



**Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Tesis Doctoral**

**Caracterización y papel biorremediador de la
lacasa producida por el hongo ligninolítico
Coriolopsis rigida en alpeorujo**

Rosario Díaz Rodríguez

2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Rosario Díaz Rodríguez
D.L.: GR 761-2012
ISBN: 978-84-693-6007-1

**Caracterización y papel biorremediador de la lacasa producida
por el hongo ligninolítico *Coriolopsis rigida* en alpeorujó**

Memoria que presenta la Licenciada en
Ciencias Biológicas
Rosario Díaz Rodríguez
para aspirar al grado de Doctora

Fdo: Rosario Díaz Rodríguez

Vº Bº

Los Directores

Fdo: D^a Inmaculada García Romera
Doctora en Ciencias Biológicas
Investigadora Científica del C.S.I.C.

Fdo: D^a M^a Inmaculada Sampedro Quesada
Doctora en Farmacia
Contratada JAE Doc

Universidad de Granada
2010

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de Microorganismos rizosféricos que promueven el crecimiento y desarrollo vegetal, del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con ayuda de una beca del Programa de Itinerario Integrado de Inserción Profesional del CSIC (I3P, Enero 2006). Durante el período de disfrute de dicha beca se realizaron dos estancias breves, financiadas asimismo por el CSIC, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid) en el Departamento de Biología Medioambiental bajo la dirección de la Dra. María Jesús Martínez Hernández.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas internacionales y libros:

Saparrat, M.C.N., Jurado, M., **Díaz, R.**, Romera, I.G., Martínez, M.J. 2010. Transformation of the water soluble fraction from "alpeorujo" by *Corioloropsis rigida*: The role of laccase in the process and its impact on *Azospirillum brasiliense* survival. Chemosphere 78, 72-76.

Aranda, E., Sampedro, I., Arriagada, C., **Díaz, R.**, García, M., Ocampo, J.A. y García-Romera, I. 2008. Transformación de los residuos procedentes del olivo mediante cepas fúngicas. "Tópicos sobre diversidad, ecología y biotecnología de los hongos microscópicos". (Ed. G. Heredia), CYTED, Universidad de Xalapa, México. pp. 293-311.

Díaz, R., Saparrat, M.C.N., Jurado, M., García-Romera, I., Ocampo, J.A., Martínez, M.J. 2010. Biochemical and molecular characterization of *Corioloropsis rigida* laccases involved in detoxification of the water soluble fraction of "alpeorujo". Chemosphere. (Enviado a publicar).

Díaz, R., Heredia, G., Siles, J., García-Sánchez, M., Jurado, M., Martínez, M.J., García-Romera, I., Ocampo, J.A., Sampedro, I. 2010. Enhanced production of laccase of *Corioloropsis rigida* in cocultivation with *Penicillium commune* and study of the impact on the toxicity of dry olive residue. (En preparación).

Jurado, M., Saparrat, M.C.N., **Díaz, R.**, García-Romera, I., Martínez, M.J. 2010. Detoxification of “alpeorujo” by *Coriolopsis rigida*: Role of lac1 gene in the process and its transcriptional regulation. (En preparación).

Asimismo parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

- IX Congreso Nacional de Micología, 2006 (Baja California, México, Octubre de 2006).
- XIII Simposium Científico-Técnico de EXPOLIVA 2007, Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines (Jaén, Mayo de 2007).
- XXI Congreso Nacional de Microbiología (Sevilla, Septiembre de 2007).
- VI Reunión del Grupo de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana de la SEM (Barcelona, Noviembre de 2008).
- 14th European Congress on Biotechnology (Barcelona, Septiembre de 2009).
- XXXII Jornadas Argentinas de Botánica (Córdoba, Argentina. Octubre de 2009).
- Lignibiotech One Symposium (Reims, Francia, Marzo-Abril de 2010).



Agradecimientos

A mi familia, especialmente a mis abuelos, que me han enseñado el valor de la humildad, la bondad, la sencillez y el esfuerzo

Desde siempre me han enseñado el respeto y el valor del conocimiento y la cultura. Por tanto, la finalización de mi Tesis Doctoral, como término de mi formación académica, tiene un significado muy especial para mí y para mi familia, que conocen todo lo bueno y lo malo pasado y todo el esfuerzo que requiere este camino.

Durante mis estudios de doctorado he tenido la gran suerte de encontrarme con personas excepcionales que han hecho de estos cuatro años la mejor etapa que recuerdo. Algunas empezamos el mismo día, siempre nos hemos acompañado aunque no coincidiéramos en el tiempo; otros me han seguido muy de cerca casi sin que me diera cuenta para ayudarme en cuanto me hacía falta y me recordaban con canciones enviadas lo que a veces olvidaba, embebida como estaba en tanto trabajo. (Deseo que esas canciones no finalicen nunca, por muy lejos que esté). Siempre contabais conmigo, me habéis apoyado y aconsejado, siempre había un abrazo o una llamada cuando más lo necesitaba. Me habéis vuelto a levantar miles de veces tanto en lo profesional como en lo personal. Me he sentido muy querida. Yo no sé cómo agradeceros todo. Gracias a Inma, Juan Antonio, Pepe y Horst, por toda su dedicación, trabajo, amabilidad y cercanía. Y mis compañeros.... gracias por haber vivido esta escritura como si fuera vuestra, alegrándoos cada vez que daba un pasito más y preocupándoos con las dificultades que se me presentaban. Mientras escribía comprendí que sólo recuperaba mi alegría y vitalidad cuando volvía a estar con vosotros. Siempre habéis estado a mi lado y aunque mi espíritu me empuje a seguir buscando en nuevos lugares, no imagino esos sitios sin vosotros. ¡Os voy a echar tanto de menos! Gracias Inma ("Sampi"), Merche, Rafa, Eli, Jose Siles, Sergio, Vilma, Jose Martín, Gabi, Julia, M^a Ángeles, Nuria, Maribel, Narciso, Rodolfo, Antonio, Conchi, Rocío, Josefina, Khaoula, "Laura", Coni, Gloria, M^a José, Sandra y Estefanía. Y, por supuesto, también a Jacob, Bine, Ana, Miguel, Chon, Álvaro, Gloria, Paloma, Lola, Rafa, Sensi, Antonio, Omar, Elisa, Ciro, Cristina, Alba, Hortensia, Belén, Mario, Pedro, Michel, Sol, Iván, Bea, Tillo, Juan, Dani, Trini, Soco, Bilge, Erika, Alfonso, Pachá, Pablo y Luna.

Madrid fue el principio de muchas cosas y fue gracias a la gente que me acompañó. En Madrid crecí mucho, cambié mi espíritu, comprendí que allí empezaba todo y que podía llegar hasta cualquier destino que me propusiera. Siempre quería volver. Gracias a M^a Jesús por su inestimable ayuda tanto profesional como personal, por haber tenido siempre un lugar para mí, por su seguimiento y por todo su apoyo. Y gracias a todos los que fueron Madrid, por hacer de aquellos meses mi mejor etapa: Miguel, Aitor, Mario, Davinia, Jose María, Yuta, Eva, Víctor, Elvira, Mariela, María,

Ana, Ángeles, Susana, Patricia, Paco, M^a José, Bea, Javi, David, Ángel, Marta, Juanfran, Celia, Rober, Adrián, Rocco, Pedro, Arsenio, Olga y Ricardo. Gracias a todos por vuestro apoyo y compañía, por darme luz, energía e incluso poesía. Añoro Madrid.

Gracias a Juan José Lázaro, a Alfonso y al resto de su grupo por su ayuda con el HPLC.

Gracias a Carmen Lluch, Antonio Luis Extremera León y Jose Herrera por su disponibilidad y ayuda y por el inicio de esta tesis.

A toda mi familia: mis padres M^a Rosario y Ángel, mis hermanos Carlos Manuel y María, mi Yeyo, mi Yeya, mi Yaya y mi Yayo, todos mis titos y primos, y Susana; por todo su cariño, por estar siempre a mi lado y por todo lo que me han dado y enseñado. Sé que se sienten orgullosos y que los que me faltan, mis Yeyos, y que yo daba por supuesto que aún estarían, también se sentirían orgullosos. Los echo muchísimo de menos y su ejemplo de fortaleza y honestidad me sirve para seguir a pesar de todas las dificultades que pueda encontrarme. También son mi familia Carmen Romero, Carmen y Antonio, Salud y todas las amistades familiares que han cuidado de mis padres y de mi todo este tiempo. ¡A los wallos!

A mis niñas antequeranas por su apoyo y confianza a pesar de todo el tiempo que transcurra sin verlas, por sus conversaciones y chocolates en Callao.

Gracias a Raquel, porque esta tesis también es suya. Ha seguido cada detalle de este trabajo, desde los días de laboratorio hasta cada momento de la escritura. Me ha salvado en más de una ocasión de entre los números para devolverme a los colores y la expresividad. Y gracias a su familia por considerarme una más: a Ricardo, Patricia, Paulina, Diego y Sunna.

Obviamente no podían faltar aquéllos en cuyo camino o caminar he sabido apoyarme a veces para no perderme a mí misma: Don Miguel, Enriquito, mi David, la Juana, Federico, Miguelito, Juanito, Iván, Nachete, Don Rogelio, Don Leonardo, Doña Ana María, Mario, Don Julio, Don Eduardo, Miguel, Arturo, Carlos, Don Rafael, Jorge, José, los de los huesos, los de la vieja tortuga que no se creía nada, los locos de los cuentos y los cuentacuentos locos, y los de la mítica isla.



Índice



INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO..... 3**INTRODUCCIÓN**

1.- Cultivo del olivar.....	7
2.- Alpeorujo.....	7
2.1.- Origen	7
2.2.- Producción.	9
2.3.- Características y composición química	10
<i>Lignina</i>	12
2.4.- Problemática medioambiental del alpeorujo.....	14
3.- Biorremediación	16
4.- Valorización del alpeorujo	18
4.1.- Tratamientos físico-químicos	19
<i>Producción de aceite de orujo</i>	19
<i>Generación de energía</i>	19
<i>Extracción de compuestos de interés</i>	20
<i>Generación de bioabsorbentes</i>	21
<i>Otras formas de valorización</i>	22
4.2.- Tratamientos biológicos	22
<i>Producción de energía</i>	22
<i>Producción de alcoholes</i>	22
<i>Abono orgánico</i>	22
5.- Biorremediación del alpeorujo con hongos	24
6.- Hongos ligninolíticos	25
6.1.- Hongos de la podredumbre blanda	26
6.2.- Hongos de la podredumbre parda.....	26
6.3.- Hongos de la podredumbre blanca	26
7.- Ligninólisis	27
8.- Enzimas ligninolíticas.....	30
<i>Lignina peroxidasa</i>	31
<i>Manganeso peroxidasa</i>	31
<i>Peroxidasa versátil</i>	31
9.- Lacasa	32
<i>Estructura y ciclo catalítico</i>	34

<i>Aplicaciones</i>	37
10.- Lacasa del hongo <i>Coriolopsis rigida</i>	38

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Alpeorujo seco y extractado	43
2.- Hongos saprobios	43
2.1.- Tipos y características de los hongos utilizados	43
2.2.- Medios y condiciones de cultivo	44
<i>Medios sólidos</i>	44
<i>Medios líquidos</i>	44
3.- Bacterias	46
4.- Determinaciones enzimáticas y analíticas	47
4.1.- Actividad lacasa	47
4.2.- pH.....	47
4.3.- Color.....	47
4.4.- Determinación de proteínas	48
4.5.- Contenido de polifenoles totales	48
4.6.- Azúcares reductores	49
5.- Purificación de lacasa de <i>C. rigida</i>	50
5.1.- Métodos de concentración de proteínas	50
5.2.- Isoelectroenfoque.....	50
5.3.- Electroforesis en condiciones desnaturalizantes, SDS-PAGE	51
5.4.- Separación cromatográfica de la lacasa de <i>C. rigida</i>	55
5.4.1.- Cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución.....	55
5.4.2.- Cromatografía de exclusión molecular	55
5.4.3.- Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución.....	57
6.- Caracterización de la lacasa de <i>C. rigida</i>	57
6.1.- Estabilidad frente a pH y temperatura	57
6.2.- Cálculo del parámetro cinético K_m	57
7.- Análisis e identificación molecular del gen de la lacasa de <i>C. rigida</i> en presencia de alpeorujo	58
7.1.- Obtención y cuantificación del ADN genómico.....	58
7.2.- Obtención, cuantificación y preparación del ARN	58
7.3.- Transcripción inversa	60

7.4.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	61
7.5.- Electroforesis en gel de agarosa.....	62
7.6.- Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	62
7.7.- Clonación y secuenciación del gel de la lacasa de <i>C. rigida</i>	63
7.7.1.- Ligación en vectores de clonación	63
7.7.2.- Obtención de células competentes	63
7.7.3.- Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	65
7.7.4.- Purificación de ADN plasmídico	66
7.7.5.- Secuenciación.....	66
8.- Análisis de expresión génica de la lacasa de <i>C. rigida</i>	67
8.1.- PCR cuantitativa a tiempo real (PCR-Q)	67
9.- Tratamiento de extracto acuoso de alpeorujó con lacasa	69
10.- Determinación de la toxicidad del alpeorujó.....	70
10.1.- Análisis de fitotoxicidad	70
10.2.- Análisis de microtoxicidad	71
11.- Análisis estadístico de los resultados	72

RESULTADOS

Capítulo 1. Purificación y caracterización de la lacasa producida por el hongo *Corioloopsis rigida* en presencia de extracto acuoso de alpeorujó. 77

Objetivo general	77
1.- Cinética de producción de actividad lacasa en presencia de extracto acuoso de alpeorujó.....	78
Material y métodos	78
Resultados	78
2.- Determinación de las propiedades físico-químicas del enzima.....	80
Material y métodos	80
Resultados	81
2.1.- Estabilidad frente a pH.....	81
2.2.- Estabilidad frente a temperatura	82
3.- Purificación de la enzima	82
3.1.- Isoelectroenfoque.....	82

Material y métodos	82
Resultados	83
3.2.- Cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución.....	84
Material y métodos	84
Resultados	84
3.3.- Cromatografía de exclusión molecular	85
Material y métodos	85
Resultados	85
3.4.- Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución.....	86
Material y métodos	86
Resultados	87
3.5.- Electroforesis en geles de poliacrilamida, SDS-PAGE.....	88
Material y métodos	88
Resultados	89
4.- Cálculo del parámetro cinético K_m	90
Objetivo	90
Material y métodos	90
Resultado	90
5.- Tratamiento del extracto acuoso de alpeorujo con la lacasa semipurificada de <i>C. rigida</i>	91
Material y métodos	91
Resultados	91
DISCUSIÓN	93

**Capítulo 2. Identificación del gen de lacasa de *Corioloopsis rigida*
expresado en presencia de extracto acuoso de alpeorujo..... 101**

Objetivo general	101
Material y métodos	101
Resultados	104
DISCUSIÓN	108

Capítulo 3. Regulación de la expresión de la lacasa de <i>Corioloopsis rigida</i> por extracto acuoso de alpeorujo y cobre	113
Objetivo general	113
Material y métodos	113
Resultados	115
pH.....	116
Color.....	116
Azúcares reductores.....	117
Proteínas	118
Biomasa.	119
Fenoles.....	120
Actividad lacasa.	121
Regulación de la expresión de la lacasa de <i>C. rigida</i> por extracto acuoso de alpeorujo y cobre	122
DISCUSIÓN	124
Capítulo 4. Inducción de la actividad lacasa de <i>Corioloopsis rigida</i> por <i>Penicillium commune</i>.....	135
Objetivo general	135
1.- Selección de hongos inductores de actividad lacasa	136
Material y métodos	136
Resultados	137
2.- Identificación molecular de <i>Penicillium</i> sp.	138
Objetivo	138
Material y métodos	138
Resultados	140
3.- Estudio de la actividad lacasa de <i>C. rigida</i>	140
Material y métodos	140
Resultados	140
3.1.- Producción de lacasa de <i>C. rigida</i> en monocultivo.....	140
3.2.- Producción de lacasa de <i>C. rigida</i> en cocultivos con <i>P. commune</i> ..	141
<i>Cultivos estáticos</i>	141
<i>Cultivos en agitación</i>	143

4.- Purificación de la actividad lacasa de <i>C. rigida</i> en cocultivo con <i>P. commune</i>	144
Material y métodos	144
Resultados	145
4.1.- Isoelectroenfoco.....	145
4.2.- Separación cromatográfica de la lacasa	146
4.2.1.- Cromatografía de exclusión molecular	146
4.2.2.- Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución.....	147
DISCUSIÓN	150
Capítulo 5. Tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó por lacasa....	157
Objetivo general	157
1.- Condiciones experimentales del tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó por lacasa.....	158
Material y métodos	158
Resultados	159
Color.....	159
Fenoles.....	160
Actividad lacasa.	162
Fitotoxicidad	163
2.- Tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó por distintas lacasas.....	166
Material y métodos	166
Resultados	167
2.1.- Tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó con lacasa comercial de <i>T. versicolor</i>	167
2.2.- Tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó con lacasa del cocultivo de <i>C. rigida</i> con <i>P. commune</i>	168
2.3.- Tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó con lacasa semipurificada de <i>C. rigida</i>	169
3.- Efecto de la lacasa del cocultivo de <i>C. rigida</i> con <i>P. commune</i> en la microtoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó.....	171
Material y métodos	171
Resultados	171

DISCUSIÓN	172
DISCUSIÓN GENERAL.....	181
CONCLUSIONES.....	201
BIBLIOGRAFÍA.....	205



Interés y objetivo del trabajo



INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La industria oleícola ha experimentado un proceso de modernización que ha permitido la producción de aceite de mayor calidad y capacidad antioxidante con gran ahorro en la cantidad de agua necesaria para su extracción. Con el nuevo sistema de extracción de aceite se produce un residuo denominado alpeorujo, masa semilíquida de orujos húmedos, que tras una segunda extracción con hexano, se obtiene alpeorujo seco y extractado. Este subproducto posee propiedades fitotóxicas y antimicrobianas que pueden provocar un gran impacto medioambiental si se desechan indebidamente. Estas propiedades contaminantes, junto con la gran cantidad de alpeorujo que se genera en un periodo de tiempo muy corto y en una zona muy concreta y reducida como es la cuenca mediterránea, plantean la necesidad de buscar formas eficaces de gestión y aprovechamiento del residuo. Se han propuesto diferentes estrategias para la revalorización del alpeorujo, entre las que cabe destacar la producción de energía mediante combustión, la extracción de compuestos antioxidantes o el uso como absorbente para la eliminación de pesticidas de suelos contaminados. Otra vía para la revalorización del alpeorujo podría ser su utilización como abono orgánico ya que este residuo posee un contenido elevado en materia orgánica y otros componentes de interés agroquímico que lo hacen susceptible de utilizarlo como fertilizante. Este uso alternativo del alpeorujo contribuiría al procesamiento de las grandes cantidades de residuo que se generan en cada campaña, así como al establecimiento de niveles mas elevados de materia orgánica en los suelos de la cuenca mediterránea, deficientes en este elemento. Sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto las propiedades tóxicas que posee el residuo que, entre otras cosas, causan un gran daño en el crecimiento de plantas superiores y producen la inhibición de la germinación de semillas. Por tanto, es inviable la aplicación directa de alpeorujo al suelo, siendo necesario someter el residuo a procesos previos de transformación y estabilización que eviten sus efectos contaminantes. Se ha estudiado la posibilidad de someter al alpeorujo a procesos de biorremediación que eliminen su toxicidad y lo transformen en un fertilizante. La mayoría de estos estudios se están

realizando con hongos ligninolíticos o de podredumbre blanca ya que poseen la maquinaria enzimática necesaria para degradar la lignina y celulosa de la madera en la que habitan, lo que les hace idóneos para degradar los compuestos tóxicos presentes en los huesos, piel y pulpa del alpeorujo. Sin embargo, estos procesos de biorremediación con hongos ligninolíticos necesitan periodos de fermentación excesivamente largos que dificultan la gestión de gran cantidad de residuo. Una alternativa puede ser el uso de enzimas ligninolíticas extracelulares en los tratamientos de biorremediación del alpeorujo, lo cual permitiría la detoxificación del residuo en un periodo de tiempo mucho más corto. Por tanto, en la presente Memoria Doctoral se plantea como objetivo principal la biorremediación enzimática del alpeorujo mediante su tratamiento con lacasa producida por el hongo ligninolítico *Corioloopsis rigida* y así se conseguiría disminuir el efecto tóxico de este residuo y revalorizarlo como fertilizante orgánico de forma rápida y eficaz. La realización de este proceso requiere el conocimiento de las características y expresión de la lacasa de *C. rigida* para la optimización en el proceso de biorremediación del alpeorujo. Por tanto, la presente Memoria Doctoral abordará los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de la producción y expresión de la lacasa de *C. rigida* en presencia de alpeorujo
- Secuenciación de la lacasa de *C. rigida* producida en presencia de alpeorujo.
- Optimización de la producción de la enzima lacasa por *C. rigida*.
- Optimización de las condiciones del proceso de biorremediación del alpeorujo mediante la aplicación de actividad lacasa de *C. rigida*.
- Estudio del efecto de la aplicación de la lacasa de *C. rigida* en la fitotoxicidad y microtoxicidad del alpeorujo.



