueous-organic system for laccase catalyzed oxidative reduction of biphenyl derivatives and found that optimized systems had the potential to completely oxidize several hydroxyl biphenyls (Keum and Li 2004; Tominaga et al. 2004).

**Fig. 6** LC-MS analysis chromatogram of NY-1 dye sample in Glycine-HCl buffer pH 3



**Fig. 7** LC-MS analysis chromatogram of NY-1 dye sample after treatment with native laccase from *P. flavidoalba* after 3 h at room temperature in Glycine-HCl buffer pH 3

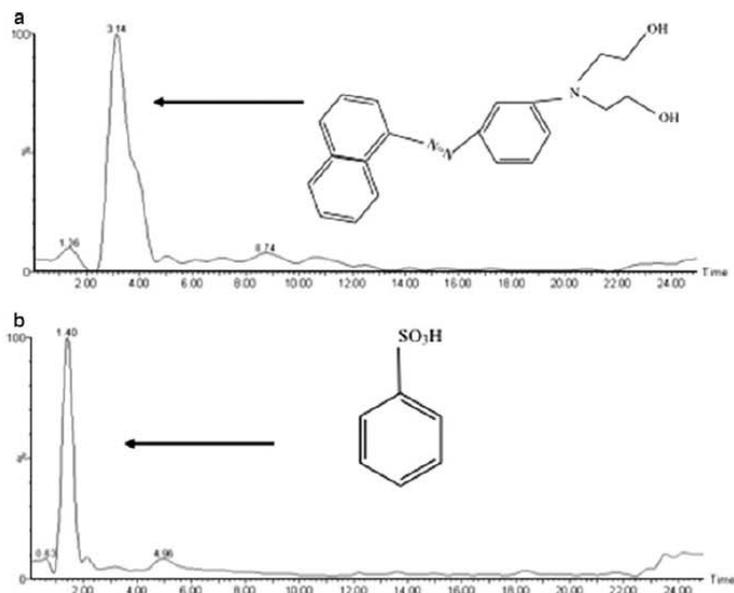


Fungal laccase activity usually decreases close to neutral pH conditions, as shown for the loss of activity of *P. cinabarinus* laccase at pH 6 (Eggert et al. 1996). However, other laccases such as the recombinant laccase from *Polyporus gramocephalus* produced in *Pichia pastoris*,

showed pH stability in the range of 7–10 (Huang et al. 2011).

The main areas of application discussed for laccases are waste detoxification, textile dye transformation, and food industry applications (Mayer and Staples 2002), but there is

**Fig. 8** LC-MS analysis chromatogram of NY-1 dye sample after treatment with recombinant laccase from *A. niger* after 3 h at room temperature in Glycine-HCl buffer pH 3



recently been a surge of interest in their potential use in organic synthesis (Burton 2003; Marzorati et al. 2005; Baratto et al. 2006). The organic synthesis approach features examples where these enzymes have been used in organic solvents known to affect laccases (Rodakiewicz-Nowak et al. 2000; Farnet et al. 2008), thus demonstrating the broad interest in finding new laccases able to strongly resist harsh conditions. rLac-LPFA was more active in hydrophobic solvents than the native laccase. The effect of these organic solvents on laccase activity was tested using ABTS as substrate due to its stable radical cation in water-organic solvent mixtures (Alcalde et al. 2005). rLac-LPFA stability in the presence of organic solvents was very similar to that of *Ganoderma fornicatum* and *Lentinula edodes* laccases (Huang et al. 2011; Wong et al. 2012) and higher than *Fusarium solani* MAS2 laccase (Wu et al. 2010).

Recombinant laccases have been widely applied in bioremediation purposes, especially for the treatment of synthetic dyes (Colao et al. 2006; Lu et al. 2009). The purified recombinant Lcc1 from *Trametes trogii*, expressed in *P. pastoris* differently decolorizes several synthetic textile dyes, depending on their chemical structures. The extent of decolorization is enhanced by the addition of synthetic mediators.

Furthermore, rLac-LPFA from *P. flavido-alba* showed higher decolorization efficiency on RBBR and NY1 without the need of mediators to achieve this step (Fig. 5).

The fact that the recombinant laccase can directly decolorize synthetic dyes is coherent with the behavior of some fungal laccases (Fan et al. 2011) while others require mediators to achieve this step (Claus et al. 2002; Rodriguez-Couto et al. 2005). This feature opens up promising perspectives for a cost-effective process that does not require expensive chemical mediators. Furthermore, as they are biodegradable and environmentally-friendly, laccases are of particular interest in commercial applications for treating industrial phenolic substrates.

**Acknowledgments** This work was partly funded by grant AGL2006-11697 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (formerly MICINN) and by the Spanish Ministry of Education and Science "Ayudas para la movilidad de estudiantes para la obtención de la mención europea en el título de doctor".

## References

- Alcalde M, Bulter T, Zumarraga M, Garcia-Arellano H, Mencia M, Plou FJ (2005) Screening mutant libraries of fungal laccases in the presence of organic solvents. *J Biomol Screen* 10:624–631
- Arora DS, Sharma RK (2010) Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl Biochem Biotechnol* 160:1760–1788
- Baratto L, Candido A, Mazorati M, Sagui F, Riva S, Danieli B (2006) Laccase-mediated oxidation of natural glycosides. *J Mol Catal B Enzym* 39:3–8

- Benoit I, Asther M, Sulzenbacher G, Record E, Marmuse L, Parsiegla G, Gimbert I, Asther M, Bignon C (2006) Respective importance of protein folding and glycosylation in the thermal stability of recombinant feruloyl esterase A. *FEBS Lett* 580:5815–5821
- Burton S (2003) Laccases and phenol oxidases in organic synthesis. A review. *Curr Organic Chem* 7:1317–1331
- Cassland P, Jönsson LJ (1999) Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:393–400
- Claus H, Faber G, König H (2002) Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:672–678
- Colao MC, Lupino S, Garzillo AM, Buonocore V, Ruzzi M (2006) Heterologous expression of lccI gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microb Cell Fact* 5:31–36
- de la Rubia T, Ruiz E, Pérez J, Martínez J (2002) Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavido-alba* induced by vanillin. *Arch Microbiol* 179:70–73
- Demain AL, Vanishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27:297–306
- Edman P, Hogfeldt E, Sillén LG, Kinell P-O (1950) Method for determination of the amino acid sequences in peptides. *Acta Chem Scand* 4:283–293
- Eggert C, Temp U, Eriksson KE (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62:1151–1158
- Fan F, Zhuo R, Sun S, Wan X, Jiang M, Zhang X, Yang Y (2011) Cloning and functional analysis of a new laccase from *Trametes* sp. 48424 which had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes. *Bioresor Technol* 102:3126–3137
- Farnet AM, Gil G, Ferre E (2008) Effects of pollutants on laccase activities of *Marasmius quercophilus*, a white-rot fungus isolated from a Mediterranean sclerophyllous litter. *Chemosphere* 70:895–900
- Gianfreda L, Xu F, Bollag JM (1999) Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed J* 13:1–25
- Gordon CL, Khalaj V, Ram AFJ, Archer DB, Brookman JL, Trinci APJ, Jeenes DJ, Doonan JH, Wells B, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ, Robson GD (2000) Glucoamylase: fluorescent protein fusions to monitor secretion in *Aspergillus niger*. *Microbiology* 146:415–426
- Guo M, Lu F, Pu J, Bai D, Du L (2005) Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Trametes versicolor* and heterologous expression in *Pichia methanolica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:178–183
- Guo M, Lu F, Liu M, Li T, Pu J, Wang N, Liang P, Zhang C (2008) Purification of recombinant laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica* and its use for decolorization of anthraquinonic dye. *Biotechnol Lett* 30:2091–2096
- Hong YZ, Zhou HM, Tu XM, Li JF, Xiao YZ (2007) Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes* sp. 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Curr Microbiol* 54:260–265
- Huang WT, Tai R, Hsu RS, Huang CT (2011) Overexpression and characterization of a thermostable pH stable and organic solvent-tolerant *Ganoderma fornicatum* laccase in *Pichia pastoris*. *Process Biochem* 46:1469–1474
- Keum YS, Li QX (2004) Fungal laccase-catalysed degradation of hydroxyl polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 56:23–30
- Kiiskinen LL, Kruus K, Bailey M, Yloesmaeki E, Siika-aho M, Saloheimo M (2004) Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology* 150:3065–3074
- Kunamneni A, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M (2008a) Laccases and their applications: a patent review. *Recent Pat Biotechnol* 2:10–24
- Kunamneni A, Camarero S, García-Burgos C, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M (2008b) Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb Cell Fact* 7:32–49
- Laemmli UK (1977) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227:680–685
- Lu L, Zhao M, Liang SC, Zhao LY, Li DB, Zhang BB (2009) Production and synthetic dyes decolorization capacity of a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol* 107:1149–1156
- Madzak C, Otterbein L, Chamkha M, Moukha S, Asther M, Gaillardin C, Beckerich JM (2005) Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 5:635–646
- Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, del Río JC, Gutiérrez A (2009) Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr Opin Biotechnol* 20:348–357
- Marzorati M, Danieli B, Haltrich D, Riva S (2005) Selective laccase mediated oxidation of sugars derivatives. *Green Chem* 7:310–315
- Mayer AM, Staples RC (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem* 60:551–565
- Mikolasch A, Schauer F (2009) Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:605–624
- Otterbein L, Record E, Longhi S, Asther M, Moukha S (2000) Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem* 267:1619–1625
- Pérez J, de la Rubia T, Martínez J (1996) Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Appl Environ Microbiol* 62:4263–4267
- Piscitelli A, Giardina P, Mazzoni C, Sanna G (2005) Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:428–439
- Punt PJ, Van den Hondel CA (1992) Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. *Methods Enzymol* 216:447–457
- Record E, Punt PJ, Chamkha M, Labat M, van den Hondel CA, Asther M (2002) Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Eur J Biochem* 269:602–609
- Riu J, Schoness I, Barcelo D (1998) Determination of sulfonated azo dyes in ground water and industrial effluent by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *J Mass Spect* 33:653
- Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P (2001) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Biores Technol* 77:247–255
- Rodakiewicz-Nowak J, Kasture SM, Dudek B, Haber J (2000) Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. *J Mol Catal B Enzym* 11:1–11
- Rodríguez-Couto S, Sanromán M, Gübilt GM (2005) Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolorization by crude laccase from *Trametes hirsute*. *Chemosphere* 58:417–422
- Rodríguez-Rincón F, Suarez A, Lucas M, Larrondo LF, de la Rubia T, Polaina J, Martínez J (2010) Molecular and structural modeling of the *Phanerochaete flavido-alba* extracellular laccase reveals its ferroxidase structure. *Arch Microbiol* 192:883–892