Introducción



INTRODUCCIÓN

1. Cultivo del olivar

El cultivo del olivo tiene gran importancia económica, social, medioambiental e incluso histórica, en la mayoría de los países del Mediterráneo (Kapellakis *et al.*, 2008). De entre ellos destaca España, principal productor de aceite de oliva, seguido por Italia, Grecia, Turquía, Siria y Túnez.

Se han destacado los numerosos beneficios para la salud del consumo de aceite de oliva debido a sus propiedades antioxidantes y a su contenido en grasas poliinsaturadas (Rodríguez *et al.*, 2009; Suárez *et al.*, 2009). Por ello dicha industria ha experimentado un gran crecimiento desde principios del siglo XX extendiéndose en todo el mundo y llegando a tener importancia en continentes como África, Asia y América (Morillo *et al.*, 2009).

Sin embargo, la explotación de este cultivo conlleva la producción de enormes cantidades de subproductos que plantean problemas de contaminación y hacen necesario la implantación de estrategias de manejo o reutilización de los mismos.

2. Alpeorujó

2.1. Origen

La industria oleícola ha experimentado un proceso de modernización que ha contribuido al incremento de la producción y la calidad del aceite mediante la introducción de nuevos sistemas de extracción más potentes y de ciclo continuo. Los nuevos métodos de extracción se basan en la centrifugación de la pasta de aceituna mediante máquinas rotativas horizontales de gran velocidad. El primer sistema basado en la centrifugación se introdujo en España a partir de 1970 y se denominó sistema continuo de tres fases. En los años 1990 este método se sustituyó por la extracción mediante centrifugación

de dos fases en donde se obtiene por un lado, aceite y por otro, el resto de residuos de la aceituna o alperujo (Figura 1) (Albuquerque *et al.*, 2004).

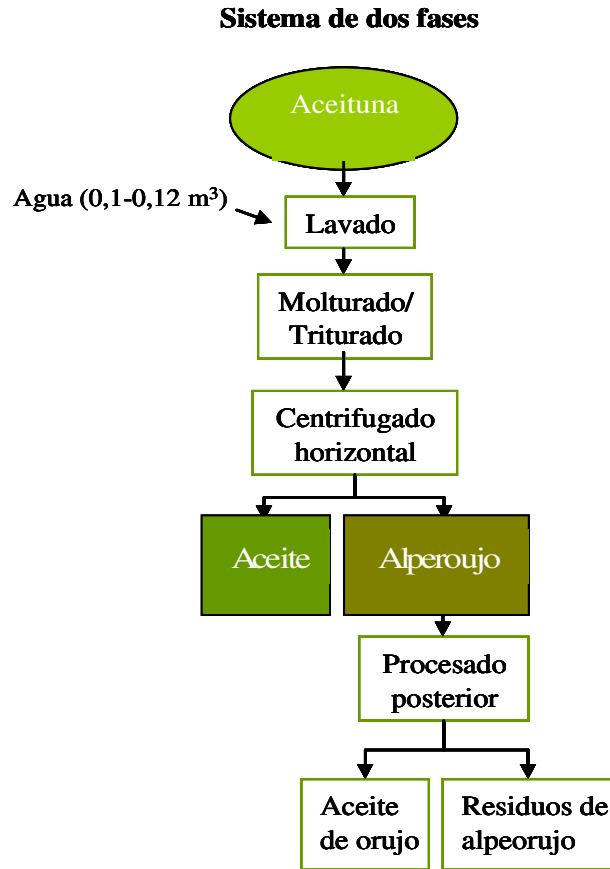


Figura 1. Extracción del aceite de oliva mediante sistema de extracción continua de dos fases (Albuquerque *et al.*, 2004).

El sistema continuo de dos fases tiene una serie de ventajas entre las que destaca un ahorro de agua durante el proceso ya que no requiere la aplicación suplementaria de ésta antes de la centrifugación. Este hecho cobra gran interés en una de las zonas de mayor producción de aceite, como Andalucía, donde existen graves problemas de escasez de agua. Asimismo, con este nuevo sistema de extracción se obtiene aceite con mayor cantidad de polifenoles que le confiere mayor calidad, capacidad antioxidante y mejora en

sus propiedades organolépticas (Alba *et al.*, 1992; Uceda *et al.*, 1995; Borja *et al.*, 2006).

2.2. Producción

Actualmente, el cultivo del olivo tiene gran importancia económica estimándose que se producen 2,7 millones de toneladas de aceite de oliva anualmente en todo el mundo, de las cuales el 76% se produce en Europa. Concretamente, España es el mayor productor, responsable del 36,2% de la producción mundial, seguido de Italia y Grecia (20,2 y 14,2%, respectivamente), según datos de la Organización de la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAOSTAT, 2007).

Se estima que por cada 100 kg de aceitunas en la producción de aceite de oliva se producen una media de 10 l de alpeorujo. En España la producción anual de alpeorujo es de 4 millones de toneladas al año (Kapellakis *et al.*, 2008; Suárez *et al.*, 2009). Croacia es el segundo país europeo productor de alpeorujo, ya que en el resto de países de la cuenca mediterránea productores de aceite de oliva se utiliza más el sistema de extracción de tres fases (Figura 2) (Roig *et al.*, 2006).

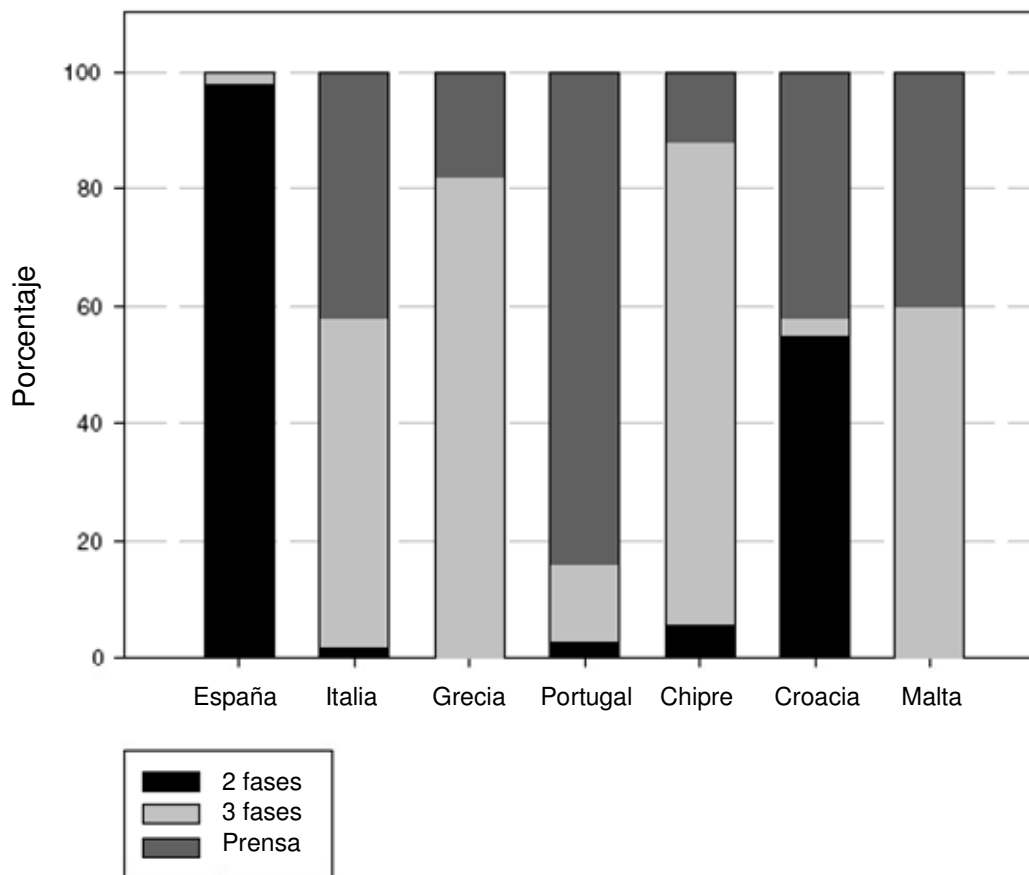


Figura 2. Tecnologías usadas para la extracción del aceite de oliva en los principales países productores (Roig *et al.*, 2006).

2.3. Características y composición química

El alpeorajo, al ser un residuo agrícola, modifica sus características químicas en función de la campaña oleícola, dependiendo de variables como las condiciones climatológicas de la cosecha, la variedad del olivo o el grado de maduración del fruto.

La primera característica agroquímica destacada del alpeorajo es su gran contenido en agua (56% de su peso) lo que le confiere una consistencia semisólida que dificulta su manejo (Albuquerque *et al.*, 2004). En cuanto a su composición, al ser de origen vegetal, contiene gran cantidad de lignina, celulosa y hemicelulosa (46, 38 y 21% respectivamente). Por tanto, se trata de

un residuo lignocelulósico con gran cantidad de materia orgánica (MO) y carbono orgánico total (COT) (932,6 y 519,8 g/kg, respectivamente) (Tabla 1). Además, posee grasas (13% de la materia orgánica total), carbohidratos (10%) y proteínas (8%). En cuanto a los nutrientes, se ha descrito que este residuo tiene gran contenido de K (19,8 g/kg) e Fe (0,614 g/kg), pero pequeño en otros como P, Ca, Mg y Na (Alburquerque *et al.*, 2004).

Como residuo de la industria del aceite de oliva, el alpeorujo posee un elevado contenido de fenoles, de hecho, sólo un 1% de los fenoles procedentes de la aceituna quedan en el aceite, y un 98% en los residuos generados (Rodríguez *et al.*, 2009). El perfil fenólico del alpeorujo es complejo y variable, siendo el hidroxitirosol, hidroxitirosol glucósido, tirosol y tirosol glucosilado o salidrósido, los componentes fenólicos mayoritarios detectados en el residuo tras una extracción metanol-agua, además de la oleuropeina, rutina y luteolina 7-glucósido (Sampedro *et al.*, 2004). En trabajos posteriores también llevados a cabo en nuestro laboratorio se han identificado otros componentes fenólicos del alpeorujo tras una extracción con acetato de etilo como el oleósido y una mezcla polimérica orgánica llamada polimerina (Aranda *et al.*, 2007).

Las sustancias fenólicas del alpeorujo junto al contenido lipídico, son los principales responsables de las propiedades fitotóxicas y antimicrobianas del mismo (Capasso *et al.*, 1995; Sampedro *et al.*, 2004). Por ello, este residuo no puede ser desechado sin sufrir una transformación previa para evitar efectos nocivos en el medio ambiente.

Tabla 1. Caracterización agroquímica del alpeorujo (Sampedro, 2005). CET: Carbono extraíble total.

Parámetro	Valor
pH	5,33
CET (g/kg)	215,7
Acidos húmicos (g/kg)	29,6
Acidos fúlvicos (g/kg)	186,1
P (g/kg)	2,11
N (g/kg)	18,72
K (g/kg)	30,54
Ca (g/kg)	13,61
Mg (g/kg)	3,82
Na (g/kg)	0,17
Fe (g/kg)	1,12
Cu (mg/kg)	68,97
Mn (mg/kg)	46,51
Zn (mg/kg)	65,24
Lignina (g/100 g alpeorujo)	24,36
Hemicelulosa (g/100 g alpeorujo)	9,97
Celulosa (g/100 g alpeorujo)	17,09
Fenoles totales (g/kg)	26

Lignina

Por su origen vegetal, el alpeorujo es un material mayoritariamente lignocelulósico constituido por componentes procedentes de los restos de pulpa, hueso y piel de aceituna. De todos ellos, la lignina es el componente mayoritario de este residuo. De hecho, se ha descrito la presencia de lignina tanto en el endocarpo de la aceituna (semilla), de forma mayoritaria, como en el mesocarpo y epicarpo de este fruto (Felizón *et al.*, 2000). También se ha encontrado una fracción semejante a la lignina en el tejido mesocárpico (Felizón *et al.*, 2000; Sampedro *et al.*, 2009a).

La lignina es el segundo polímero natural, tras la celulosa, más abundante en la naturaleza. Posee una estructura muy compleja y tridimensional formada por unidades fenilpropanoicas dimetoxiladas (siringol), monometoxiladas (guaiacol) y no metoxiladas (p-hidroxifenol) derivadas de alcoholes p-hidroxicinámicos, en una proporción que varía entre los diferentes grupos de plantas vasculares, tejidos y capas de la pared celular (Figura 3) (Martínez *et al.*, 2005; Widsten *et al.*, 2008). Este polímero además de proporcionar rigidez y resistencia mecánica a las plantas, es la responsable de proteger las fibras de celulosa del ataque de enzimas hidrolíticas y otros factores externos (Leonowicz *et al.*, 1999).

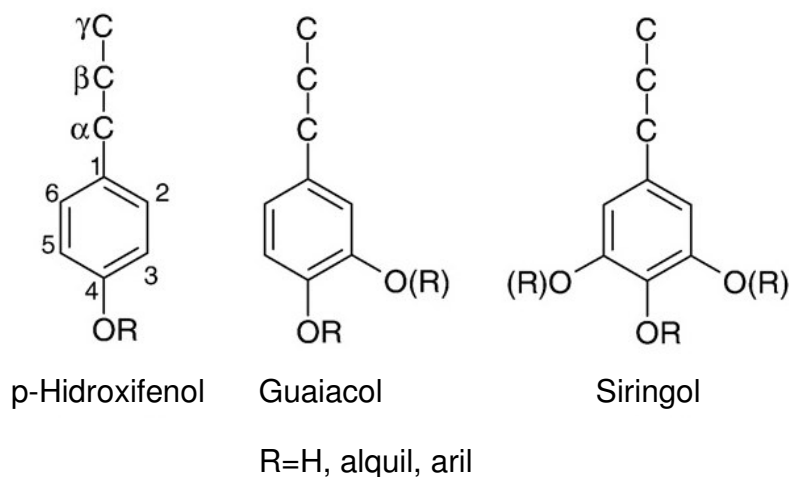


Figura 3. Unidades de lignina (Widsten *et al.*, 2008).

La lignina juega un papel principal en la biorremediación del alpeorujo ya que posee una compleja y heterogénea estructura difícil de degradar (Kirk y Farrel, 1987). La degradación de la lignina es un proceso oxidativo llevado a cabo en la naturaleza por microorganismos ligninolíticos mediante una serie de enzimas, radicales que se generan por la acción de las mismas y otros metabolitos.

2.4. Problemática medioambiental del alpeorujo

El desecho indebido de los residuos de la industria del olivar ha supuesto durante años la contaminación de aguas y suelo. Su alto contenido en carbono orgánico y nutrientes ha favorecido la aparición de procesos de eutrofización. Por otro lado, al contener lípidos, los subproductos del olivar forman una película impenetrable en la superficie de las aguas y suelo donde son vertidos disminuyendo la entrada de luz y oxígeno, alterándose así los ciclos vitales de estos sistemas.

El alpeorujo posee propiedades fitotóxicas y antimicrobianas debido principalmente a las sustancias fenólicas y al contenido lipídico del mismo (Capasso *et al.*, 1995; Sampedro *et al.*, 2004). Estos efectos negativos se deben a que los componentes fenólicos monoméricos dañan las membranas celulares causando la salida de los componentes intracelulares y la coagulación de los constituyentes citoplasmáticos y por tanto producen la muerte de la célula o la inhibición del crecimiento celular (Russell y Chopra, 1996). Los efectos fitotóxicos producidos por los fenoles monoméricos ocurren principalmente durante la germinación y el desarrollo de las plántulas (Krogmeier y Bremner, 1989). Sin embargo, la baja difusión y el elevado tamaño molecular de los fenoles poliméricos impiden su entrada a las células microbianas y vegetales, evitando dañarlas.

El alpeorujo posee otros factores, como el alto contenido en sales y el relativamente bajo pH, que producen el desequilibrio de las propiedades naturales del suelo. Además, su elevada relación C/N dificulta su aplicación directa a los cultivos ya que provoca una deficiencia de N en los mismos (Cabrera *et al.*, 2002). Otros efectos negativos en las propiedades químicas y estructurales del suelo producidos por la aplicación directa de alpeorujo al mismo son: la inmovilización del N disponible para las plantas, el aumento en la salinidad en suelos de tipo anfisol por desplazamiento del Ca y el K al complejo de cambio y la disminución del Mg asequible a las plantas por efecto antagónico con el K (Paredes *et al.*, 1999).

Estos efectos negativos que el desecho indebido del alpeorujo puede producir en el suelo, se traducen en un desequilibrio de las comunidades

microbianas de la rizosfera, estrechamente relacionadas con el correcto desarrollo de las plantas (Graystone y Campbell, 1996). Estos microorganismos del suelo juegan un papel clave en el ciclado de nitrógeno, azufre y fósforo, y en la descomposición de residuos orgánicos, incrementando la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Pankhurst *et al.*, 1995). Además, existen microorganismos rizosféricos que producen hormonas, vitaminas y otras sustancias que estimulan la germinación, enraizamiento y crecimiento de las semillas (Gadagi *et al.*, 2003). También una adecuada composición de la comunidad microbiana del suelo produce incremento en la tolerancia de las plantas a la salinidad y la sequía, y protección frente a patógenos gracias a fenómenos de antagonismo entre microorganismos. Además, la presencia de las comunidades microbianas del suelo mejoran, la estructura del mismo como consecuencia de la contribución en la formación de agregados estables.

Ante la problemática medioambiental de los residuos de la industria olivarera los distintos gobiernos de los países productores han desarrollado diferentes políticas de gestión. En la Unión Europea la política respecto a los residuos de la industria agroalimentaria en general se engloba dentro de la Directiva 15/98 de “*Tratamiento de las aguas residuales urbanas*”. Mediante esta ley se permite la reutilización de residuos siempre y cuando hayan sufrido el tratamiento apropiado que evite los efectos adversos que su reciclaje o vertido puedan ocasionar al medio ambiente.

En España, los residuos líquidos de la industria del olivar eran vertidos directamente a los ríos produciendo grandes problemas de contaminación. En 1981, el Gobierno prohibió este método de reciclaje y obligó a los productores a construir estanques artificiales donde almacenar tales subproductos entre campañas favoreciendo así su evaporación (Cabrera *et al.*, 1996).

El alpeorujo tiene una consistencia semisólida, debido al alto porcentaje de humedad que presenta (55-70% de humedad) (Borja *et al.*, 2006), lo cual dificulta su manejo, transporte y almacenamiento, y por tanto de gestión del residuo. Además, el alto contenido en compuestos fenólicos que posee este residuo le confieren propiedades fitotóxicas y antimicrobianas muy perjudiciales

si se desecha de forma directa al medio ambiente (Capasso *et al.*, 1995; Sampedro *et al.*, 2004).