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sigoillot JC, Herpoel I, Frasse P, Moukha S, Lesage-Messen L, Asther M (1999) Laccase production by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* derived from a dikaryotic strain. World J Microbiol Biotechnol 15:481–484
- Sigoillot C, Record E, Belle V, Robert JL, Levasseur A, Punt PJ, van den Hondel CA, Fournel A, Sigoillot JC, Asther M (2004) Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. Appl Microbiol Biotechnol 64:346–352
- Tominaga J, Michizoe J, Kamiya N, Ichinose H, Maruyama T, Goto M (2004) Factors affecting the oxidative activity of laccase towards biphenyl derivatives in homogeneous aqueous-organic systems. J Biosci Bioeng 98:14–19
- van Hartingsveldt W, Mattern IE, van Zeijl CM, Pouwels PH, van den Hondel CA (1987) Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. Mol Gen Genet 206:71–75
- Wong KS, Huang Q, Au CH, Wang J, Kwan HS (2012) Biodegradation of dyes and polyaromatic hydrocarbons by two allelic forms of *Lentinula edodes* laccase expressed from *Pichia pastoris*. Bioresour Technol 104:157–164
- World Bank (2007) Environmental, health, and safety guidelines for textile manufacturing. International Finance Corporation, World Bank Group
- Wu YR, Luo ZH, Chow RKK, Vrijmoed LLP (2010) Purification and characterization of an extracellular laccase from the anthracene-degrading fungus *Fusarium solani* MAS2. Bioresour Technol 101:9772–9777
- Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dalboge H (1996) Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. Appl Environ Microbiol 62:834–841
- Yaver DS, Overjero MD, Xu F, Nelson BA, Brown KM, Halkier T, Bernauer S, Brown SH, Kauppinen S (1999) Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase *lcc1*. Appl Environ Microbiol 65:4943–4948
- Yoshitake A, Katayama Y, Nakamura M, Iimura Y, Kawai S, Morohoshi N (1993) N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. J Gen Microbiol 139:179–185

## Comparison of Biochemical Properties of Recombinant and Native *Phanerochaete flavido-alba* Laccases

Lamia Benghazi<sup>1</sup>, Eric Record<sup>2</sup>, José Martínez<sup>1</sup> and Teresa de la Rubia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada 18071, Spain

<sup>2</sup> INRA, Aix Marseille Université, UMR 1163 de Biotechnologie des Champignons Filamenteux, Polytech Marseille, Marseille 09 13228, France

Received: May 25, 2013 / Published: November 20, 2013.