El gran incremento en la producción de aceite de oliva en los últimos años ha supuesto la generación de enormes cantidades de alpeorujo concentradas, además, en zonas muy concretas, como es el caso de Andalucía, principal zona de cultivo del olivo en España. Por tanto se hace necesario encontrar soluciones para la eliminación o revalorización de estos subproductos en los países de la cuenca mediterránea, principales productores de aceite de oliva.

3. Biorremediación

La intensificación de la industria conlleva la generación de grandes cantidades de residuos que no pueden ser vertidos directamente al medio por sus propiedades contaminantes. Se hace necesaria, por tanto, una correcta gestión de los residuos que incluya la instauración de tratamientos que minimicen su impacto en el medio ambiente y propicien el uso sostenible de los recursos. Los tratamientos que se utilizan para la remediación y revalorización de los subproductos industriales son procesos físicos, químicos o biológicos capaces de eliminar o disminuir los componentes contaminantes de los residuos y mejorar las propiedades de los mismos.

La biorremediación es la aplicación de procesos biológicos para estimular la degradación de contaminantes o la recuperación del ecosistema (Gianfreda y Rao, 2004). En este proceso, los organismos utilizados eliminan los residuos que resultan tóxicos debido a que los usan como materia prima para su crecimiento, provocando su degradación, oxidación y, por tanto, desaparición. Algunas de las ventajas de los procesos de biorremediación es que son tratamientos más baratos que los métodos convencionales y suelen ser soluciones permanentes que, además, no generan residuos (Wood, 2008).

De forma general, los procesos de biorremediación de residuos se pueden realizar a través de diferentes organismos como plantas (fitorremediación), animales capaces de desarrollarse en medios con fuerte toxicidad (lombrices, microorganismos) o mediante degradación enzimática (Gianfreda y Rao, 2004).

La biorremediación por microorganismos se puede llevar a cabo a través de una digestión aerobia, mediante la aplicación de aire que estimule el crecimiento y la capacidad oxidativa de los microorganismos; o una digestión anaerobia, en la cual los microorganismos degradan el residuo en ausencia de oxígeno. Dentro de los procesos de digestión aerobia encontramos el compostaje, proceso controlado en el que intervienen numerosos microorganismos que requieren condiciones específicas como oxígeno, humedad del 50-60% y sustratos orgánicos heterogéneos en estado sólido. Tras el compostaje se genera un producto estabilizado llamado compost que posee valor fertilizante, de fácil manipulación y almacenaje y cuyo empleo directo en el suelo no provoca efectos adversos.

Los procesos de biorremediación por degradación enzimática consisten en el tratamiento del sustrato a detoxificar con enzimas capaces de degradar los compuestos nocivos o recalcitrantes de dicho producto. Estos procesos ayudan a la biodegradación de los compuestos contaminantes gracias a la acción de enzimas extracelulares de determinados microorganismos, encargadas de la solubilización del compuesto para la posterior introducción en la célula viva y su metabolización. También estas enzimas pueden contribuir a la detoxificación de los contaminantes convirtiéndolos en otros compuestos de estructura más sencilla y, por tanto, más fácilmente biodegradable. La utilización de enzimas como tratamiento de biorremediación tiene una serie de ventajas respecto al uso de organismos completos: las enzimas tienen gran especificidad de sustrato, son biodegradables y pueden actuar en condiciones ambientales a menudo desfavorables para el desarrollo de microorganismos o plantas, como puede ser una elevada concentración del compuesto contaminante a tratar (Gianfreda y Rao, 2004, Rodríguez Couto y Toca Herrera, 2006).

Las enzimas utilizadas en tratamientos de biorremediación son producidas previamente por microorganismos que pueden estar modificados genéticamente o no, y posteriormente añadidas al residuo para su biorremediación. Entre los organismos utilizados para la producción de estas enzimas se han utilizado principalmente bacterias y hongos, de entre los que destacan los llamados hongos ligninolíticos (Tabla 2) (Gianfreda y Rao, 2004).

Tabla 2. Biodegradación de contaminantes por enzimas extracelulares (Gianfreda y Rao, 2004).

Contaminante	Enzimas	Origen
Antraceno, pireno	Lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasa	<i>Nematoloma forwardii</i>
Asfaltenos	Cloroperoxidasa	<i>Cladartomyces fumago</i>
Carbofuranos, carbarilo	Carbamato hidrolasa	<i>Achromobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.
Cianidas	Cianidasa, cianida hidratasa	<i>Alcaligenes denitrificans</i>
Nitrilos	Nitrilasa, nitrilo hidratasa, amidasa	<i>Nocardia</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Fusarium solani</i>

La biorremediación enzimática está siendo muy utilizada para el tratamiento de tintes industriales y residuos de la industria papelera y para la biorremediación de numerosos contaminantes en suelos o sistemas acuáticos como restos de pesticidas, fertilizantes, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), municiones, metales pesados, compuestos organofosforados, fenoles y otros residuos (Wesenberg *et al.*, 2003; Gianfreda y Rao, 2004; Scott *et al.*, 2008; Yair *et al.*, 2008).

4. Valorización del alpeorujo

Las propiedades contaminantes de los subproductos de la industria del olivar plantean la necesidad de buscar formas de aprovechamiento o remediación de los mismos. Los métodos de tratamiento biológico convencionales, por ejemplo, lagunas aireadas y plantas de lodos activados, son escasamente efectivos en la remediación de los subproductos agrícolas. En los últimos años se han realizado numerosos estudios para lograr usos

alternativos del alpeorujo, mediante tratamientos tanto físico-químicos como biológicos.

4.1. Tratamientos físico-químicos

Producción de aceite de orujo

El alpeorujo puede secarse en unos secaderos rotativos con aire caliente a 400 °C hasta obtener un residuo con solo un 5% de humedad que se utilizará para la obtención del aceite de orujo. Para ello, este alpeorujo seco sufre una nueva extracción con hexano para obtener todo el aceite residual y genera un nuevo subproducto: el alpeorujo seco y extractado u orujillo con un porcentaje de aceite muy bajo y una humedad del 10 al 13%. Este proceso se ha optimizado para solucionar una serie de problemas, como el elevado consumo de energía necesario y la caramelización de los azúcares del residuo (Arjona *et al.*, 1999). Actualmente, y aunque el consumo de aceite de orujo es escaso, el secado del alpeorujo se está llevando a cabo para obtener un residuo menos húmedo y por tanto más manejable a la hora de su valorización (Roig *et al.*, 2006).

Generación de energía

Actualmente la principal fuente de energía proviene de los combustibles fósiles, cuya extracción es cara y altamente contaminante, además, éstos son recursos limitados. Debido al desarrollo creciente de la industria que genera una gran demanda de energía necesitamos buscar fuentes alternativas de la misma como pueden ser los métodos de conversión termoquímica de la biomasa de subproductos de la agricultura.

El alpeorujo seco y extractado se puede utilizar como combustible para la cogeneración de energía eléctrica y térmica por combustión ya que posee un potencial térmico considerable (400 kcal/kg) (Arjona *et al.*, 1999; Roig *et al.*, 2006). La energía generada puede emplearse en el secado del residuo, abaratando el coste energético necesario en este proceso (Roig *et al.*, 2006).

Sin embargo, el proceso de pirólisis del alpeorujito seco y extractado para la generación de energía produce determinados subproductos no deseados como hollín o alquitrán (Encinar *et al.*, 2009). Otra alternativa de producción de energía a partir del alpeorujito es mediante el método físico-químico que propone Jurado *et al.* (2003) por el que a partir de biomasa de alpeorujito se obtiene un gas sintético llamado "syngas" formado por una mezcla de CO₂ y H₂ del que se obtiene un combustible sintético.

Extracción de compuestos de interés

Se ha demostrado que los polifenoles proporcionan un efecto protector en los eritrocitos humanos y el ADN contra daños oxidativos, ayudando a prevenir enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias e incluso cancerosas (Rodríguez *et al.*, 2009). Todos estos beneficios plantean la necesidad de recuperar los polifenoles que posee el alpeorujito para su aprovechamiento en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

Se han realizado estudios para el diseño de métodos de extracción de fenoles a partir del alpeorujito como el denominado sistema de explosión al vapor (*steam-explosion*) mediante el cual, el residuo se somete a 200 °C durante 5 min en presencia de un catalizador ácido, tras lo cual se obtiene un residuo sólido y uno líquido. A partir del residuo líquido se puede extraer fácilmente compuestos fenólicos como hidroxitirosol, oleuropeína o 3,4-dihidroxifenilglicol, compuesto recientemente descrito en el alpeorujito y de gran poder antioxidante (Rodríguez *et al.*, 2009; Suárez *et al.*, 2009). Además, a partir de este residuo sólido se puede extraer manitol mediante procesos de ultrafiltración, intercambio iónico o cristalización para su uso en alimentación (Fernandez-Bolaños *et al.*, 2000; Ballesteros *et al.*, 2001).

Hay otros compuestos de gran interés, que se pueden extraer a partir de este residuo mediante hidrólisis ácida, como las pectinas, usadas en la industria alimentaria como agente gelificante y estabilizante, (Cardoso *et al.*, 2003), la glucosa, el furfural y oligosacáridos (Borja *et al.*, 2006).

Generación de bioabsorbentes

Se ha estudiado el posible uso del alpeorujo como bioabsorbente de sustancias contaminantes, como metales pesados o pesticidas, presentes en suelos o sistemas acuáticos, evitando así la utilización de otros métodos físico-químicos muy caros y complicados.

El alpeorujo puede reducir en un 80 y 75% la cantidad de Pb y Cd, respectivamente, en soluciones acuosas (Martínez-García *et al.*, 2006). En este sentido, también se ha utilizado el alpeorujo compostado como complemento en un proceso de fitorremediación de suelos contaminados con Zn y Pb, aprovechando así la doble capacidad del residuo como bioabsorbente y abono orgánico (Nogales y Benítez, 2006). Se ha estudiado la aplicación de alpeorujo como bioabsorbente en suelos para la eliminación de restos de herbicidas e insecticidas (simazina e imidacloprid) reduciendo así el riesgo de contaminación de acuíferos (Albarrán *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2004). Puede también utilizarse el alpeorujo para la eliminación en suelos del tricloroetileno, compuesto que afecta negativamente a la diversidad bacteriana y a las actividades bioquímicas del suelo. El alpeorujo puede, además de eliminar dicho contaminante, funcionar como enmendante del suelo contaminado aumentando el contenido en compuestos húmicos del mismo y mejorando las actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo del carbono. Sin embargo, antes de su aplicación como absorbente, este alpeorujo debe someterse a un proceso de transformación para evitar los compuestos y características contaminantes que el propio residuo posee (Moreno *et al.*, 2009).

Relacionada con esta función como bioabsorbente, el alpeorujo puede también transformarse mediante un proceso químico en carbono activo. Este compuesto es un material microporoso con gran superficie activa que se está utilizando para eliminar tintes o contaminantes como As o Al mediante procesos de adsorción (Borja *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2008).

Otras formas de valorización

Se han estudiado otros posible usos del alpeorujo como son la fabricación de piensos para rumiantes (Molina y Nefzaoui, 1996; Molina-Alcaide y Yáñez-Ruiz, 2008), su uso como herbicida natural (Kaddour *et al.*, 2005) o para la fabricación de recipientes mezclándolo con polímeros termoplásticos (Siracusa *et al.*, 2001).

4.2. Tratamientos biológicos

Producción de energía

Mediante un proceso de digestión anaerobia, el alpeorujo se puede utilizar como sustrato para la producción de biogás (mezcla de CH₄ y CO₂) (Tekin y Dalgic, 2000) o de metano (Borja *et al.*, 2003), ambos utilizados para generación de energía. Tras este tratamiento, también se obtiene un residuo sólido muy rico en materia orgánica que podría utilizarse como enmendante de cultivos. Sin embargo, el principal problema que plantea el uso del alpeorujo para este fin es su alto contenido fenólico, que inhibe la actividad y crecimiento de los microorganismos implicados (Roig *et al.*, 2006).

Producción de alcoholes

A través del sistema de explosión al vapor se genera un residuo sólido que después de tratarlo con celulasas y una posterior fermentación con levaduras, se obtiene etanol (Borja *et al.*, 2006).

Abono orgánico

El alpeorujo, dado su alto contenido en materia orgánica, macro y micronutrientes así como su pH ligeramente ácido, podría emplearse como abono mineral para las plantas (Nogales *et al.*, 1999). Sin embargo, éste posee

determinadas propiedades tóxicas que hacen inviable su aplicación directa al suelo. Por un lado su alto contenido en compuestos fenólicos confiere al alpeorujo propiedades fitotóxicas y antimicrobianas (Capasso *et al.*, 1995; Sampedro *et al.*, 2004) y por otro su elevada relación C/N hace que su uso directo en un cultivo provoque déficit de N que debería corregirse con una fuente adicional del mismo (Cabrera *et al.*, 2002). Además, su contenido en P, Ca y Mg es bajo en comparación con otro tipo de enmendantes orgánicos, como el estiércol (Albuquerque *et al.*, 2004). Por lo tanto, es necesario corregir previamente estas características que impiden su utilización directa como fertilizante.

Dado que la mayoría de los constituyentes orgánicos que presenta el alpeorujo son lignina, hemicelulosa y celulosa, se planteó la digestión aerobia o el compostaje como uno de los métodos de revalorización en fertilizante orgánico más efectivos. En este tipo de residuos encontramos, además, otros componentes que constituyen un buen sustrato de crecimiento de microorganismos, destacando la gran cantidad de carbohidratos solubles como el manitol, sacarosa y fructosa (Guillén *et al.*, 1992; Albuquerque *et al.*, 2004) y una cantidad considerable de polisacáridos pécticos y polímeros de hemicelulosas ricos en xilano y xiloglucanos (Jiménez *et al.*, 2001).

Existen estudios de procesos de compostaje del residuo en los que se observa una reducción del contenido fenólico, disminución de lípidos, así como aumento del índice de germinación en ensayos de fitotoxicidad (Albuquerque *et al.*, 2006; Cayuela *et al.*, 2006; Kohler *et al.*, 2008). Se han desarrollado también procesos de vermicompostaje tanto del alpeorujo como de otros subproductos del olivar en los que se obtuvo una disminución de la fitotoxicidad del residuo, mejora en las propiedades químicas del mismo y disminución de la proporción C/N (Nogales *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 2009).

Sin embargo, el tiempo necesario para llevar a cabo este tipo de tratamientos es excesivamente largo (hasta 49 semanas) y, además, presentan otros inconvenientes como la necesidad de añadir agentes de soporte adicionales debido a la escasa porosidad de estos residuos, o la implantación de un sistema mecánico que garantice la ventilación óptima para el desarrollo

del compostaje y evite la formación de agregados (Alburquerque *et al.*, 2006; Alburquerque *et al.*, 2009).

5. Biorremediación del alpeorujó con hongos

En general, los estudios muestran que los hongos son más efectivos que las bacterias en la degradación tanto de fenoles simples como de compuestos fenólicos complejos presentes en el alpeorujó. La razón es que la estructura de los componentes aromáticos presentes en este residuo son análogos a los monómeros de lignina y sólo unos pocos microorganismos, principalmente hongos degradadores de la madera, son capaces de degradar eficazmente la lignina gracias a su maquinaria enzimática (Hattaka, 1994). Hay estudios de biorremediación del alpeorujó con hongos ligninolíticos en los que observan un descenso notable del contenido fenólico y de la fitotoxicidad del residuo. De hecho, se ha demostrado que tras la incubación del alpeorujó seco y extractado con hongos degradadores de la madera como *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata* y *Pycnoporus cinnabarinus* durante 20 semanas, se conseguía la eliminación completa de los fenoles monoméricos del residuo (Sampedro *et al.*, 2004). Otros autores han puesto de manifiesto que *Pleurotus ostreatus* también es capaz de reducir hasta en un 90% los fenoles del alpeorujó seco y extractado tras 4 meses de fermentación (Saavedra *et al.*, 2006). Se ha estudiado, asimismo, cambios en la composición del alpeorujó seco y extractado y reducción de su fitotoxicidad tras la incubación con hongos no ligninolíticos. Concretamente, Sampedro *et al.*, (2005) observaron que la incubación del alpeorujó seco y extractado con el hongo *Fusarium lateritium* durante 20 semanas redujo en un 80% su contenido en fenoles, consiguiéndose un producto no fitotóxico que logró aumentar el peso de plantas de tomate (Sampedro *et al.*, 2005). Otros estudios observaron que después de tratar el alpeorujó 20 semanas con *F. oxysporum*, se redujo su contenido en lignina, hemicelulosa y grasas en un 16, 25 y 71%, respectivamente, además de su fitotoxicidad frente a plantas de tomate, soja y alfalfa (Sampedro *et al.*, 2007b).

Con objeto de acortar el tiempo necesario de tratamiento del alpeorujó para la reducción o eliminación de su fitotoxicidad, se buscaron alternativas en

el proceso de transformación del residuo. En nuestro laboratorio se propuso la combinación de un tratamiento mixto en el que incluía un fraccionamiento físico y un tratamiento biológico. Se observó que varios hongos saprobios después de 15 días de incubación en diferentes fracciones físicas del alpeorujo, obtenidas mediante su extracción con diferentes solventes orgánicos, redujeron hasta un 73% los fenoles del residuo y su fitotoxicidad sobre plantas de tomate (Aranda *et al.*, 2006; 2007). Otra estrategia en el proceso de aceleración de la transformación del alpeorujo fue el uso de inóculos de hongos de la podredumbre blanca inmovilizados en soportes inertes como esponja de poliuretano. Se ha observado que la incubación de alpeorujo seco y extractado con *P. radiata* durante solo cuatro semanas produjo disminución del contenido fenólico y fitotoxicidad en la germinación de semillas de berro y lechuga cercanas al 80% (Sampedro *et al.*, 2009b).

Se están realizando también estudios de biorremediación enzimática del alpeorujo y otros subproductos de la industria del aceite de oliva, para la eliminación de sus compuestos fenólicos mediante la aplicación de enzimas peroxidasas, sin embargo, estos tratamientos dependen de la aplicación de H₂O₂ (Barakat *et al.*, 2009).

6. Hongos ligninolíticos

Los hongos ligninolíticos son organismos tanto del grupo de los Basidiomicetos como Ascomicetos, que crecen en la madera y juegan un papel esencial en el ciclo del carbono (Wesenberg *et al.*, 2003). Estos hongos poseen un sistema enzimático extracelular que se originó en el periodo Devónico superior, paralelamente a la evolución de las plantas vasculares, poniendo por tanto de manifiesto su relación con los procesos de formación y degradación de la lignina (Eriksson *et al.*, 1990). Atendiendo a un criterio ecofisiológico, dentro de este grupo encontramos hongos de la podredumbre blanda, parda y blanca, según los materiales lignocelulósicos a los que ataca.

6.1. Hongos de la podredumbre blanda

Los hongos de la podredumbre blanda atacan a la celulosa y hemicelulosa de la madera reblandeciendo sus tejidos y produciendo una descomposición superficial de la misma, por lo que aparecen en las etapas más tempranas del proceso de pudrición. Son, en su mayoría, hongos Ascomicetes y la fase asexual de los mismos: los llamados Deuteromicetes, de entre los destacan *Alternaria alternata* y el género *Paecilomyces* spp También algunos basidiomicetos pueden provocar este tipo de podredumbre (Martínez *et al.*, 2005).

6.2. Hongos de la podredumbre parda

Los hongos pertenecientes a este grupo atacan fundamentalmente compuestos celulósicos y hemicelulósicos y producen una degradación parcial de la lignina generando una acumulación de lignina oxidada que aporta el color pardo al que debe su nombre (Martínez *et al.*, 2005). Son exclusivamente Basidiomicetos y representan únicamente el 7% de los hongos degradadores de la madera. Algunas de las especies destacadas de este tipo de hongos ligninolíticos son *Gloeophyllum trabeum* y *Laetiporus sulphureus* (Martínez *et al.*, 2005).

6.3. Hongos de la podredumbre blanca

Los hongos de la podredumbre blanca son los organismos más frecuentes en el proceso de podredumbre de la madera y se caracterizan porque degradan preferentemente la lignina y producen acúmulos de celulosa que dan a la madera una apariencia blanquecina (Pointing, 2001). Estos hongos producen degradación de los componentes de la madera y provocan su despolimerización y mineralización hasta CO₂ y H₂O (Chen y Chang, 1985). Se ha descrito que estos hongos producen dos tipos diferentes de degradación (Erikson *et al.*, 1990; Zabel y Morrell, 1992; Schwarze *et al.*, 2000):

- Deslignificación selectiva o secuencial: en la que los hongos producen un ataque selectivo inicial a la hemicelulosa y lignina de la madera y posteriormente atacan a la celulosa. Es producida exclusivamente por hongos Basidiomicetos como *Ganoderma australe* o especies del género *Pleurotus*.
- Degradación simultánea: en este caso tanto la lignina, hemicelulosa y celulosa de la madera son atacadas de forma simultánea. Este tipo de degradación se da tanto en Basidiomicetos (*Trametes versicolor*, *P. chrysosporium*) como en algunos Ascomicetos (*Xylaria hypoxylon*).

Para realizar este proceso degradativo de los componentes lignocelulósicos, 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).

Se ha descrito que las enzimas producidas por estos hongos son capaces de degradar una gran diversidad de polímeros orgánicos complejos, algunos contaminantes ambientales e incluso compuestos xenobióticos, con una estructura química similar a la lignina gracias a la alta inespecificidad del sustrato (Thurston, 1994). Por ello, estos hongos y sus enzimas son considerados candidatos apropiados para la biorremediación de muchos subproductos agrícolas donde la lignina es su principal componente.

7. Ligninolisis

Las principales enzimas implicadas en la ligninolisis son enzimas oxidorreductasas, del tipo fenoloxidasas, como la lacasa, y peroxidasas como la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y la peroxidasa versátil (VP). Otras enzimas implicadas en el proceso de ligninolisis son las enzimas tipo oxidasas, como la aril-alcohol oxidasa (AAO) y la glioxal oxidasa que generan H_2O_2 , deshidrogenasas asociadas al micelio del hongo como la aril-alcohol deshidrogenasa y quinona reductasa (Martínez *et al.*, 2005). Algunas enzimas tienen un papel regulador en la ligninolisis destacando la

glucosa-1-oxidasa, la celobiosa quinona oxidorreductasa y la aril-alcohol oxidasa (Leonowicz *et al.*, 1999). Recientemente, se ha identificado un tipo de enzima con propiedades tanto de las enzimas peroxidasa como de las oxigenasas, ya que introduce oxígeno en las moléculas aceptoras utilizando como sustrato el peróxido de hidrógeno. Esta enzima se ha denominado peroxigenasa aromática y se ha identificado en hongos colonizadores de la madera del orden Agaricales como *Agrocybe aegerita* (Ullrich *et al.*, 2004; Aranda *et al.*, 2009).

El proceso de ligninólisis requiere la coordinación de toda una maquinaria enzimática y la intervención de algunos metabolitos y radicales generados en el proceso (Figura 4). Así, las enzimas peroxidasa ligninolíticas y la lacasa oxidan el polímero de lignina generando radicales aromáticos. Éstos pueden producir reacciones no enzimáticas como la ruptura de enlaces tipo éter, fragmentación del anillo aromático, ruptura de enlace C α -C β y demetoxilación.

En la ruptura de un enlace éter, se generan radicales fenoxi que pueden repolimerizarse en la lignina o pueden ser reducidos por oxidasa como la aril-alcohol oxidasa (i) produciendo compuestos fenólicos que se reoxidan por la enzima lacasa o por peroxidasa (j). Los radicales tipo fenoxi también pueden sufrir una segunda ruptura de un enlace, en este caso, de tipo C α -C β , generando *p*-quinonas (k).

Los radicales aromáticos generados por lacasa o peroxidasa en un primer paso de ligninólisis, pueden sufrir también una ruptura de enlace C α -C β , de la que se generan aldehídos aromáticos (d), sustratos de las enzimas aril-alcohol oxidasa (f) y aril-alcohol deshidrogenasa (f') con la producción de H₂O₂ que, a su vez, es cosustrato necesario para la actividad de las enzimas LiP, VP y MnP. Estos aldehídos aromáticos también pueden ser atacados por lacasa o por peroxidasa para la generación de quinonas (g).

Las quinonas producidas por las diferentes rutas descritas, intervienen en procesos cíclicos en los que actúan lacasas, peroxidasa (m) y quinonas reductasas (l) y se produce O₂^{•-}. Esta especie reactiva de oxígeno está implicada en la reducción del catión Fe³⁺ (n) presente en la madera, y posteriormente se ve reoxidado (o) con la intervención de H₂O₂ que es, a su vez, reducido a OH[•]. Este radical hidroxilo es un fuerte oxidante que puede

iniciar el ataque a la lignina en las primeras etapas de la podredumbre de la madera (p), cuando las enzimas ligninolíticas no pueden penetrar fácilmente en los tejidos cerrándose el proceso de ligninólisis o interviene, nuevamente, en la actividad enzimática de las peroxidadas (Martínez *et al.*, 2005).

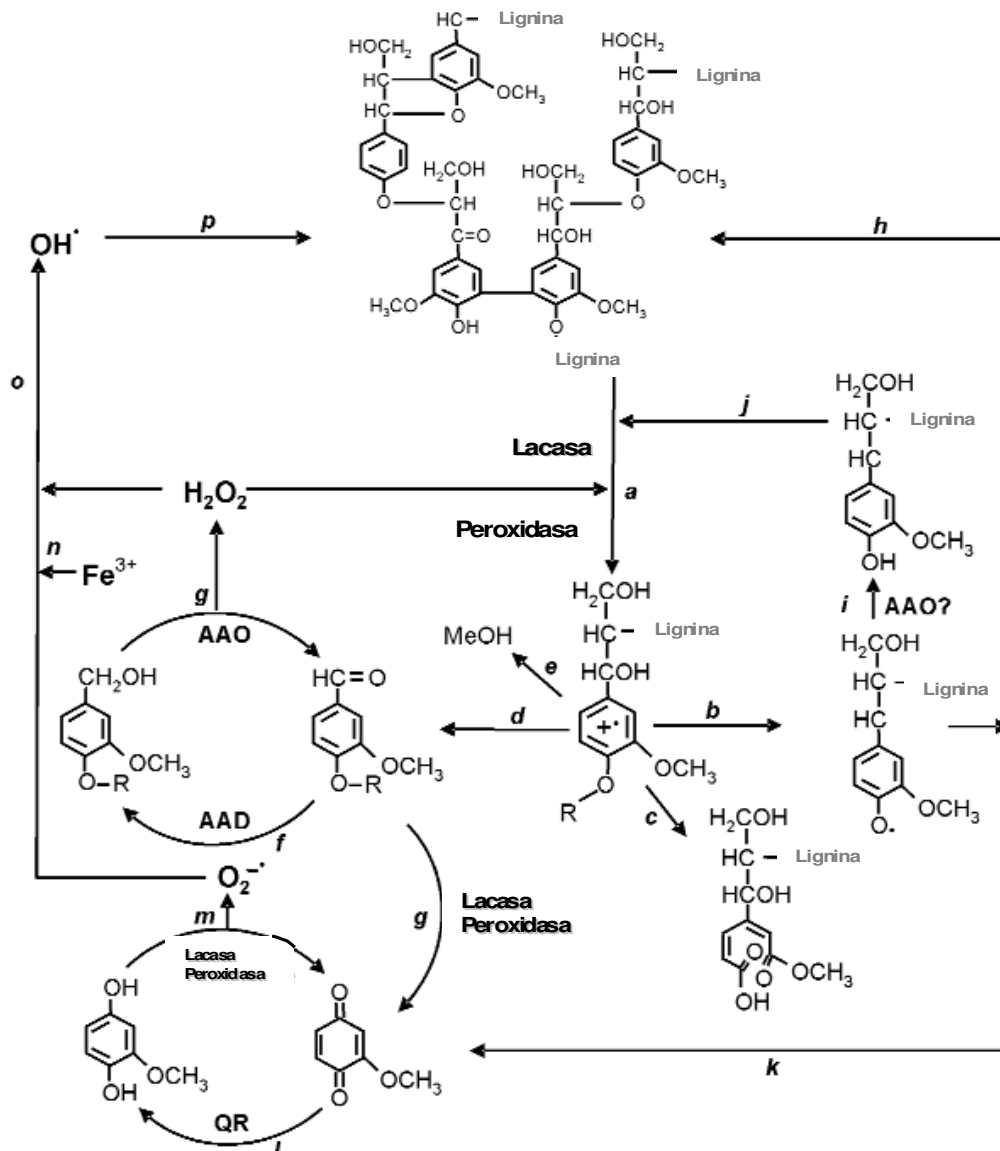


Figura 4. Proceso de ligninólisis (Martínez *et al.*, 2005).

En este proceso se ha identificado la glucosa-1-oxidasa (GOD) como clave de la regulación del mismo. Esta enzima utiliza las quinonas producidas por lacasas, peroxidadasas o por reacciones no enzimáticas de la ligninólisis como sustrato en la oxidación de glucosa en ausencia de oxígeno como aceptor de electrones, produciéndose H_2O_2 , D-glucosa- δ -lactosa y la consecuente reducción de dichas quinonas. El primer producto es utilizado, como se ha visto, por peroxidadasas, mientras que el segundo puede continuar en un proceso de glicólisis o en el ciclo de las pentosas fosfato. GOD regula el exceso de quinonas al reducirlas a sus respectivos fenoles que pasan a ser sustratos de enzimas como las dioxigenasas generando quetoácidos que intervienen en el ciclo de Krebs. Además, al producir H_2O_2 , la GOD ayuda a incrementar la despolimerización de la lignina aumentando la actividad de las enzimas LiP y MnP y evitando así repolimerización de los radicales (Leonowicz *et al.*, 1999).

Por último, la lacasa también produce la eliminación de los grupos tipo metoxi de los fragmentos de bajo peso molecular generados por la degradación directa de la lignina por LiP y MnP, produciendo oligos demetilados de menos peso (Leonowicz *et al.*, 1999).

8. Enzimas ligninolíticas

En esta compleja maquinaria enzimática destacan el grupo de las peroxidadasas y la lacasa, enzima clave del ciclo de la degradación de la lignina. Las peroxidadasas son oxidorreductasas implicadas en la biodegradación de la lignina que catalizan oxidaciones tras su activación con H_2O_2 y en presencia de mediadores. El H_2O_2 se genera por oxidadasas extracelulares que reducen el O_2 a peróxido de hidrógeno en una reacción catalítica. Las tres peroxidadasas implicadas en la degradación de lignina por hongos son la lignina peroxidada, manganeso peroxidada y peroxidada versátil.

Lignina peroxidasa

La lignina peroxidasa (LiPx) es una glicoproteína monomérica que contiene un grupo hemo como grupo prostético. Se produce durante el metabolismo secundario del hongo en atmósfera de oxígeno y en cultivos en los que el crecimiento está limitado en nitrógeno o carbono. Oxida, en una reacción mediada por una molécula de H₂O₂, unidades fenólicas y no fenólicas de la lignina degradando este polímero junto con las otras enzimas ligninolíticas. Su actividad catalítica se desarrolla en un ciclo en el que el H₂O₂ oxida con dos electrones a la enzima y ésta oxida a dos núcleos aromáticos al recoger un electrón de cada uno.

Manganeso peroxidasa

La manganeso peroxidasa (MnPx) es una glicoproteína con un grupo hemo como grupo prostético. Cataliza la oxidación de Mn²⁺ a Mn³⁺ el cual es responsable de la oxidación de lignina y de varios compuestos modelo de lignina fenólicos y no fenólicos. En ausencia de H₂O₂ puede funcionar como oxidasa, usando como sustrato NAD(P)H y produciendo H₂O₂. Tiene un ciclo catalítico similar a la lignina peroxidasa.

Peroxidasa versátil

Fue descrita inicialmente en *Pleurotus eryngii* como una peroxidasa capaz de oxidar el Mn²⁺ pero también otros compuestos aromáticos no fenólicos (Martínez *et al.*, 1996). Es un nuevo tipo de peroxidasa que comparte propiedades catalíticas con la LiP y MnP y que oxida además sustratos fenólicos que no pueden oxidar estas enzimas (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2001)

Por ello, numerosos estudios se han centrado en la demostración del papel que juega dicha enzima en la degradación de lignina y de otros compuestos xenobióticos o contaminantes ambientales de estructura similar a la lignina.

9. Lacasa

Las lacasas (p-difenol:dioxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) son enzimas tipo fenoloxidasas ampliamente distribuidas entre plantas superiores, hongos y algunas bacterias, con función muy diferente dependiendo del organismo (Duran *et al.*, 2002; Rodríguez Couto y Toca Herrera, 2006; Ullrich y Hofrichter, 2007). En plantas, este tipo de enzimas intervienen en la síntesis de lignina y en el proceso de respuesta primaria. En hongos producen la coloración o pigmentación de conidios, la síntesis de la pared celular y además, son enzimas clave del proceso de ligninólisis llevado a cabo mayoritariamente por hongos de la podredumbre blanca como se ha descrito anteriormente (Thurston, 1994).

Las lacasas son proteínas N-glicosiladas con un contenido en carbohidratos que representa entre el 10 y el 45% del peso de la molécula (Thurston, 1994). Generalmente, aparecen en forma monomérica, con una masa molecular entre 36 y 80 kDa, aunque la mayoría se encuentra entre 50-70 kDa (Thurston, 1994). Presentan un pI entre 2.6 y 4.5, y su máxima actividad varía en un amplio rango de pH, entre 2.0 y 8.5 (Thurston, 1994; Leonowicz *et al.*, 2001; Saparrat *et al.*, 2002; Wesenberg *et al.*, 2003).

En general, la reacción que produce la lacasa es la oxidación directa de las unidades de lignina fenólicas, compuestos fenólicos y otros compuestos aromáticos, con el oxígeno molecular como aceptor de electrones, que se reduce a agua (Thurston, 1994). Además, se ha demostrado que la lacasa participa en la producción de especies reactivas de oxígeno como H_2O_2 , OH^- y O_2^- (Guillén *et al.*, 2000) y en la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} (Guillén *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1997b). Tanto el Mn^{3+} como el radical hidroxilo intervienen en una fase inicial de la ligninólisis cuando las enzimas no pueden penetrar a través de las paredes celulares de las plantas (Evans *et al.*, 1994; Joseleau *et al.*, 1994). Asimismo, este tipo de enzima puede producir la demetoxilación de compuestos producidos en la oxidación directa de la lignina por las peroxidasas LiP y MnP (Thurston, 1994; Leonowicz *et al.*, 1999).

Las lacasas se caracterizan por tener una baja especificidad de sustrato y porque su actividad varía en función de numerosos factores como pueden ser

el pH, el grado de aireación, la agitación del medio de cultivo, la fuente de nitrógeno o la presencia de inductores de la actividad. Los inductores son compuestos que influyen de forma considerable en la actividad de la enzima e incluso en la expresión de los genes que la codifican. De hecho, se sabe que los hongos de la podredumbre blanca producen diferentes isoenzimas de la lacasa de forma constitutiva o por inducción (Bollag *et al.*, 1984; Muñoz *et al.*, 1997a, De la Rubia *et al.*, 2002).

Se han identificado varios compuestos inductores de diferente naturaleza, como la 2,5-xilidina (Quaratino *et al.*, 2007; Minussi *et al.* 2007), compuestos fenólicos como la vainillina (De la Rubia *et al.*, 2002) y determinados nutrientes (Dekker *et al.*, 2007). También se ha descrito que se induce la actividad lacasa por el crecimiento conjunto del organismo de estudio productor de esta actividad con otro tipo de hongo (Zhang *et al.*, 2006).

Uno de los inductores de la actividad lacasa más estudiado, es el cobre, microelemento presente en la estructura de la enzima, capaz de aumentar significativamente los niveles de actividad de la misma (Collins y Dobson, 1997; Saparrat *et al.*, 2002). Se ha estudiado a nivel genético el papel del cobre en la regulación del gen de lacasa y la expresión de las diferentes isoenzimas de dicha proteína (Collins y Dobson, 1997; Palmieri *et al.*, 2000; Quaratino *et al.*, 2008a). Hoshida *et al.* (2005) demuestra que son necesarios niveles elevados de cobre en el medio para la producción de lacasa activa por hospedadores heterólogos y que es un elemento esencial para el proceso transcripcional de esta proteína. Sin embargo, el cobre también puede inhibir la producción de lacasa por algunos hongos como *Panus tigrinus* (Quaratino *et al.*, 2007), poniendo por tanto de manifiesto, el papel esencial que tiene este elemento en la actividad lacasa y la variabilidad de la misma respecto a factores físicos y químicos, como los ya descritos.

Otro tipo de compuestos muy influyentes en la actividad catalítica de esta enzima son los denominados mediadores. Los mediadores de la lacasa son compuestos de bajo peso molecular que actúan permitiendo la formación de interacciones específicas entre lignina y enzimas ligninolíticas, que de otra manera están limitadas debido al gran volumen y complejidad del polímero. Además, estos mediadores actúan aumentando el bajo potencial redox de

estas enzimas, que sólo permite que la oxidación directa por las lacasas se realice sobre las unidades fenólicas de la lignina, que suponen menos del 10% del total del polímero (Martínez *et al.*, 2005). Debido a estos mediadores la lacasa, por tanto, aumenta de forma considerable su potencial redox y es capaz de degradar compuestos no fenólicos e incluso xenobióticos. Estos mediadores pueden ser compuestos naturales, como ácidos orgánicos o fenoles procedentes de la propia ligninólisis (Camarero *et al.*, 2005), o sintéticos, entre los que destacan los inductores con el grupo funcional N-OH, utilizados en la degradación de pulpa de la industria papelera (Wesenberg *et al.*, 2003).

Estructura y ciclo catalítico

Las secuencias nucleotídicas de las diferentes lacasas estudiadas muestran un patrón común: todas codifican una cadena polipeptídica de entre 520-550 aminoácidos en la que los dominios de unión al cobre están muy conservados tanto en su composición aminoacídica (diez residuos de histidina y un residuo de cisteína que coordinan los átomos de cobre) como en su distribución a lo largo de la cadena polipeptídica (dos histidinas cerca del extremo amino terminal y el resto cerca del extremo carboxilo) (Thurston, 1994; Kumar *et al.*, 2003). Concretamente, estos sitios de unión a los átomos de cobre se corresponden con cuatro regiones conservadas (L1, L2, L3 y L4) que pueden contener desde 8 hasta 24 residuos a lo largo de la secuencia de la proteína e incluyen tanto los aminoácidos específicos de unión al cobre como otros no específicos (Kumar *et al.*, 2003). Los aminoácidos de unión del cobre tipo I son dos histidinas, una cisteína y una metionina. Los primeros tres residuos son esenciales para la unión del cobre tipo I y forman una estructura trigonal muy fuerte con dicho ión. Sin embargo, el enlace de este cobre con el cuarto residuo (una metionina axial) es más largo y débil. Esta metionina puede ser reemplazada por otros aminoácidos, tales como leucina o fenilalanina. Los otros sitios de unión al cobre (L2, L3 y L4) consisten únicamente en residuos de histidinas que siguen el patrón repetitivo His-X-His (Morozova *et al.*, 2007) (Figura 5).

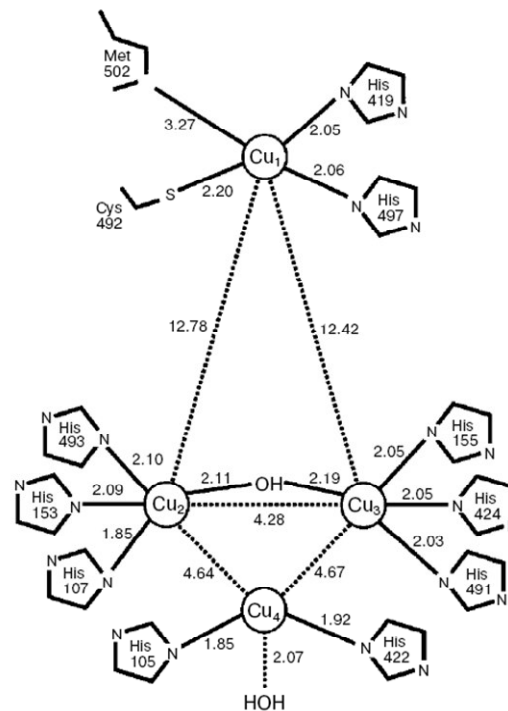


Figura 5. Esquema de los dominios de la enzima lacasa de *Bacillus subtilis*, con indicaciones de las distancias entre los átomos más importantes (Morozova *et al.*, 2007).