**Abstract:** Laccases are blue copper oxidases (E.C. 1.10.3.2 benzenediol:oxygen oxidoreductase) that catalyze the one-electron oxidation of phenolics, aromatic amines and other electron-rich substrates with the concomitant reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O. They are currently seen as highly interesting industrial enzymes because of their broad substrate specificity. The *Phanerochaete flavido-alba* laccase is expressed and secreted as a soluble active enzyme by *Aspergillus niger* (rLac-LPFA). rLac-LPFA is easily purified to homogeneity. Metal ions like HgCl<sub>2</sub>, KCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> and MgSO<sub>4</sub> at a concentration of 2 mM have inhibiting effect on recombinant and native laccase, whereas, CuSO<sub>4</sub> and MnSO<sub>4</sub> moderately increase both enzyme activities. Two potential inhibitors (sodium azide and EDTA) inhibited enzyme activity, whereas, urea and SDS have no effect on enzyme activity. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values for recombinant laccase are 0.65 mM and 300 U/mg respectively for 2,6-DMP as substrate.

**Key words:** Recombinant laccase, *Phanerochaete flavido-alba*, kinetics constants, metal ions, inhibitors.

### 1. Introduction

Laccases (E.C. 1.10.3.2 benzenediol:oxygen oxidoreductases) are multicopper enzymes belonging to the group of blue oxidases that catalyzes oxidation of a wide variety of organic and inorganic compounds, including diphenols, polyphenols, diamines and aromatic amines. One electron at a time is removed from the substrate and molecular oxygen is used as the electron acceptor [1]. The substrate loses a single electron and forms a free radical. The unstable radical undergoes further nonenzymatic reactions including hydration, disproportionation and polymerization [2]. The substrates of laccases may vary from diphenols and polyphenols to diamines, aromatic amines, benzenethiols and substituted phenols [3]. Laccases are common enzymes in nature, especially in plants and fungi. Besides fungal laccases, which are the most

frequently studied form of laccases, bacterial laccases from *Pseudomonas putida* F6, *Pseudomonas* sp. LBC1 and *Escherichia coli* have also been purified and characterized [4]. Most of the laccases studied are of fungal origin especially from the classes of white-rot fungi. Fungal laccases play an important role in plant pathogenesis, pigment production and degradation of lignocellulosic materials [1, 2]. White-rot basidiomycetes are microorganisms able to degrade lignin efficiently. However, the degree of lignin degradation with respect to other wood components largely depends on the environmental conditions and the fungal species involved. The ability of laccases producing microorganisms or purified laccases to eliminate a wide range of pollutants is currently one of the most interesting subjects for researchers in environmental biotechnology [5]. Laccases can be used in detection of catecholamine neurotransmitters such as dopamine, norepinephrine [6] and laccase-oxidized form of morphine in the

**Corresponding author:** Teresa de la Rubia, Ph.D., research fields: biodegradation, enzymes and ligninolytic fungus. E-mail: dlrubia@ugr.es.

presence of codeine by coupling its oxidation with glucose dehydrogenase that has been studied [7]. Some fungal laccases degrade toxic fungal metabolites, such as aflatoxin B1 [8] and are also useful in the field of food microbiology. Ethanol is produced from pulp, manufacturing of lightening cream, wine clarification and is also used in industrial applications such as an oxidizing biocatalyst [6, 9]. Potential applications of laccases include textile dye bleaching, pulp bleaching, effluent detoxification, biosensors and bioremediations [1, 10]. However, a serious problem often encountered with industrial exploitation of fungal laccases is the low production level by the native hosts. This problem may be overcome by heterologous production in fungal hosts capable of producing high amounts of extracellular enzymes as *Trichoderma reesei* or *Aspergillus* sp..

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Heterologous Expression of *P. flavido-alba* Laccase in *Aspergillus niger*

The cDNA encoding for *P. flavido-alba* laccase was amplified by PCR using the following forwards primer GCGCGCAGACACTGTCTCGCTTCCATCC (AnigerPfalF) and reverse primer AAGCTTCAGGCCGAGCATTGATCCAC (AnigerPfalR). The PCR product was cloned in pGEM-T (Promega, Madison, USA) and checked by sequencing (GenBank: EF446161.1). The correct PCR product was then recovered from pGEM-T after digestion with BssHIII and HindIII and ligated to the vector pAN52-4 that was predigested with the same restriction enzymes (EMBL Z32750). The resulting expression vector was named pLac-pfa. In pLac-pfa, the codes of the 25 amino acids of the laccase signal peptide were replaced by the 24-amino-acid glucoamylase (GLA) preprosequence from *A. niger*. In this construct, the *A. nidulans* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gpdA*) promoter, the 5' untranslated region of the *gpdA* mRNA and the *A. nidulans trpC* terminator were used

to drive the expression of the laccase-encoding sequence. Fungal cotransformation was basically carried out as described by Punt and Hondel [11], using the laccase expression vector (10 mg) pLac-pfa and the vector pAB4-1 [12].