Esta secuencia aminoacídica se estructura en las lacasas siguiendo un esquema común constituido por tres bloques o dominios (D1, D2 y D3) con arquitectura tipo barril- β (Thurston, 1994). En esta estructura encontramos los cuatro átomos de cobre organizados en tres tipos de complejos: cobre I o T1, cobre II o T2 (ambos con un átomo de cobre) y cobre III o T3 (constituido por dos átomos de cobre). Los centros T2 y T3 se asocian formando un centro de cobre trinuclear considerado un híbrido T2/T3 (McGuirl y Dooley, 1999). El híbrido T2/T3 estaría embebido entre los dominios 1 y 3, mientras que el cobre T1 se situaría en la zona más expuesta del dominio 3, donde tiene lugar la oxidación del sustrato (Piontek *et al.*, 2002) (Figura 6).

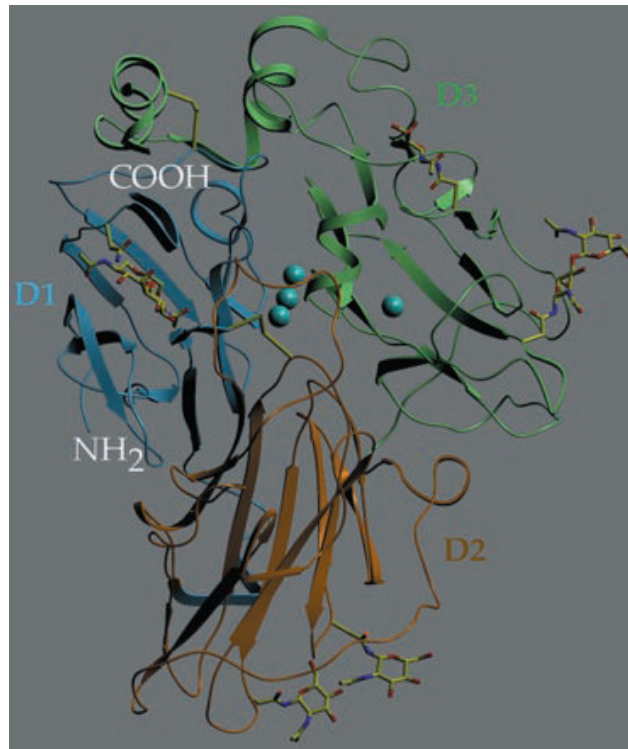


Figura 6. Estructura tridimensional de la lacasa de *T. versicolor* donde se aprecian los diferentes dominios (D1-D3) y los residuos de carbohidratos. Los iones de cobre se representan como esferas azules (Piontek *et al.*, 2002).

La actividad catalítica de las lacasas se desarrolla en un ciclo en el que intervienen los tres componentes de la molécula encargados de la transferencia de electrones desde un sustrato reductor hasta el oxígeno molecular. La reacción catalítica general de las lacasas consiste en las oxidaciones monoelectrónicas de cuatro moléculas sustrato y la posterior reducción de oxígeno a agua. Esta reducción del oxígeno molecular transcurre mediante dos pasos de reducción en el que se forman intermediarios de la enzima tipo peróxido y tipo nativa (McGuirl y Dooley, 1999; Solomon *et al.*, 2001). Tras la oxidación de cuatro moléculas sustrato en el complejo T1, los cuatro electrones pasan al complejo trinuclear T2/T3 de tres átomos de Cu²⁺, pasando entonces la molécula al máximo estado de reducción. El siguiente paso es la reducción del O₂ que se encuentra unido al complejo T2/T3. Los e⁻ son transferidos hasta el O₂ dando como resultado global la liberación de dos moléculas de agua (Wong, 2008).

Aplicaciones

Por su baja especificidad de sustrato y poder oxidativo, las lacasas se emplean en múltiples procesos de degradación de herbicidas, pesticidas y compuestos xenobióticos como hidrocarburos policíclicos aromáticos (Durán y Esposito, 2000; Pointing, 2001). Este enzima se esta aplicando en la industria alimentaria para eliminar la turbidez de zumos de frutas, cerveza o vino y para aumentar la resistencia de la masa de harina y gluten (Selinheimo *et al.*, 2006). En la industria química, la lacasa se ha estudiado para la posible producción de polímeros complejos o colorantes fenólicos sintéticos (Nicotra *et al.*, 2004; Mustafa *et al.*, 2005). La cosmética también ha aplicado esta enzima como iluminador de la piel o para reemplazar el H₂O₂ como agente oxidante en las fórmulas de los tintes (Lang y Cotteret, 1999; Golz-Berner *et al.*, 2004). Algunas de sus aplicaciones más importantes y estudiadas son en la degradación de tintes de la industria textil y en la industria papelera con la mediación de intermediarios que aumentan el potencial redox de la enzima (Camarero *et al.*, 2004; Rodríguez Couto *et al.*, 2005).

Se ha estudiado la aplicación de la lacasa en la biorremediación de residuos agroindustriales como los de caña de azúcar, alpechín y alpeorujo (Casa *et al.*, 2003, D'Annibale *et al.*, 2004, Jaouani *et al.*, 2005). La incubación del alpechín con el hongo *G. applanatum*, que producía únicamente actividad lacasa, produjo la decoloración y disminución del contenido fenólico del residuo (Matos *et al.*, 2007). También se ha estudiado la aplicación directa de lacasas semi o totalmente purificadas en el tratamiento del alpechín. De hecho Casa *et al.*, (2003) observaron disminución de la fitotoxicidad del alpechín sobre la germinación de semillas de trigo después de tratar el residuo con una isoenzima purificada de la lacasa del hongo de la podredumbre blanca *Lentinula edodes*. Minussi *et al.* (2007), estudiaron la eliminación del color y del contenido fenólico de alpechin tras su tratamiento con lacasa semipurificada de *T. versicolor*. Otros estudios realizados con lacasas purificadas de los hongos *P. chrysosporium* y *Chalara paradoxa* corroboraron que estas enzimas juegan un papel muy importante en la decoloración y detoxificación de dicho residuo

(Robles *et al.*, 2000; Tsioulpas *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la lacasa de *P. coccineus*, es capaz de disminuir la fitotoxicidad del alpechín debido a la polimerización de los fenoles de menor peso molecular (Jaouani *et al.*, 2005; Berrio *et al.*, 2007). Se han realizado, además, estudios de biorremediación secuencial del alpechín sometiendo este subproducto a un proceso inicial de incubación con el hongo *P. tigrinus* y un tratamiento posterior con lacasa comercial, obteniendo una reducción significativa del tiempo necesario del tratamiento para conseguir un descenso significativo de la fitotoxicidad del residuo (Quaratino *et al.*, 2007).

En trabajos de biorremediación del alpeorajo se ha demostrado la presencia de actividad lacasa cuando dicho residuo se incubaba con determinados hongos de la podredumbre blanca durante 2 y 20 semanas, provocando esta la polimerización de los fenoles (Sampedro *et al.*, 2005). Además, se ha observado en incubaciones del alpeorajo con determinado hongos ligninolíticos una relación clara entre el aumento de la actividad lacasa con la disminución de fenoles y de fitotoxicidad del residuo en plantas de tomate (Aranda *et al.*, 2006).

10. Lacasa del hongo *Coriolopsis rigida*

C. rigida es un hongo de la podredumbre blanca capaz de degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) (Gómez *et al.*, 2006), compuestos aromáticos y alifáticos en suelos contaminados por aceites (Colombo *et al.*, 1996), lignina de la paja de trigo (Capelari y Zadrazil, 1997) y de producir la decoloración de tintes industriales antraquinónicos (Sánchez-López *et al.*, 2008).

El hongo *C. rigida* produce lacasa como única enzima ligninolítica, por lo que se considera un modelo interesante para el estudio del papel de dicha enzima en procesos de degradación. Se ha determinado que la actividad lacasa de este hongo se debe a la presencia de dos isoenzimas de similar pl, masa molecular, contenido en carbohidratos unidos por enlaces N-glicosídicos, secuencia N-terminal, espectro de absorción y pH óptimo; diferenciándose sólo en sus constantes cinéticas (Saparrat *et al.*, 2002).

En estudios de biorremediación de alpeorajo, se ha demostrado que la incubación de este residuo con el hongo *C. rigida* durante 20 semanas produjo la degradación de la hemicelulosa y lignina y la decoloración de dicho residuo (Sampedro *et al.*, 2004; 2007a). Además, se ha observado que este hongo es capaz de reducir la fitotoxicidad del alpeorajo debido a la polimerización de los fenoles presentes en el mismo (Sampedro *et al.*, 2004).



Material y métodos



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Alpeorujo seco y extractado

Se ha utilizado alpeorujo seco y extractado (DOR) procedente de la empresa oleícola Sierra Sur S.A. (Granada). En dicha empresa se utilizan las nuevas tecnologías en el proceso de obtención del aceite de oliva, sustituyendo las prensas hidráulicas por la técnica de centrifugado de masas, concretamente con el sistema de extracción de dos fases.

El alpeorujo seco y extractado se autoclavó 3 veces en ciclos de 20 min a 120 °C y se conservó a 4 °C hasta su posterior utilización. Para los ensayos realizados en el presente estudio se llevó a cabo una extracción acuosa del alpeorujo mediante Soxhlet (Pobel, Barcelona, Spain). Para ello, muestras de 100 g de alpeorujo seco y extractado recogidas en cartuchos de papel de celulosa se extrajeron con 400 ml de agua en dos ciclos de 8 h cada uno, obteniéndose un extracto acuoso (ADOR). El extracto acuoso obtenido, filtrado al vacío a través de una membrana de 0,45 µm de tamaño de poro, se guardó a -20 °C hasta su posterior utilización.

2. Hongos saprobios

2.1. Tipos y características de los hongos utilizados

En este trabajo se han utilizado dos tipos de hongos, cuyas características se exponen a continuación:

Especie/cepa	Procedencia	Referencia
<i>C. rigida</i>	Aislado de madera de haya Cedido por el CIB (CSIC, Madrid)	Berk. y Mont. Murill, 1908. CECT 20449
<i>P. commune</i>	Aislado de suelo de bosque Xalapa (México)	Thom, C. 1910 CIE(Xalapa) 1000

2.2. Medios y condiciones de cultivo

Medios sólidos

Los hongos utilizados se conservaron en placas de Petri con medio MEA esterilizado previamente en autoclave a 121 °C durante 20 min. En dicho medio se incubaron a 28 °C en oscuridad durante una semana y posteriormente se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Medio MEA	
Composición	Concentración (g/l)
Extracto de Malta	2
Peptona	2
Glucosa	20
Agar	15
pH 4.7	

Medios líquidos

Los hongos saprobios se cultivaron inicialmente en medios ricos con objeto de incentivar su crecimiento y actividad enzimática. Se utilizaron dos medios dependiendo del ensayo a realizar: medio con glucosa (50 g/l) y extracto de levadura (5 g/l) o medio de cultivo MB con glucosa (10 g/l) y cobre

(300 μM). Los hongos saprobios se incubaron en matraces de 250 ml con 70 ml del medio específico para cada ensayo. Cada matraz se inoculó con 2 cuadrados (0,5x0,5 mm) de medio MEA con el hongo objeto de estudio. Estos matraces se mantuvieron en agitación a 150 rpm durante 7 días a 28 °C. Transcurrido este tiempo, la masa micelial se homogeneizó con Ultra Turrax (Ika-Werk Alemania) y la suspensión obtenida se usó como inóculo. La incubación de los extractos de alpeorujos con los hongos objeto de estudio se realizó con 5 ml de este homogeneizado.

Medio MB	
Composición	Concentración (g/l)
$(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$	2
H_2KPO_4	1
MgSO_4	0,5
Extracto de levadura	1
NaNO_3	2
KCl	0,59
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
Peptona	5
Elementos trazas	1 ml/l
pH 5.1	

Solución mineral de elementos traza	
Composición	Concentración (mg/l)
$\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	100
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	70
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10
$(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10

Para el crecimiento de los hongos en presencia de alpeorujó, se utilizaron también dos tipos de medios dependiendo del ensayo a realizar. Para los ensayos de purificación de la actividad lacasa se prepararon matraces de 250 ml con 70 ml de distintas concentraciones de extracto acuoso de alpeorujó con los nutrientes del medio MB suplementado con glucosa (5 ó 10 g/l) para inducir el crecimiento del hongo. Tras la esterilización, cada matraz se inoculó con 5 ml del inóculo crecido en medio MB con glucosa descrito anteriormente y se mantuvo a 28 °C en agitación a 150 rpm durante diferentes tiempos de incubación.

Para el resto de ensayos de producción de actividad lacasa se utilizó medio MB con distintas concentraciones de extracto acuoso de alpeorujó pero sin glucosa. Los medios, crecidos con el inóculo, se incubaron a 28 °C en agitación (150 rpm) o condiciones estacionarias según el ensayo.

En ambos casos, tras los diferentes tiempos de incubación dependiendo del ensayo, se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C, consiguiendo separar el micelio del medio de cultivo. El micelio se lavó con agua DEPC para inactivar las ARNasas y se conservó inmediatamente a -80 °C para la posterior extracción de ARN. El medio de cultivo se almacenó para la realización de las distintas determinaciones.

Asimismo, para la extracción de ADN genómico se prepararon matraces de 250 ml de volumen con 70 ml de medio MB con glucosa. Tras la esterilización, cada matraz se inoculó con 5 ml del inóculo crecido en medio MB con glucosa descrito anteriormente y se mantuvo a 28 °C en agitación a 150 rpm durante 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación, el micelio se separó del medio de cultivo líquido por centrifugación a 10000 rpm durante 20 min y se conservó a -80 °C para la posterior extracción de ADN.

3. Bacterias

La bacteria utilizada para las pruebas de microtoxicidad de los extractos de alpeorujó corresponde a la bacteria fijadora de N₂ *Azospirillum brasiliense* CECT 590 T (cedida por el CIB, CSIC, Madrid), microorganismo ampliamente distribuido en el suelo y en la rizosfera de numerosas plantas hortícolas.

4. Determinaciones enzimáticas y analíticas

4.1. Actividad lacasa

Para la determinación de la actividad lacasa se utilizó el método propuesto por Saparrat *et al.* (2000) basado en la oxidación de los sustratos 2,6-dimetoxifenol (DMP) ó 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) por parte de la lacasa, lo que produce un cambio de color.

Esta actividad se valoró midiendo la oxidación de dicho sustrato como el incremento lineal de la absorbancia en un espectrofotómetro a 469 nm ($\epsilon_{469} = 27500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La actividad se expresó en unidades internacionales por ml definiendo la unidad enzimática como la cantidad de enzima producida por μmol de sustrato consumido por min.

La mezcla de reacción por orden de aplicación contenía:

Composición	Concentración	μl
Tampón acetato sódico pH 5	200 mM	500
Agua destilada		380
Muestra		20
Dimetoxifenol DMP	50 mM	100

4.2. pH

El pH del extracto acuoso de alpeorajo obtenido se determinó en un pHmetro modelo Crison.

4.3. Color

La determinación del color se realizó según el método descrito por D'Annibale *et al.* (2004). La medición de color del extracto acuoso de alpeorajo de las muestras diluidas en tampón Tris-HCl 0,2 M pH 7.6 (1:10) se realizó

mediante la determinación de la absorbancia a 465 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en unidades colorimétricas (UC):

$$UC = \frac{Abs_{465} \cdot 500}{0,132}$$

donde 0,132 es la absorbancia a 465 nm de una solución estándar Pt/Co que contiene 500 unidades colorimétricas.

4.4. Determinación de proteínas

La cantidad de proteína del extracto acuoso de alpeorujo se determinó por el método de Bradford (1976) que permite valorar por espectrofotometría el contenido de proteínas mediante la medida del complejo que éstas forman con un colorante. Se empleó un reactivo comercial de Bio-Rad y albúmina de suero bovina (BSA) a una concentración de 0,5 mg/ml como proteína de referencia para preparar la curva patrón.

Para la determinación de proteínas, la reacción colorimétrica se llevó a cabo añadiendo 200 µl de reactivo de Bio-Rad a 20 µl de muestra diluida con agua destilada hasta un volumen de 800 µl. Tras incubación de 15 min a temperatura ambiente, se realizó la medida espectrofotométrica de cada una de las muestras problema a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700. Los resultados se expresaron en µg de proteína por ml de muestra.

4.5. Contenido de polifenoles totales

El contenido de fenoles del extracto acuoso de alpeorujo se realizó mediante determinación colorimétrica por el método descrito por Ribereau-Gayon (1968). Este método está basado en la reducción en medio alcalino de una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico (reactivo Folin-Ciocalteu) por los compuestos fenólicos y la consiguiente formación de una mezcla de óxidos azules de wolframio y molibdeno que absorben la luz en una

franja de 620 a 750 nm. La medida de la absorción a 725 nm es proporcional a la concentración del compuesto.

A 1 ml de las distintas soluciones de la curva patrón realizadas con ácido tánico, así como de los extractos de ADOR, se agregaron 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 2,5 ml de una solución de Na_2CO_3 al 20% (p/v). Esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 35 min, tras lo cual se midió su absorbancia en espectrofotómetro a 725 nm. Los resultados se expresaron en μg de ácido tánico por ml de extracto acuoso de alpeorajo.

4.6. Azúcares reductores

La cantidad de azúcares reductores se determinó mediante el método de Somogyi y Nelson (Somogyi, 1952) basado en la oxidación de azúcares reductores por compuestos orgánicos cúpricos en solución alcalina. Para la determinación se utilizaron tres reactivos:

- Somogyi I. En un volumen de 800 ml se disolvieron 144 g de Na_2SO_4 , 12 g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, 24 g de Na_2CO_3 y 16 g de NaHCO_3 .
- Somogyi II. Se preparó con 36 g de NaSO_2 y 4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en un volumen final de 200 ml.
- Nelson. Este reactivo contiene 50 g de $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ en 900 ml de agua y 42 ml de H_2SO_4 concentrado. Esta disolución se mezcló con otra de 6 g de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua. La mezcla se mantuvo a 37 °C durante 48 h y se conservó posteriormente a temperatura ambiente.

La reacción colorimétrica para la valoración de azúcares reductores se obtuvo mezclando 0,2 ml de los reactivos Somogyi I y II en proporción 1:4 y 0,2 ml de la muestra. Esta mezcla se mantuvo a 100 °C durante 15 min transcurridos los cuales se paró la reacción enfriando la mezcla durante unos minutos. Posteriormente, se añade 0,2 ml del reactivo Nelson, se agita y se completa con 2,4 ml de agua destilada. A continuación se mide la aparición de grupos reductores espectrofotométricamente a 540 nm. Los valores obtenidos se refirieron a una curva patrón previamente realizada con glucosa como estándar a una concentración de 0,5 mM.

5. Purificación de la lacasa de *C. rigida*

5.1. Métodos de concentración de proteínas

El medio de cultivo de *C. rigida* crecido en presencia de distintas concentraciones de extracto acuoso de alpeorajo y con los nutrientes del medio MB tal y como se indica anteriormente se dializó frente a tampón acetato sódico 10 mM pH 5 en membranas de diálisis de 6-8 kDa de tamaño de poro (Spectrum) y posteriormente se concentró. Se utilizaron dos métodos distintos de concentración de proteínas en función del volumen de muestra. Así, volúmenes pequeños de medio de cultivo de *C. rigida* se sometieron a ultracentrifugación mediante cartuchos Pall Filtron (Microsep y Nanosep) donde se obtuvo un concentrado con proteínas de peso superior a 10 kDa. En el caso de volúmenes mayores de medio de cultivo de *C. rigida* se concentraron en membranas de diálisis de 6-8 kDa de tamaño de poro (Spectrum) con sacarosa. La concentración se realizó hasta conseguir muestras con volúmenes de 1 ó 2 ml o una actividad de 15 U/ml aproximadamente.

5.2. Isoelectroenfoque (IEF)

Para la separación de los perfiles de isoenzimas de actividad lacasa por punto isoelectrónico el medio de cultivo de *C. rigida* dializado y concentrado se sometió a análisis por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida al 5% con un grosor de 1 mm y gradiente de pH de 3-10 (Bio-Rad Ampholine). La composición de los geles fue la siguiente:

Componente	Volumen (ml)
Acrilamida 29%/Bis-acrilamida 0,8%	1,87
Anfolitos	0,57
Agua milli Q	4,95
Persulfato amónico 10%	0,0375
N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED)	0,00375

El volumen de muestra aplicado se añadió en base a la actividad enzimática (5 mU). Las soluciones del ánodo y el cátodo utilizadas fueron: H_3PO_4 1 M e NaOH 1 M, respectivamente. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en una cubeta Protean IEF Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 1000 V durante 1 h 30 min aproximadamente. Tras finalizar el proceso se determinó el gradiente de pH mediante un electrodo de contacto a lo largo del gel.

Una vez terminado el isoelectroenfoque el gel se incubó durante 10 min en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5.0. La visualización de las bandas de proteínas con actividad lacasa se realizó sumergiendo el gel en una solución de 5 mM de DMP disuelta en el mismo tampón, y se mantuvo en agitación hasta la aparición de bandas de actividad como consecuencia del precipitado del producto de la reacción (cerulignona).

5.3. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes, SDS-PAGE

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 llevó a cabo en geles de poliacrilamida de 8x7 cm y 1 mm de espesor (2 cm de gel de concentración al 4% de acrilamida y 5 cm de gel de separación al 15% de acrilamida) según el método descrito por Laemmli (1970).

La composición de los geles fue la siguiente:

Componentes	Gel concentrador	Gel separador
Tampón concentrador	1,3 ml	----
Tampón separador	----	2,5 ml
Acrilamida 40%	0,5 ml	3,6 ml
Bis-acrilamida 2%	0,3 ml	2 ml
Agua destilada	2,9 ml	1,9 ml
APS 10%	60 μ l	160 μ l
TEMED	20 μ l	15 μ 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 por isotacoforesis en el gel concentrador y la posterior separación según la masa de cada proteína, 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. En ambos casos se añadió SDS a una concentración del 0,4%.

El tampón de electroforesis utilizado fue:

Tampón de electroforesis	
Composición	Concentración
Tris HCl pH 8.3	25 mM
Glicina	190 mM
SDS	0,1%

Las muestras, previamente dializadas mediante ultrafiltración, se sometieron a 100 °C durante 5 min con tampón de muestra en relación 4:1. Los pocillos del gel se cargaron con 30 μ l de las muestras (10 μ g de proteína

aproximadamente). La realización de la electroforesis se llevó a cabo en cubeta Mini-Protean II a corriente constante (20 mA) durante 1 h a 4 °C.

Tampón de muestra	
Composición	Concentración
Tris-HCl pH 8.5	1,45 g/l
Glicerol	20 ml/l
SDS	0,4 g/l
Azul de bromofenol	0,1 g/l
β -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:

Patrones de bajo peso molecular Bio-Rad	
Composición	Peso molecular
Fosforilasa B de músculo de ratón	97,4 kDa
Albúmina de suero bovino	66,2 kDa
Ovoalbúmina	45 kDa
Anhidrasa carbónica bovina	31 kDa
Inhibidor de tripsina de soja	21,5 kDa
Lisozima de huevo	14,4 kDa

Patrones de alto peso molecular, Bio-Rad	
Composición	Peso molecular
Miosina de músculo esquelético de ratón	200 kDa
β -galactosidasa de <i>Escherichia coli</i>	116,25 kDa
Fosforilasa B de músculo de ratón	97,4 kDa
Albúmina de suero bovino	66,2 kDa
Ovoalbúmina	45 kDa

Las bandas de proteína se visualizaron mediante la técnica de tinción de plata 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 proteína en la muestra es pequeña.

Para la tinción por plata se sumergió el gel en una solución de etanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 30 min y posteriormente en una solución de etanol al 5% (v/v) y ácido acético al 1% (v/v) durante 15 min. Tras eliminar esta solución se lavó 3 veces con agua destilada durante 1 min. A continuación se incubó en una solución de tiosulfato sódico al 0,2% (p/v) durante 1 min y se lavó 3 veces con agua destilada durante 30 s. Posteriormente, se incubó el gel en una solución de nitrato de plata 0,1% (p/v) durante 15 min y, a continuación, en una solución de carbonato potásico al 10% (p/v) durante 5 min. Para el revelado, se sumergió dicho gel en una solución de carbonato potásico al 2% (p/v) y formaldehído al 0,01% (v/v) hasta la aparición de las bandas. Para fijar dichas bandas se usó una solución de etanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

La valoración del contenido en carbohidratos de las proteínas estudiadas se realizó mediante tratamiento con endo N-acetilglucosaminidasa (endo-H) (Roche Applied Science). Dicho tratamiento se realizó añadiendo 25 mU de endo-H en 20 μ l de muestra (10 μ g de proteína, aproximadamente)

previamente desnaturalizada a 100 °C durante 5 min, e incubando esta mezcla durante 24 h a 37 °C. Las diferencias en peso molecular entre las proteínas tratadas con endo-H y los controles no tratados se determinaron al someterlas a electroforesis en condiciones desnaturalizantes, realizada tal y como se ha descrito anteriormente.

5.4. Separación cromatográfica de la lacasa de *C. rigida*

5.4.1. Cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución

Esta técnica está basada en la capacidad de retención de aniones por parte de una resina cargada positivamente. Para ello se utilizó una columna Trap-Q (Amersham Biosciences) acoplada a un equipo EconoSystem (Bio-Rad). Tras equilibrar la columna con tampón acetato sódico 10 mM, pH 5, se aplicó 10 ml de muestra y la columna se lavó con el mismo tampón hasta que se estabilizó la absorbancia a 280 nm, con el fin de eliminar todos los componentes no retenidos en la columna. La fracción retenida en la columna se eluyó utilizando un gradiente de 1 M de NaCl en tampón acetato entre 0 y 100% durante 160 min y manteniendo el 100% de concentración de dicho tampón durante 10 min más para completar la elución de las proteínas y pigmentos retenidos. El flujo de elución utilizado fue de 1,5 ml/min y se recogieron fracciones de 4,5 ml en tubos que contenían 0,45 ml de tampón fosfato 500 mM pH 7. A las fracciones obtenidas se les determinó la actividad lacasa con DMP como sustrato. Las fracciones con mayor actividad lacasa se mezclaron y concentraron por ultrafiltración (Microsep, 3 kDa de tamaño de poro, Pall Filtron) hasta un volumen de 1 ml.

5.4.2. Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó una columna Superdex 200 16/60 de alta resolución (Amersham Pharmacia Biotech) acoplada a un equipo AKTApurifier (Amersham Biosciences). Mediante esta técnica cromatográfica las moléculas de la muestra se separan en solución según su peso molecular o tamaño debido a la red tridimensional porosa que posee la columna. Se utilizó tampón

fosfato sódico 50 mM pH 7,1 con 150 mM de NaCl como fase móvil para eliminar posibles interacciones entre la proteína y la matriz de la columna. Se aplicó una muestra de 1 ml y se eluyó a un flujo de 0,4 ml/min. Una vez eluida la muestra se determinó la actividad lacasa con DMP como sustrato a las fracciones de mayor absorbancia a 280 nm. El pico recogido de mayor actividad lacasa se conservó a 4 °C con un 10% (p/v) de glicerol para su posterior utilización. El análisis de los cromatogramas se llevó a cabo utilizando el software UNICORN (Amersham Biosciences).

En la separación cromatográfica se añadieron como patrones de calibración una mezcla de marcadores de bajo peso molecular (Gel Filtration LMW Calibration kit, Amersham Pharmacia Biosciences), cuya composición es:

Patrones de bajo peso molecular (Amersham Pharmacia Biosciences)	
Composición	Peso molecular
Azul dextrano 2000	2000 kDa
Ribonucleasa A	13,7 kDa
Quimotripsinógeno A	25 kDa
Ovoalbúmina	43 kDa
Albúmina de suero bovino	67 kDa

En los ensayos de tratamiento del alpeorujó con actividad lacasa semipurificada se analizó la variación en las fracciones de diferente peso mediante cromatografía de exclusión molecular. Para ello se utilizó una columna Sephadex G-100 (Pharmacia, 1x48 cm) equilibrada previamente con 50 mM NaOH y 25 mM LiCl a un flujo de 0,4 ml/min. Se recogieron fracciones de 200 µl a las que se le determinó su absorbancia a 280 nm. Como patrones de referencia de alto y bajo peso molecular se utilizaron azul dextrano y ácido síngico, respectivamente.

5.4.3. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución

En este caso se utilizó una columna Mono-Q HR 5/5 (Amersham Biosciences) acoplada al equipo AKTApurifier (Amersham Biosciences). Tras equilibrar la columna con tampón acetato sódico 10 mM pH 5, se aplicó la muestra de 2 ml previamente concentrada por ultrafiltración (Microsep, 3 kDa de tamaño de poro, Pall Filtron) y dializada con tampón acetato sódico 10 mM pH 5 a través de una columna Pd10 (Amersham Biosciences). Posteriormente se lavó la columna con el mismo tampón hasta que se estabilizó la absorbancia a 280 nm. La fracción retenida se eluyó con un gradiente de tampón acetato sódico 10 mM con NaCl 1 M, pH 5 de 0 a 25% en 42 min, y de 25 a 100% en 5 min. El flujo de elución utilizado fue de 0,8 ml/min y se recogieron fracciones de 2 ml. Tras la cromatografía, a los picos de mayor absorbancia a 280 nm se les analizó la actividad lacasa con DMP como sustrato. Los picos recogidos de mayor actividad lacasa se conservaron a 4 °C con un 10% (p/v) de glicerol para su posterior utilización. El análisis de los cromatogramas se llevó a cabo utilizando el software UNICORN (Amersham Biosciences).

6. Caracterización de la lacasa de *C. rigida*

6.1. Estabilidad frente a pH y temperatura

Se determinó la actividad de la lacasa sin purificar tras su incubación durante tres días a 4° C y a temperatura ambiente en tampón citrato-fosfato-borato 100 mM, en un rango de pH de 3 a 7 utilizando DMP 50 mM y tampón acetato sódico 200 mM, pH 5.

6.2. Cálculo del parámetro cinético K_m

El valor del parámetro cinético K_m de cada una de las isoenzimas de lacasa estudiadas, se determinó a temperatura ambiente utilizando tampón

acetato sódico 200 mM pH 5 y ABTS y DMP como sustratos, en un rango de concentraciones de 0,297 μ M a 1,250 mM y de 0,609 μ M a 2,5 mM, respectivamente para cada uno de los sustratos.

La cantidad de enzima utilizada fue diferente para cada isoenzima purificada, usándose las concentraciones 63,27 mU/ml para Lac I y 149,1 mU/ml para Lac II. Para el cálculo de K_m se realizó la representación gráfica de Lineweaver-Burk.

7. Análisis e identificación molecular del gen de la lacasa de *C. rigida* en presencia de alpeorujó

7.1. Obtención y cuantificación del ADN genómico

El micelio de *C. rigida* congelado a -80 °C se homogeneizó en mortero de porcelana mediante nitrógeno líquido. La extracción del ADN genómico de *C. rigida* se llevó a cabo a partir de este homogeneizado, empleando el kit Genomix DNA extraction (Talent, Italy), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Posteriormente, mediante espectrofotometría se calculó la concentración de ADN obtenido. Este cálculo consiste en la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda de las muestras obtenidas, previamente diluidas 1:100 en agua milliQ estéril. La concentración de ácido nucleico se calculó considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 ng/ μ l de ADN de cadena doble. La pureza de la muestra se estimó mediante la relación de la absorbancia obtenida a 260 y 280 nm, teniendo en cuenta que cuanto más cercana al valor 1,8 es dicha relación, más alta es la pureza de la muestra de ADN obtenida.

7.2. Obtención, cuantificación y preparación del ARN

El micelio del hongo *C. rigida* ya congelado a -80 °C se homogeneizó con nitrógeno líquido en mortero de porcelana para la extracción de ARN. Sobre este homogeneizado se añadió 1 volumen de *Ultraspec RNA* (Biotecx

Laboratories, Inc.) y se continuó macerando hasta conseguir una solución densa, que se traspasó a tubos estériles de 2 ml (previamente enfriados en hielo), a razón de 1 ml por tubo. El homogeneizado se incubó durante 5 min en hielo y, posteriormente, se añadió 0,4 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 s. Tras la agitación se incubó 5 min más y se centrifugó 15 min a 13000 rpm y 4 °C. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos a los que se añadió un volumen equivalente de isopropanol. Después de 10 min de incubación en hielo, se centrifugó durante 10 min en las mismas condiciones. El sobrenadante se eliminó, quedando un precipitado de ARN que se sometió a tres lavados consecutivos con 1 volumen de etanol al 75% (v/v) durante 5 min a 13000 rpm. Una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado se secó al vacío, se resuspendió en agua milliQ y se cuantificó la cantidad y pureza del ARN de la muestra por espectrofotometría.

Para la cuantificación de ARN, se diluyó la muestra 1:100 en agua DEPC (agua libre de ARNasas) y se midió la absorbancia de la misma a 260 y 280 nm. La concentración de ARN se calculó teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 ng/µl de ARN. Además, 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 °C hasta su posterior utilización.

Para la preparación de agua DEPC, se añade 1 ml de dietilpirocarbonato por cada litro de agua destilada, se agita la mezcla durante toda una noche a 37 °C y se autoclava a 121 °C durante 20 min.

Para evitar la contaminación por ADN cromosómico, la muestra de ARN se trató con DNasa mediante el kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen, UK). Para ello se añadió la siguiente mezcla de reacción a tubos de microcentrífuga de 0,5 ml de volumen:

Composición	Cantidad
Muestra de ARN	1 µg
Tampón de reacción de ADNasa 10 x	1 µl
ADNasa I, <i>Amp Grade</i>	1 µl
Agua tratada con DEPC	7 µl

Esta mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se inactivó la ADNasa al añadir 1 µl de solución EDTA 25 mM e incubar los tubos a 65 °C durante 10 min.

7.3. Transcripción inversa

Las reacciones de transcripción inversa se realizaron utilizando el kit GeneAmp Gold RNA PCR Reagent Kit. (Applied Biosystems, Estados Unidos). La mezcla de reacción contenía:

Composición	Cantidad
ARN total tratado con ADNsa I	500 ng
Tampón de reacción 5X	10 µl
MgCl ₂ 25 mM	2 µl
dNTPs 10 mM	2 µl
Inhibidor de ARNsa (20 U/ µl)	0,5 µl (10 U)
Ditiotreitrol (DTT) 100 mM	2 µl
Hexámeros al azar (100 ng/µl, Boehringer, Alemania) 50 µM	0,5 µl
Transcriptasa inversa MultiScribe 50 U/ µl	0,3 µl (15 U)
Agua DEPC	Hasta volumen final de reacción de 20 µl

El programa de transcripción inversa consistió en una fase de 10 min a 25 °C (hibridación), posteriormente otra etapa de 12 min a 42 °C (transcripción inversa) seguido de una parada a 4 °C, que se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). El ADN complementario (ADNc) se mantuvo a -20 °C.

7.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la realización de la amplificación del ADN por PCR se usó un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) y se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Composición	Cantidad/Concentración final
Tampón de amplificación de PCR 10x (Applied Biosystems)	10 µl
MgCl ₂ (Applied Biosystems)	1 mM
Cebador 5'	1 µM
Cebador 3'	1 µM
Desoxinucleósidos trifosfato (Promega)	50 µM
ADNc usado como molde	0,2 µg
Taq ADN polimerasa (Applied Biosystems)	1,2 U
Volumen final (completado con agua milliQ estéril)	50 µl

Los parámetros usados para la amplificación fueron: una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 3 min, seguidos de 35 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales se desarrollaron a 94 °C durante 1 min, luego 52 °C durante 40 s, seguido de 72 °C durante 1 min y, una etapa final de extensión de 72 °C durante 1 min.

7.5. Electroforesis en gel de agarosa

La separación y detección de los productos de PCR se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% preparados en tampón TAE y con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

Tampón TAE	
Composición	Concentración
Tris-Base	40 mM
Ácido acético	20 mM
EDTA	1 mM
pH 8.0	

Como solución de carga se utilizó glicerol 50% (v/v) y azul de bromofenol 1 g/l en una relación 4 µl de solución de ADN:2 µl solución carga. La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con geles sumergidos en tampón TAE a un voltaje de 100 V. Para determinar el tamaño molecular de las bandas se utilizó como marcadores el patrón Molecular Weight Marker VI, Roche. Al finalizar la electroforesis, se observaron las bandas de ADN por fluorescencia ultravioleta con ayuda de un transiluminador (TVL-312A, Vilver Laurmat).

7.6. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La banda seleccionada para su identificación se cortó del gel y se purificó gracias al kit de extracción Gene-clean, Q-BIOgene siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la unión del ADN a una matriz de sílice en presencia de altas concentraciones de sal y su posterior elución a bajas concentraciones de la misma.

7.7. Clonación y secuenciación del gen de la lacasa de *C. rigida*

7.7.1. Ligación en vectores de clonación

La ligación entre un fragmento de ADN y el vector de clonación adecuado se realizó usando una relación molar inserto:vector de 3:1. En la unión de fragmentos de ADN a plásmidos se utilizó la enzima ligasa del fago T4 (Promega) para la inserción del fragmento amplificado en el vector *pGEM-T Easy* (Promega). Siguiendo las instrucciones recomendadas se realizó la siguiente mezcla de reacción:

Tampón de ligación 2x	5 μ l
Vector pGEM-T Easy (50 ng/ μ l)	1 μ l
Producto de PCR	X μ l
Ligasa T4 de ADN (3 unidades Weiss/ μ l)	1 μ l
Agua milliQ hasta un volumen final de	10 μ l

La mezcla de reacción se incubó a 4 °C durante 24 h.

7.7.2. Obtención de células competentes

Para la obtención de células competente se utilizó el método del RbCl. Para ello se inoculó medio Luria-Bertani (LB) con *E. coli* aislado de una colonia y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente se inocularon 5 ml del medio LB crecido con *E. coli* en 670 ml de medio Φ broth y se incubó a 37 °C hasta que la DO_{600} fue de 0,5.

Medio LB	
Composición	Concentración
Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l
pH 7.5	

Medio Φ broth	
Composición	Concentración
Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
KCl	0,745 g
MgSO ₄ 1M	20 ml por cada 670 ml (añadir tras esterilización)
Agua destilada	1000 ml
pH 7.6	

El medio se ajustó a pH 7.6 con KOH 10N y posteriormente se esterilizó en autoclave. Antes de su uso se añadió 20 ml de MgSO₄ 1M por cada 670 ml de medio.

El cultivo se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min a 4 °C, y el precipitado se resuspendió en 30 ml (por cada 100 ml de cultivo) de TFB1 frío. Las células se resuspendieron cuidadosamente y se incubaron en hielo durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron en las mismas condiciones descritas anteriormente y, una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 4 ml (por cada 100 ml de cultivo) de TFB2. Una vez resuspendidas, las células se conservaron en alícuotas de 200 μ l a -80 °C hasta su uso.