### 2.2 Screening of the Transformants and Laccase Assay

Agar plates containing a selective medium (minimal medium without uridine) with 200  $\mu$ M ABTS were used for the selection of laccase-secreting transformants. Plates were incubated for 10 days at 30 °C and checked for development of a green zone around the colonies that indicated laccase activity. To assay laccase activity, aliquots (1 mL of culture medium) were collected daily and the cells were removed by filtration (0.45  $\mu$ m). Laccase activity was then measured by monitoring the oxidation of 500  $\mu$ M ABTS at 436 nm to the respective radical ( $\epsilon_{436} = 36.000$  M/cm) in the presence of 50 mM sodium tartrate pH 3 at 30 °C (standard conditions) as described by Sigoillot et al. [13]. Activity was indicated in international units (U) as the amount of laccase that oxidized 1  $\mu$ mol of substrate per min.

### 2.3 Purification of Recombinant Laccase Produced by *A. niger*

In order to get an homogenous fraction of the recombinant laccase, 1,000 mL of culture medium (2,500 U/L) was filtered (0.45  $\mu$ m) and concentrated by ultrafiltration through a cellulose membrane (molecular mass cut-off of 10 kDa) in a Filtron system (Pall, Madrid, Spain) and dialyzed twice against 10 mM sodium acetate buffer (pH = 5) for 3 h at 4 °C. After dialysis, the concentrate (6 mL) was applied onto a HiTrap for anion-exchange (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) equilibrated with a 10 mM sodium acetate buffer (pH = 5). The column was washed with the same buffer at a flow rate of 2 mL/min to remove unbound proteins. Bound laccase was eluted from the column with a salt gradient (1 M NaCl) in the same buffer at a flow rate of 2 mL/min.

Elution was monitored for absorbance at 450 nm and 280 nm for protein detection. The fractions showing laccase activity were pooled, concentrated and dialyzed against a 10 mM sodium acetate buffer (pH = 5). The concentrate was then applied onto a gel filtration superose 12 PC column (GE Healthcare) in a 0.2 M sodium acetate buffer (pH = 5) and eluted at a flow rate of 0.5 mL/min in the same buffer. Fractions containing laccase activity were pooled, concentrated, dialyzed and stored at -20 °C.

#### 2.4 Kinetics Constants

The reaction rate was determined at different substrates, ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazolidine-6-sulfonic acid), 2,6-DMP and FeSO<sub>4</sub> concentration in the range of 0.575-11.5 mM. All assays were performed in triplicate. The kinetic constants ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) for purified recombinant and native laccase were determined with ABTS, 2,6-DMP and FeSO<sub>4</sub>.

#### 2.5 Enzyme Inhibition

Enzyme inhibition studies were performed by pre-incubation of the enzyme with the inhibitor for a certain period of time (15 min) to ensure that the inhibition was completed. The subsequent kinetic measurements were carried out by the addition of proper substrate and then monitored the substrates decline or the formation of the products. Four potential inhibitors (sodium azide (NaN<sub>3</sub>), EDTA, SDS 0.1% and urea 5 M) were evaluated to test the inhibition of both laccases.

#### 2.6 Effect of Metal Ions on Enzyme Activity

The influences of various metal ions HgCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> and KCl were studied by incubating purified recombinant and native laccase in 10 mM sodium acetate buffer for 24 h at 30 °C. Purified laccase (12 µL) was assayed in a standard reaction mixture (138 µL buffer, 50 µL of ABTS 93.2 mM) to determine laccase activity in triplicate.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Heterologous Expression of *P. flavido-alba* Laccase cDNA in *A. niger*

In a cotransformation experiment, *A. niger* D15#26 was transformed with a mixture of the expression vector pLac-pfa and the plasmid pAB4-1, containing the pyrG gene used for selection. Transformants were selected for their ability to grow on minimal medium plates without uridine. Approximately 100 uridine prototrophic transformants were obtained per 10 µg of expression vector. Cotransformants were tested for laccase production by growth on minimal medium plates supplemented with ABTS. Recombinant-expressing clones were identified by the appearance of a green zone around the colonies after 5-6 days at 30 °C. 20 positive clones were assayed for optimal laccase production. The results for laccase activity ranged from 100 U/L to 2,500 U/L after five days in culture. The best clone was selected for further larger scale investigation.