TFB1	
Componentes	Concentración final
RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
CH ₃ COOK	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glicerol	15% (v/v)
Esterilizar por filtración	

TFB2	
Componentes	Concentración final
RbCl	10 mM
MOPS	
(Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico), pH 7.0	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glicerol	15% (v/v)
Esterilizar por filtración	

7.7.3. Transformación de células competentes de *Escherichia coli*

La transformación de células competentes tiene por objeto introducir plásmidos con el inserto deseado en cepas de *E. coli*. La transformación se llevó a cabo por el método de choque térmico descrito por Sambrook y Russell, (2001). A las células competentes frías se les añadió 10 µl de la suspensión del plásmido con el inserto ya ligado y la mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min. Posteriormente se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 1 min para la apertura de poros en las células. A su término se enfrió de nuevo hasta 4 °C durante 2 min. A estos cultivos celulares ya transformados se les añadió 800 µl de medio LB líquido y se incubaron a 37 °C durante 1 h.

Tras la incubación, se sembraron alícuotas de las células transformadas en placas Petri con medio LB con agar previamente preparadas con ampicilina, isopropilo-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,1 M y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido (X-gal) para la selección y visualización de las colonias bacterianas transformadas con plásmidos recombinantes. IPTG se usa para inducir la expresión del gen *LacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa en *E. coli*. La solución de IPTG se prepara a una concentración de 20 mg/ml, se esteriliza por filtración y se guarda a -20 °C. Se añaden 100 μ l a la placa unos 30 min antes de sembrar. X-gal es un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa de modo que al ser hidrolizado forma precipitados azules. El X-gal se prepara en dimetilformamida a una concentración de 20 mg/ml. Se debe proteger de la luz debido a su fotosensibilidad y no es necesario filtrar. Se añaden a la placa 40 μ l unos 30 min antes de sembrar. En la selección se usan tanto el IPTG como el X-gal para diferenciar colonias recombinantes (blancas) de las no recombinantes (azules).

Las colonias seleccionadas se sembraron de nuevo en medio líquido LB y se incubaron durante 24 h a 37 °C en agitación para el crecimiento de estas bacterias transformadas.

7.7.4. Purificación 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 sílice a altas concentraciones de sal y su elución a bajas concentraciones.

7.7.5. Secuenciación

Los productos de amplificación o de clonación, previamente purificados y cuantificados, se secuenciaron utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) y el secuenciador automático ABI Prism 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems) en el Servicio de Secuenciación

del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC (Madrid), usándose el par de cebadores correspondiente en cada caso.

La secuencia obtenida se comparó mediante una búsqueda BLAST (Altschul *et al.*, 1997) en la base de datos GenBank.

8. Análisis de expresión génica de la lacasa de *C. rigida*

8.1. PCR cuantitativa a tiempo real (PCR-Q)

Las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) utilizando la mezcla maestra SYBR® Green PCR Master Mix. (Applied Biosystems, Estados Unidos). Esta mezcla incorpora, como su nombre indica, el colorante SYBR® Green I, que detecta DNA de doble hélice, por lo que no es necesario el uso de sondas específicas. Este compuesto se une al DNA 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 (Applied Biosystems, Estados Unidos). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 µl con los siguientes elementos: 12,5 µl de la mezcla maestra, 4,5 µl de agua Mili-Q, 1,5 µl de cada cebador 5 µM (siendo su concentración final 300 nM) y 5 µl de ADNc. Las condiciones térmicas de la amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante otros 30 s, finalizando con una etapa de 1 min a 95 °C y una etapa final de 60 °C durante 1 min.

Los cebadores específicos utilizados para el estudio de la expresión del gen de lacasa de *C. rigida* fueron los denominados LCC1-F (directo) y LCC1-R (inverso), cuyas secuencias se muestran a continuación.

Para normalizar los resultados, en las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real se usó como control el gen constitutivo que codifica el ARNr 18S. Para la amplificación de este gen, se utilizaron los cebadores 18S-F (directo) y 18S-R (inverso).

Tanto los cebadores de la lacasa de *C. rigida* como los del gen endógeno del ARN 18S fueron diseñados con el software Primer Express® de Applied Biosystems (Foster City, CA).

LCC1-F	5' GCACGTTGATGATGAATCC 3'
LCC1-R	5' CGGTAGCGCTTGCCCTTC 3'
18S-F	5' GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC 3'
18S-R	5' CCGCCCGGCCAGGTCTG 3'

Para la amplificación del gen constitutivo del ARN 18S, las condiciones para la PCR-Q fueron: una etapa inicial de 95 °C durante 10 min, seguida por 40 ciclos en los que se desarrolló una fase de 95 °C durante 15 s, otra de 60 °C durante 30 s y una última fase de 72 °C durante 30 s; finalizándose el proceso con una etapa de 1 min a 95 °C y una etapa final de 60 °C durante 1 min.

En primer lugar, se construyó una curva estándar utilizando diluciones decimales de una muestra de concentración conocida para el gen problema, así como para el gen control endógeno amplificado en la misma placa (Ginzinger, 2002). Las curvas se obtenían representando los valores de Ct (ciclo “threshold” o ciclo umbral) frente al logaritmo de la cantidad de ADNc molde de cada dilución. El Ct 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 comienza a detectarse el amplicón. Los resultados se normalizaron con los niveles de Ct obtenidos para el gen constitutivo ADNr 18S. La pendiente en la curva estándar para la amplificación del gen *lcc1* fue -3,261. La eficacia de los pares de cebadores fue del 94,6% y del 102,6% para los cebadores del gen ARNr 18S y del gen *lcc1*, respectivamente.

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:

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

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

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

El calibrador fue la muestra que se usó para comparar.

Para asegurar que las amplificaciones eran obtenidas a partir del ADNc y no de restos de ADN genómico no eliminado por el tratamiento con ADNasa I, se realizaron reacciones de PCR control en las que como molde se utilizaron las mezclas de reacción realizadas para la transcripción inversa a las que no se añadió la enzima retrotranscriptasa.

9. Tratamiento de extracto acuoso de alpeorujó con lacasa

La incubación del extracto acuoso del alpeorujó con la lacasa semipurificada de *C. rigida*, se realizó en un volumen final de 400 μl . El ADOR diluido al 10% y modificado su pH hasta un valor de 7 partiendo de un concentrado de tampón fosfato sódico 500 mM pH 7, se incubó con 1 U/ml de lacasa semipurificada durante 24 h a temperatura ambiente. Se realizaron también controles bajo las mismas condiciones pero en ausencia de lacasa. De las muestras obtenidas se analizó la actividad lacasa y el contenido en fenoles al inicio y al final de la incubación.

El tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó con extracto de lacasa de *C. rigida* en medio MB con glucosa y cobre, se llevó a cabo con diferentes diluciones y a distintas temperaturas. Así, diferentes diluciones de extracto acuoso de alpeorujó (50, 25 y 10%) se añadieron a un medio con 1 U/ml de actividad lacasa hasta completar un volumen final de 6 ml. La incubación se llevó a cabo en baño termostático a 28, 37 y 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 días. En este periodo se recogieron muestras a los 0, 2 y 5 días para las distintas determinaciones. Se utilizaron controles sin actividad lacasa y con lacasa inactivada por choque térmico.

También se realizó un ensayo donde se incubó el ADOR con las lacasas: lacasa comercial de *T. versicolor*, semipurificada de *C. rigida* y producida en el cocultivo de *C. rigida* y *P. commune*. La lacasa comercial de *T. versicolor* (Fluka) se preparó en una solución en agua milliQ, preparada extemporáneamente, y se esterilizó por filtración con filtros Millipore de 0,2 μm de tamaño de poro. La lacasa semipurificada de *C. rigida* se obtuvo mediante cromatografía de exclusión molecular siguiendo la metodología descrita anteriormente en el proceso de purificación de dicha enzima. Además, también se utilizó muestras del cocultivo en medio MB con glucosa de *C. rigida* y *P. commune* crecido durante 21 días en condiciones estáticas, con un desfase de inoculación de *P. commune* de 6 días respecto a *C. rigida* y niveles altos de actividad lacasa.

El extracto acuoso de alpeorujos diluido al 25% se incubó en baños termostáticos a 37 °C durante 2 días con 1 U/ml de lacasa comercial de *T. versicolor* o semipurificada de *C. rigida*. En el caso de lacasa producida en cocultivos de *C. rigida* con *P. commune* y sus respectivos monocultivos controles, se usó también 1 ml pero sin ajustar las unidades con objeto de poder comparar la eficacia de la productividad de la lacasa de *C. rigida* por unidad de volumen en condiciones de mono y cocultivo.

10. Determinación de la toxicidad del alpeorujos

10.1. Análisis de fitotoxicidad

El test de fitotoxicidad se realizó siguiendo la metodología descrita por Zucconi *et al.*, (1981) modificada, mediante la medición del índice de germinabilidad en semillas de *Lepidium sativum* L., comúnmente denominado “berro de agua”. A placas Petri de 9 cm de diámetro con un disco de papel de filtro se le añadieron 2 ml del extracto acuoso de alpeorujos a distintas concentraciones y tras los correspondientes tratamientos, de manera que el papel quede bien empapado. Finalmente, se distribuyeron al azar 20 semillas de berro por placa previamente hidratadas en agua durante 1 h. Los controles se realizaron con agua destilada y con extracto acuoso de alpeorujos sin tratar con lacasa. Las semillas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 48 h,

transcurrido este tiempo se detuvo la germinación añadiendo 1 ml de etanol a la placa. Posteriormente se contaron las semillas germinadas por placa y se determinó la longitud de la radícula de las mismas. Para cada tratamiento se establecieron 4 repeticiones.

El porcentaje del índice de germinación (IG) se determinó de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de semillas germinadas (extracto)}}{\text{N}^{\circ} \text{ de semillas germinadas (control)}} \times 100$$

$$\text{IG} = \frac{\text{Porcentaje de germinación} \times \text{Longitud radicular (extracto)}}{\text{Porcentaje de germinación} \times \text{Longitud radicular (control)}} \times 100$$

10.2. Análisis de microtoxicidad

La obtención del cultivo bacteriano para las pruebas de microtoxicidad se realizó incubando *A. brasiliense* en medio líquido LB (esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 min) durante 24 h en agitación a una temperatura de 37 °C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. Posteriormente, el cultivo bacteriano se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en una solución salina estéril hasta alcanzar un valor de D.O. de 0'5 a 540 nm (Weber *et al.*, 2001).

El análisis de microtoxicidad se realizó añadiendo alícuotas de 100 µl de la suspensión bacteriana de *A. brasiliense* en 900 µl de extracto acuoso de alpeorajo a distintas concentraciones y tras los correspondientes tratamientos. Tras la incubación de esta mezcla a 37 °C y 500 rpm durante 24 h se centrifugó durante 20 min a 4000 rpm y las células se resuspendieron en 1 ml de solución salina estéril. La supervivencia relativa del cultivo de *A. brasiliense* se evaluó mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de

diluciones seriadas de dicha mezcla. En placas de Petri con LB y Rojo Congo a una concentración de 15 ml/l se sembraron 100 μ l de las diluciones del cultivo bacteriano y se observó la supervivencia de *A. brasiliense* mediante la visualización de las colonias tras su incubación a 37 °C durante 5 días (Rodríguez-Cáceres, 1982).

11. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos tras los distintos tratamientos, se sometieron a un análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas. Después de no observar diferencias significativas, se procedió a efectuar un análisis de varianza (ANOVA). Las barras de error en las gráficas representan la desviación estándar y las letras representan valores estadísticamente distintos mediante el test de Duncan para comparaciones múltiples ($p \leq 0,05$).




Resultados





Capítulo 1

Purificación y
caracterización de la
lacasa producida por el
hongo *Coriolopsis*
rigida en presencia de
extracto acuoso de
alpeorujo



CAPÍTULO 1

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA LACASA PRODUCIDA POR EL HONGO *Coriolopsis rigida* EN PRESENCIA DE EXTRACTO ACUOSO DE ALPEORUJO

Objetivo general

El hongo de la podredumbre blanca *C. rigida* produce lacasa de forma constitutiva como única actividad ligninolítica (Saparrat *et al.*, 2002; Jaouani *et al.*, 2005). La presencia de determinados elementos en el medio o las condiciones de cultivo no sólo pueden incrementar esta actividad enzimática sino que pueden incluso inducir la expresión de nuevas isoenzimas de lacasa en determinados hongos (Saparrat *et al.*, 2002; Dantán-González *et al.*, 2008). Por ello se plantea la posibilidad de que *C. rigida*, en presencia de los numerosos compuestos fenólicos que contiene el alpeorujo, incremente la actividad lacasa o exprese nuevas isoenzimas de ésta.

Con el fin de estudiar la influencia del alpeorujo en la inducción de la actividad lacasa de *C. rigida* se purificó dicha enzima a partir de medios de cultivo en ausencia o presencia de extracto acuoso de alpeorujo (ADOR), fracción que contiene la mayor parte de los fenoles implicados en su toxicidad (Aranda *et al.*, 2007). Asimismo, con objeto de conocer el papel exacto de la lacasa de *C. rigida* producida en presencia de extracto acuoso de alpeorujo en la degradación del residuo, se trató extracto acuoso de alpeorujo con la enzima purificada.

1. Cinética de producción de actividad lacasa en presencia del extracto acuoso de alpeorujó

Material y métodos

Se estudió la producción de la enzima lacasa por *C. rigida* en matraces de 250 ml de capacidad con 70 ml de medio MB, el mismo medio basal en el que se identificaron las dos isoenzimas de lacasa de *C. rigida* en trabajos previos (Saparrat *et al.*, 2002) y al que se añadieron distintas concentraciones de ADOR (25, 50 y 100%), en presencia o no de glucosa (5 y 10 g/l) tal y como se describe en el apartado general de Material y métodos (2.2.).

La actividad lacasa se valoró utilizando 2,6-dimetoxifenol (DMP) según la metodología descrita anteriormente en el capítulo general de Material y métodos (4.1.).

Resultados

C. rigida produjo actividad lacasa en medio MB con 25, 50 y 100% de extracto acuoso de alpeorujó, aunque se observó una mayor producción de dicha actividad en los medios con 50 y 100% de ADOR. Los niveles máximos de actividad lacasa se obtuvieron a partir de los 21 días de incubación del hongo en medio basal con 50 ó 100% de ADOR (Figura 1). Si bien la máxima actividad lacasa se consiguió obtener cuando *C. rigida* se cultivó con un 100% de ADOR, para los ensayos posteriores se seleccionó el medio MB con 50% de extracto acuoso de alpeorujó como el óptimo para la producción de este enzima ya que en dicho medio se produjo una actividad lacasa muy similar y además posee menor cantidad de pigmento, lo cual facilitaría su posterior procesamiento y estudio.

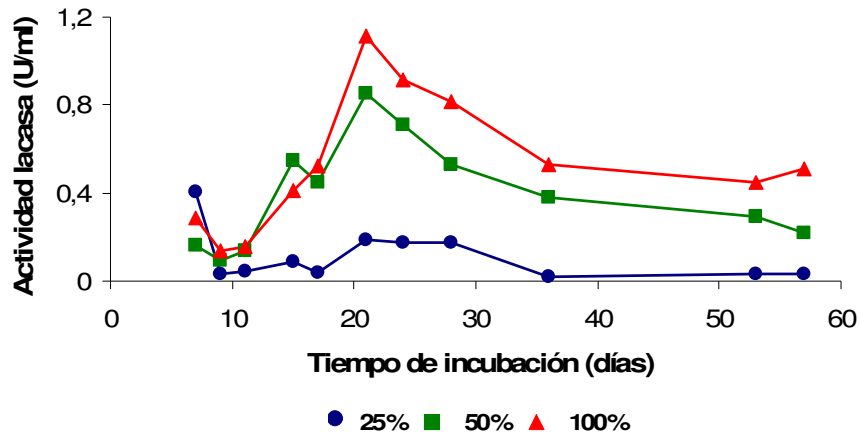


Figura 1. Actividad lacasa (U/ml) de *C. rigida* crecido en medio MB con diferentes porcentajes de ADOR.

Con objeto de conseguir mayor producción de lacasa, se estudió la aplicación de glucosa a concentraciones de 5 y 10 g/l al medio de cultivo MB con 50% de ADOR en el que se cultivó *C. rigida*.

Se observó que aunque existen niveles basales de lacasa durante la primera fase de crecimiento, la producción de este enzima por *C. rigida* se incrementó realmente a partir de los 14 días de incubación (Figura 2). *C. rigida* produjo significativamente mayor cantidad de actividad lacasa cuando se cultivó en presencia de medio basal con 50% de extracto acuoso de alpeorujó y 10 g/l de glucosa. El máximo nivel de actividad lacasa obtenido en estas condiciones correspondió a los 60 días de incubación (1,466 U/ml).

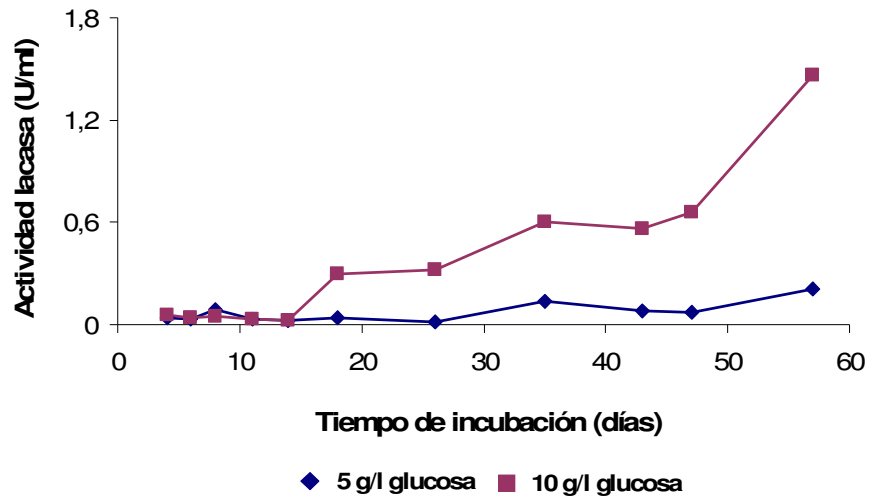


Figura 2. Actividad lacasa (U/ml) de *C. rigida* crecido en medio MB con un 50% de ADOR y diferentes concentraciones de glucosa.

Se seleccionó el medio de cultivo MB con 50% de ADOR y 10 g/l de glucosa para el proceso de purificación del enzima ya que es en el que *C. rigida* produjo mayor cantidad de actividad enzimática.

2. Determinación de las propiedades físico-químicas del enzima

Material y métodos

Con objeto de conocer las propiedades del enzima, se determinó la estabilidad frente a diferentes pHs y temperaturas. Para ello *C. rigida* se cultivó en medio MB con 50% de ADOR y 10 g/l de glucosa durante 60 días, tras ese tiempo el micelio se separó del medio de cultivo por filtración al vacío a través de papel Whatman nº 4. El sobrenadante se dializó frente a tampón acetato sódico 10 mM pH 5 en membranas de celulosa de 12-14 kDa de tamaño de poro y concentró por ultrafiltración en cartuchos Filtron de 3 kDa de tamaño de poro.

Muestras obtenidas a partir del sobrenadante del cultivo de *C. rigida* dializado y concentrado se incubaron durante tres días en tampón citrato-fosfato-borato 100 mM en un rango de pH de 3 a 7. Una vez seleccionado el pH del tampón al que la actividad lacasa es mayor se comprobó el efecto de varias temperaturas (4 °C y temperatura ambiente).

Resultados

2.1. Estabilidad frente a pH

Los resultados muestran que la actividad lacasa de *C. rigida* en presencia de ADOR a pH 3 disminuyó drásticamente tras 24 horas de incubación mientras que para el resto de los valores de pH ensayados esta actividad fue homogénea a lo largo del tiempo. Los mejores valores de actividad lacasa en los tres días de incubación se obtuvieron a pH 7 (Figura 3).