The sequence encoding the mature laccase protein of *P. flavido-alba* was fused in frame with the glaA signal sequence, thereby replacing the native laccase signal sequence, under the control of the glaA gene promoter, generating vector pLac-pfa (Fig. 1). This fusion system was proved to be efficient for heterologous expressions of other fungal laccases [14, 15]. With this construct, laccase activity was found in the extracellular medium of transformed *A. niger* cultures and the production level reached 30 mg/L. This was a 1,000-fold improvement compared with laccase production by *P. flavido-alba*. This yield was similar to those obtained for fungal laccases in previous reports [14-16] and slightly higher than in the yeast system [17-19].

#### 3.2 Purification of Recombinant Laccase Produced by *A. niger*

Attempts to establish a faster purification system were successful, whereas, the native enzyme required

a three-step chromatographic process for complete purification, rLac-PFA was purified in only two chromatography steps, i.e., ion exchange and gel filtration. This was explained by the fact that *A. niger* extracellular culture medium mostly consisted of rLac-PFA while *P. flavidobalva* secreted a complex mixture of ligninolytic peroxidases [20].

The selected clone demonstrated laccase activity in the culture medium, confirming that laccase was being secreted by *A. niger*. Activity was not found in the control culture (*A. niger* transformed with pAB4-1, without *P. flavidobalva* laccase gene construct pLac-pfa). In liquid culture medium, laccase activity increased rapidly after three days of incubation at 30 °C, then gradually reached a peak of 2,500 U/L that remained stable until day six of culture. After seven days, laccase production sharply decreased (Fig. 2). pH value was stabilized at five to prevent enzyme

degradation. Previous results reported a production of 0.557 U/L laccase obtained from *P. flavidobalva* culture.

### 3.3 The Effect of Inhibitors

For the determination of the inhibition of the laccase activity for both enzymes, the oxidation of the ABTS was measured up in presence and absence of inhibitor. According to Table 1, the major inhibition provided it  $\text{NaN}_3$  10 mM with 90% and 83.33% for *P. flavidobalva* and *A. niger*, respectively. The EDTA to 10 mM inhibited 39.9% and 33.34% for *P. flavidobalva* and *A. niger*, respectively.

Two potential inhibitors ( $\text{NaN}_3$  and EDTA) were evaluated to test the inhibition properties of laccase. Sodium azide was the most efficient inhibitors, and EDTA inhibited laccase to a lesser extent which was similar to that of laccase from *Chaetomium thermophilum* and *Pleurotus* sp. [21, 22].



Fig. 1 Laccase gene expression vector.

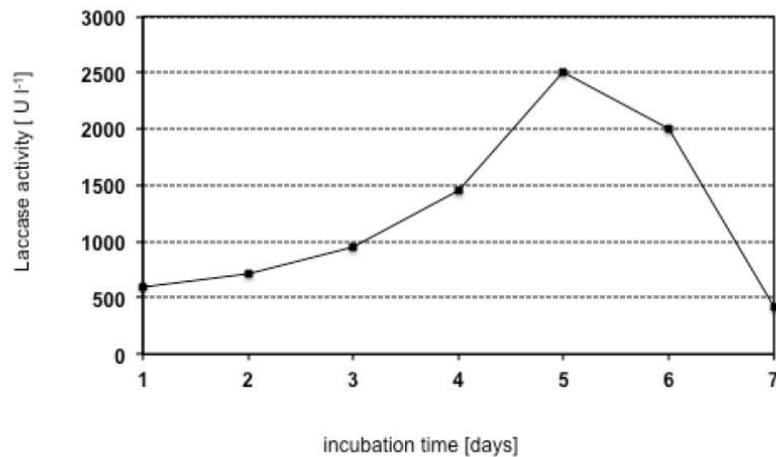


Fig. 2 Time course of the recombinant laccase activity detected in the *A. niger* culture medium (■) and culture medium. The laccase activity was determined by ABTS oxidation. Results shown the average of three independent experiments ± SD.

**Table 1** Effect of inhibitors and detergent on purified recombinant and native laccase from *P. flavido-alba*.

Recombinant laccase		Native laccase	
Inhibitor cc	Inhibition (%)	Inhibitor cc	Inhibition (%)
	1 mM 25	1 mM	30
NaN <sub>3</sub>	5 mM 66.66	NaN <sub>3</sub> 5 mM	70.7
	10 mM 83.33	10 mM	90
	1 mM -16	1 mM	-20
EDTA	5 mM 16.66	EDTA 5 mM	20
	10 mM 33.34	10 mM	39.9
	5 mM 16	Urea 5 mM	20
Urea	0.1% 1	SDS 0.1%	5
SDS	1 mM -8.33	1 mM	-10.5
	5 mM -25	MnSO <sub>4</sub> 5 mM	-30
MnSO <sub>4</sub>	10 mM -50	10 mM	-60

### 3.4 The Effect of Metal Ions

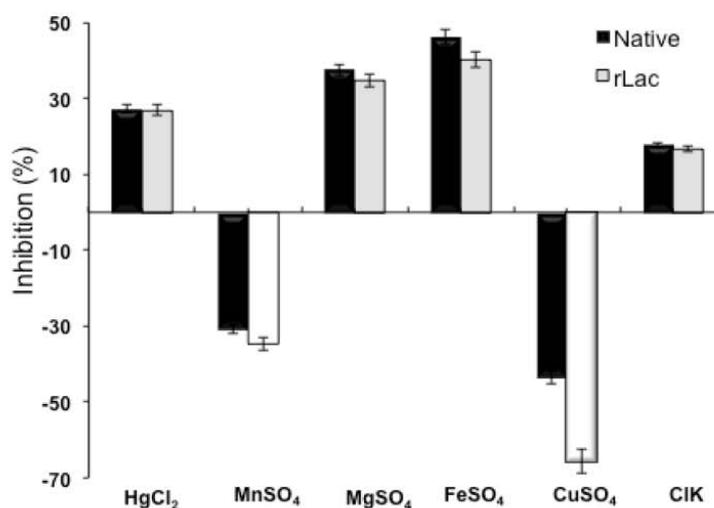
The HgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> and KCl at 2 mM inactivated the purified recombinant and native laccases. Nearly 50% activity was lost in the presence of 2 mM of FeSO<sub>4</sub> (Fig. 3) and there was 40% activity increase in the presence of 2 mM of MgSO<sub>4</sub>, whereas MnSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> at 2 mM stimulated the recombinant and native laccase activity.

Like other laccase, the recombinant and native laccase was highly sensitive to Fe<sup>2+</sup>. This might be

attributed to the ability of the iron ions to interact with the electron transportation system of laccase [23]. The recombinant and native laccase was highly stimulated by Cu<sup>2+</sup>, the reason might be due to the filling of type-2 copper binding sites with copper ions [24]. As shown here, Mn<sup>2+</sup> clearly stimulated the laccase activity, regulation of laccase production by Mn<sup>2+</sup> had been observed before. Soden and Dobson [25] demonstrated that manganese acted as an inducer of laccase transcripts in *Pleurotus sajor-caju* and a similar effect had also been reported in other fungi [26].

### 3.5 Kinetics Studies

The  $K_m$  and  $V_{max}$  values for purified recombinant laccase were 0.65 mM and 300 U/mg, respectively for phenolic compound 2,6-DMP as substrate.  $K_m$  and  $V_{max}$  for ABTS as substrate were 0.89 mM and 770 U/mg. While as  $K_m$  and  $V_{max}$  values for FeSO<sub>4</sub> were 3 mM and 900 U/mg, respectively (Table 2). Rodriguez-Rincón et al. [27] demonstrated that the analysis of protein structure revealed close similarity of PfaI and ferroxidases and provided clues about the differences of activity between both types of enzymes.

**Fig. 3** Effect of metal ions on purified recombinant and native laccase from *P. flavido-alba*.

**Table 2** Kinetics constants of recombinant and native laccase from *P. flavido-alba* with ABTS, 2,6-DMP, FeSO<sub>4</sub>.

Substrate	Native laccase				Recombinant laccase			
	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/mg)	$K_{cat}$ (/s)	$K_{cat}/K_m$	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/mg)	$K_{cat}$ (/s)	$K_{cat}/K_m$
ABTS	1.07	800	70.16	65.57	0.89	770	67.54	75.88
2,6-DMP	0.8	320	28.07	35.08	0.65	300	26.31	40.47
FeSO <sub>4</sub>	4.0	980	85.96	21.49	3.0	900	78.94	26.31

The parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  for ABTS of purified laccase from Pfall (native laccase) were 1.07 mM and 800 U/mg, respectively, however the values of  $K_m$  and  $V_{max}$  for 2,6-DMP were 0.8 mM and 320 U/mg, respectively.

#### 4. Conclusions

In view of the results obtained in this paper, it can be concluded that laccase from *P. flavido-alba* can be produced in reasonable amounts in *A. niger* and that the recombinant laccase was not affected by the heavy metals and inhibitors.

Future studies will focus on that if this enzyme could have some biotechnological applications.

#### Acknowledgments

This work was partly funded by grant AGL2006-11697 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (formerly MICINN) and by the Spanish Ministry of Education and Science "Ayudas para la movilidad de estudiantes para la obtención de la mención europea en el título de doctor".

#### References

- [1] L. Gianfreda, F. Xu, J.M. Bollag, Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes, *Bioremed. J.* 3 (1999) 1-25.
- [2] C.F. Thurston, The structure and function of fungal laccases, *Microbiology* 140 (1994) 19-26.
- [3] L.L. Kiiskinen, L. Viikari, K. Kruus, Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*, *Appl. Microbiol. Biotech.* 59 (2002) 198-204.
- [4] A.A. Telke, D.C. Kalyani, U.U. Jadhav, G.K. Parshetti, S.P. Govindwar, Purification and characterization of an extracellular laccase from a *Pseudomonas* sp. LBC1 and its application for the removal of bisphenol A, *J. Mol. Catal. B.* 61 (2009) 252-260.
- [5] P. Baldrian, Fungal laccases-occurrence and properties, *FEMS Microbiol. Rev.* 30 (2006) 215-242.
- [6] S.R. Couto, J.L.T. Herrera, Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 500-513.
- [7] C.G. Bauer, A. Kuhn, N. Gajovic, O. Skorobogatko, P.J. Holt, N.C. Bruce, et al., New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase, *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999) 179-183.
- [8] J.F. Alberts, W.C.A. Gelderblom, A. Botha, W.H. van Zyl, Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes, *Int. J. Food Microbiol.* 135 (2009) 47-52.
- [9] L. Lu, M. Zhao, B.B. Zhang, Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74 (2007) 1232-1239.
- [10] F. Xu, Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition, *Biochem.* 35 (1996) 7608-7614.
- [11] P.J. Punt, C.A. Hondel, Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers, *Methods Enzymol.* 216 (1992) 447-457.
- [12] W. van Hartingsveldt, I.E. Mattern, C.M. van Zeijl, P.H. Pouwels, C.A. Hondel, Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the pyrG gene, *Mol. Gen. Genet.* 206 (1992) 71-75.
- [13] J.C. Sigoillot, I. Herpoel, P. Frasse, S. Moukha, L.L. Messen, M. Asther, Laccase production by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* derived from a dikaryotic strain, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15 (1999) 481-484.
- [14] E. Record, P.J. Punt, M. Chamkha, M. Labat, C.A. Hondel, M. Asther, Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 602-609.
- [15] C. Sigoillot, E. Record, V. Belle, J.L. Robert, A. Levasseur, P.J. Punt, et al., Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64 (2004) 346-352.
- [16] D.S. Yaver, M.D. Overjero, F. Xu, B.A. Nelson, K.M. Brown, T. Halkier, et al., Molecular characterization of

- laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase Lcc1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4943-4948.
- [17] P. Cassland, L.J. Jönsson. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 (1999) 393-400.
- [18] L. Otterbein, E. Record, S. Longhi, M. Asther, S. Moukha. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1619-1625.
- [19] C. Madzak, L. Otterbein, M. Chamkha, S. Moukha, M. Asther, C. Gaillardin, et al., Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* 5 (2005) 635-646.
- [20] J. Pérez, T. de la Rubia, J. Martínez. Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 4263-4267.
- [21] B. Chefetz, Y. Chen, Y. Hadar. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 3175-3179.
- [22] S.S. More, P.S. Renuka, K. Pruthvi, M. Swetha, S. Malini, S.M. Veena. Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp.. *Enzyme Res.* 10.4061/2011/248735, 2011.
- [23] W.H. Bao. Expression, characterization and 2,4,6-trichlorophenol degradation of laccase from *Monilinia fructigena*. *Mol. Bio. Rep.* 39 (2011) 3871-3877.
- [24] M. Nagai, T. Sato, H. Watanabe, K. Saito, M. Kawata, H. Enei. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60 (2002) 327-335.
- [25] D.M. Soden, A.D.W. Dobson. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 147 (2001) 1755-1763.
- [26] T. Scheel, M. Hofer, S. Ludwig, U. Holker. Differential expression of manganese or aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 (2000) 686-691.
- [27] F. Rodríguez-Rincón, A. Suarez, M. Lucas, L.F. Larrondo, T. de la Rubia, J. Polaina, et al., Molecular and structural modeling of the *Phanerochaete flavido-alba* extracellular laccase reveals its ferroxidase structure. *Arch. Microbiol.* 192 (2010) 883-892.