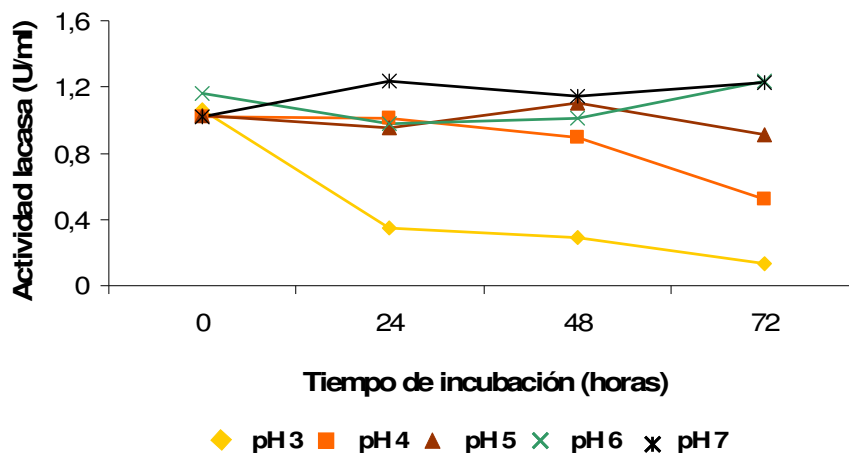


Figura 3. Estabilidad de la actividad lacasa de *C. rigida* crecido en presencia de ADOR a diferentes pHs.

2.2. Estabilidad frente a temperatura

No se observaron diferencias significativas de actividad lacasa en las diferentes temperaturas estudiadas tras 72 horas de incubación (Figura 4).

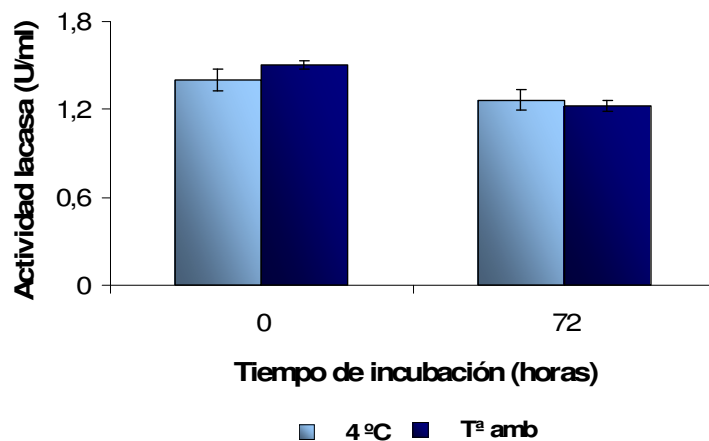


Figura 4. Estabilidad de la actividad lacasa de *C. rigida* crecido en presencia de ADOR a diferentes temperaturas.

3. Purificación de la enzima

3.1. Isoelectroenfoque

Material y métodos

La caracterización de la lacasa de *C. rigida* crecido en presencia de extracto acuoso de alpeorujó se realizó mediante un isoelectroenfoque con objeto de conocer el punto isoeléctrico (pI). Para ello se utilizaron muestras de *C. rigida* en medio MB con 50% ADOR y 10 g/l de glucosa y, como controles, cultivos del mismo hongo en medio basal con un 50% de extracto acuoso de alpeorujó sin glucosa y medio MB con 10 g/l de glucosa y 150 μ M de CuSO_4 , en ausencia de ADOR.

Resultados

El zimograma de la actividad lacasa obtenido por isoelectroenfoque de muestras de *C. rigida* crecido en presencia de extracto acuoso de alpeorujó y glucosa permitió observar dos bandas de pI muy similar, con valores de 3.3 y 3.4 (Figura 6). Se observó además que las bandas de actividad de *C. rigida* cultivado en medio MB con ADOR sin glucosa y medio basal en ausencia de extracto acuoso de alpeorujó y con glucosa y cobre eran similares a las observadas en el cultivo de *C. rigida* en medio MB con 50% de ADOR y 10 g/l de glucosa.

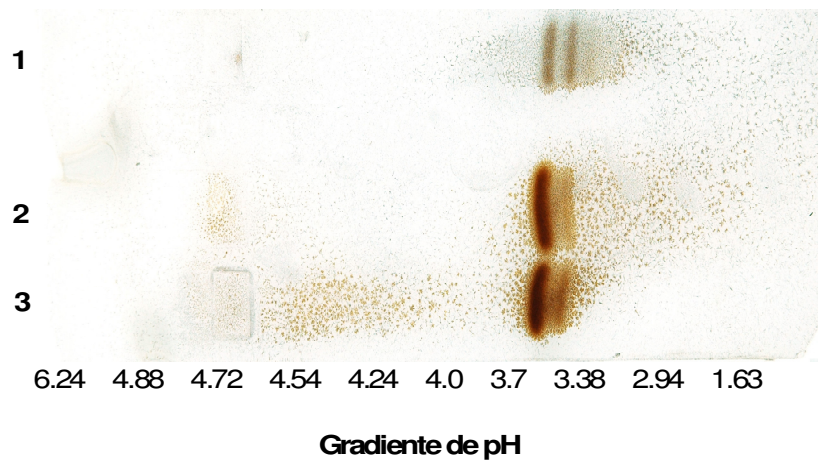


Figura 6. Isoelectroenfoque de *C. rigida* crecido en medio MB con 50% de ADOR (Línea 1), medio MB con 50% de ADOR y 10 g/l de glucosa (Línea 2) y medio MB con 10 g/l de glucosa y 150 μM de CuSO_4 (Línea 3).

3.2. Cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución

Material y métodos

Para la purificación de la actividad lacasa se realizó una cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución basándonos en los resultados obtenidos en el isoelectroenfoco y en los ensayos de estabilidad de la enzima a distintos pHs. Como muestra se utilizó 10 ml del sobrenadante dializado y concentrado del cultivo *C. rigida* crecido en medio MB con 50% de ADOR y 10 g/l de glucosa durante 60 días al que se le añadió 20 ml de tampón acetato sódico 10 mM pH 5 para diluir los pigmentos y demás impurezas del residuo. La fracción retenida en la columna se eluyó utilizando un gradiente lineal de tampón acetato sódico 10 mM, NaCl 1 M, pH 5 entre 0 y 100% durante 160 min. Para la conservación de las fracciones recogidas, se les añadió 0,45 ml de tampón fosfato 500 mM pH 7, valor de pH al que la enzima se mostró más estable a lo largo del tiempo según el ensayo de estabilidad frente a distintos pHs descrito anteriormente.

Una vez recogidas las fracciones se determinó la actividad lacasa de las mismas.

Resultados

La cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución de cultivos de *C. rigida* en presencia de ADOR permitió la detección de un pico mayoritario de actividad lacasa a los 32 min de iniciarse el gradiente de NaCl, que correspondió con un 16% de concentración de NaCl, aproximadamente (Figura 7). Este pico de actividad lacasa, aunque se había separado de bastantes impurezas de la muestra, aún presentaba gran cantidad de cromóforos del ADOR que absorben a 280 nm, por lo que se planteó una siguiente etapa de purificación.

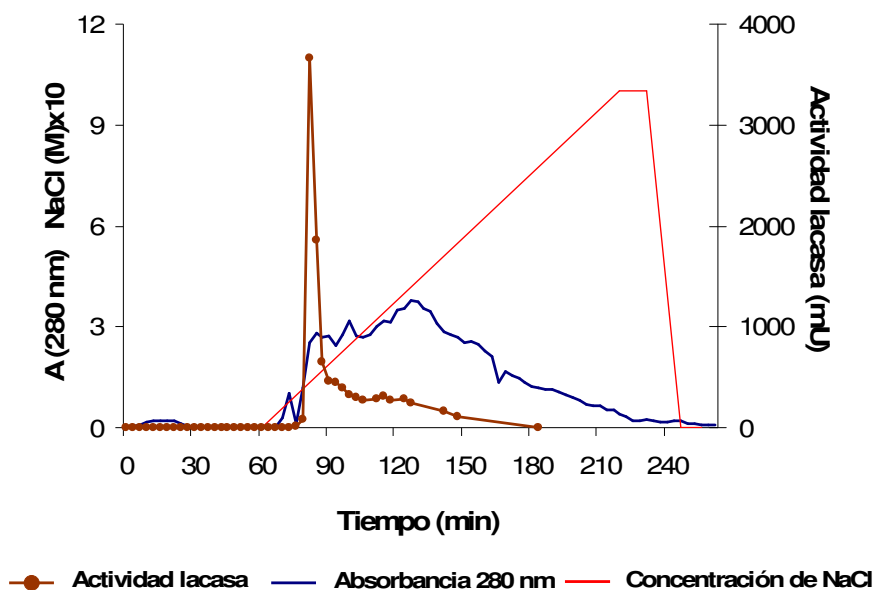


Figura 7. Perfil cromatográfico de intercambio aniónico de baja resolución de la lacasa de *C. rigida* crecido en presencia de ADOR.

3.3. Cromatografía de exclusión molecular

Material y métodos

Las fracciones con mayor actividad lacasa recogidas en la cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución se concentraron por ultrafiltración hasta alcanzar un volumen de 1 ml, que se sometió a una cromatografía de exclusión molecular.

Resultados

En el perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular se observó un pico de gran absorbancia a 280 nm a los 290 min de elución pero sin actividad lacasa (Figura 8). El pico mayoritario de actividad lacasa se observó a los 200 min de elución y mostró muy poca absorbancia a 280 nm lo que indican que estas fracciones con mayor actividad lacasa poseen muy poca

cantidad de proteínas (Figura 8). Comparando con los patrones utilizados, se estimó que el peso molecular de la lacasa detectada en *C. rigida* cultivada en presencia de ADOR se encuentra cercano a los 60 kDa.

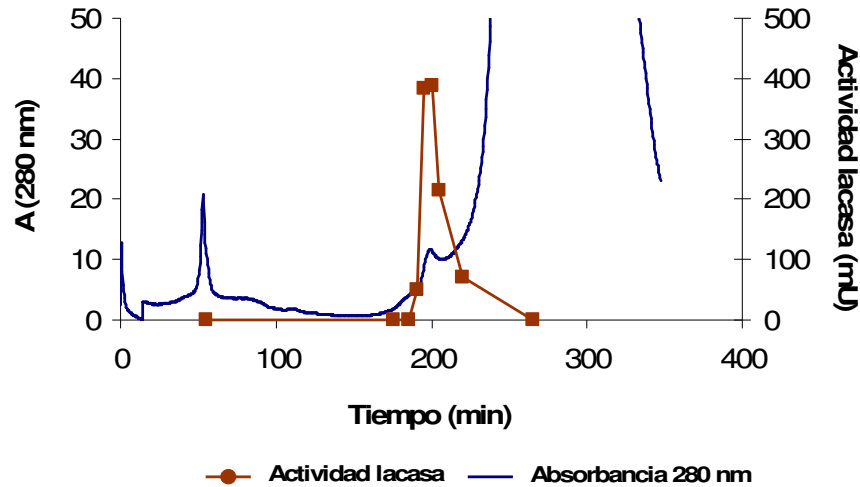


Figura 8. Perfil cromatográfico de exclusión molecular de la lacasa de *C. rigida* crecido en presencia de ADOR.

3.4. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución

Material y métodos

El último paso de purificación de la lacasa de *C. rigida* fue una cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución. Se utilizó una columna Mono-Q HR 5/5 (Amersham Biosciences) a la que se aplicó una muestra de 2 ml procedente del pico mayoritario de actividad lacasa recogido de la cromatografía de exclusión molecular, una vez concentrada y dializada con tampón acetato sódico 10 mM pH 5.

La cromatografía consistió en un gradiente de tampón acetato sódico 10 mM, NaCl 1 M, pH 5 de 0 a 25% en 42 min, y de 25 a 100% en 5 min, a un flujo de 0,8 ml/min. Los picos recogidos de mayor actividad lacasa se conservaron a 4 °C con un 10% (p/v) de glicerol para los posteriores análisis.

Resultados

La separación cromatográfica de intercambio aniónico de alta resolución determinó la presencia de dos picos de actividad lacasa: Lac I y Lac II que eluyen a diferentes tiempos y concentraciones de NaCl (Figura 9). Concretamente, Lac I eluye a los 26 min, con una concentración de NaCl del 12%, y Lac II a los 28 min con 15% de NaCl aproximadamente.

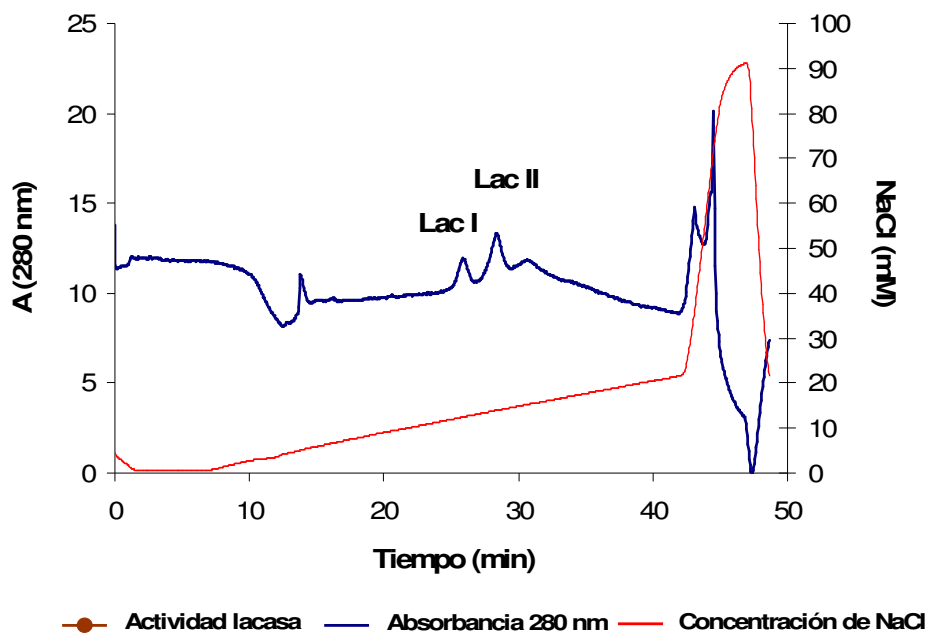


Figura 9. Perfil cromatográfico de intercambio aniónico de alta resolución de la lacasa de *C. rigida* crecido en presencia de ADOR

La evaluación global del proceso determinó que las isoenzimas Lac I y Lac II se obtuvieron con un factor de purificación del 32,7 y 31,2, respectivamente, y que el rendimiento total de la purificación de la actividad lacasa fue del 2,2% para la isoenzima Lac I y 2,6% para la Lac II (Tabla 1)

Tabla 1. Rendimiento del proceso de purificación de las isoenzimas de lacasa de *C. rigida* crecido en presencia de ADOR.

Paso de purificación	Proteína (mg/l)	Actividad (U/l)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Cultivo líquido	3,600	1983,0	550,8	100,0	1,0
HiTrap-Q	0,174	405,0	2327,6	20,4	4,2
Superdex 200	0,007	225,0	34090,9	11,3	61,9
Mono-Q (Lac I)	0,002	43,2	18000,0	2,2	32,7
Mono-Q (Lac II)	0,003	51,6	17200,0	2,6	31,2
Mono-Q (Total)	0,005	94,8	35200,0	4,8	63,9

Asimismo, como control y siguiendo este mismo protocolo, se purificaron, a partir de medio MB con 10 g/l de glucosa, 150 μ M de CuSO_4 y en ausencia de ADOR, las dos isoenzimas de lacasa descritas ya por Saparrat *et al.* (2002).

3.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida, SDS-PAGE

Material y métodos

El peso molecular, la pureza y el contenido en carbohidratos de las isoenzimas de lacasa purificada a partir de medio con 50% de ADOR y 10 g/l de glucosa tras 60 días de incubación, se determinó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida al 7,5% y 0,1% de SDS. Para el cálculo del contenido en carbohidratos de las isoenzimas, se procedió al tratamiento de las muestras con endo-N-acetilglucosaminidasa tal y como se detalla en el apartado general Material y métodos (5.3.1.). Las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción de plata.

Resultados

Mediante los patrones de peso molecular utilizados se comprobó que las dos isoenzimas de lacasa de *C. rigida* purificadas en presencia de extracto acuoso de alpeorajo poseían un peso molecular similar de 66 kDa (Figura 10).

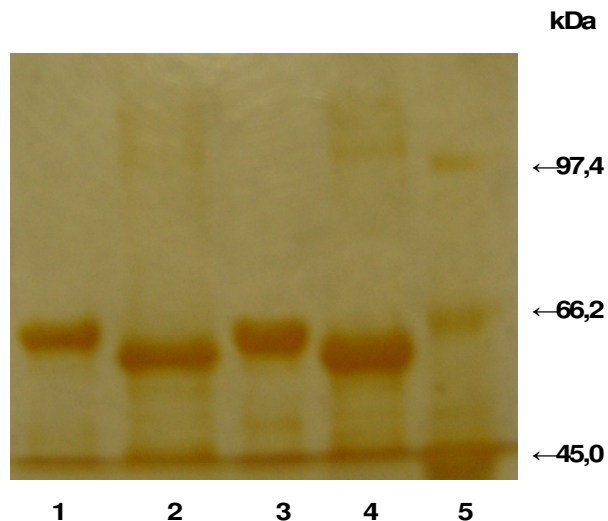


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE de las isoenzimas de lacasa purificada de cultivos de *C. rigida* en presencia de ADOR. Lac I (Línea 1), Lac I tras tratamiento con enzima endo-H (Línea 2), Lac II (Línea 3), Lac II tras tratamiento con enzima endo-H (Línea 4) y patrón de alto peso molecular (Línea 5).

El contenido en carbohidratos de las isoenzimas de lacasa purificadas en presencia de ADOR se calculó mediante la diferencia de masa molecular (estimada en dicho gel SDS-PAGE) entre las isoenzimas de lacasa antes y después del tratamiento de las mismas con endo-N-acetilglucosaminidasa. En nuestro gel de electroforesis se observó que las isoenzimas de lacasa en estudio tenían un contenido en carbohidratos que representa el 9% de la masa de la proteína (Figura 10).

4. Cálculo del parámetro cinético K_m

Objetivo

Mediante este ensayo se pretende completar el estudio de las características físico-químicas de las isoenzimas de lacasa de *C. rigida* purificadas en presencia de extracto acuoso de alpeorujo y determinar las posibles diferencias entre éstas y también respecto a las isoenzimas de lacasa de *C. rigida* purificadas a partir de cultivos sin ADOR y en presencia de cobre por Saparrat *et al.* (2002).

Material y métodos

La determinación de la K_m de cada una de las isoenzimas se realizó a temperatura ambiente usando ABTS y DMP como sustratos y con diferentes concentraciones de enzima para cada isoenzima purificada (63,27 mU/ml para Lac I y 149,1 mU/ml para Lac II). El cálculo de K_m se realizó mediante la representación gráfica de Lineweaver-Burk.

Resultados

En el cálculo de la cinética enzimática realizado según la representación gráfica de Lineweaver-Burk, se obtuvieron valores de K_m muy similares entre las dos isoenzimas purificadas usando ABTS o DMP como sustrato (Tabla 2). Los valores de la constante cinética utilizando ambos sustratos tanto en presencia como en ausencia de ADOR fueron similares.

Tabla 2. Constante cinética K_m de las isoenzimas de lacasa de *C. rigida* crecido en presencia o ausencia de ADOR

K_m (μM)	Isoenzimas de lacasa de <i>C. rigida</i> cultivado en presencia de ADOR		Isoenzimas de lacasa de <i>C. rigida</i> cultivado en ausencia de ADOR	
	Lac I	Lac II	Lac I	Lac II
ABTS	14	14	12	11
DMP	21,2	18,5	15,3	17,5

5. Tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó con lacasa semipurificada de *C. rigida*

Material y métodos

Para el tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó con la lacasa de *C. rigida* purificada en presencia de ADOR se preparó dicho extracto con agua en una dilución al 10% y se ajustó el pH a 7 mediante el tampón fosfato sódico 500 mM pH 7. La incubación del ADOR con 1 U/ml de lacasa semipurificada se realizó durante 24 h a temperatura ambiente. Tras la incubación se procedió al análisis del contenido en fenoles totales de la mezcla de reacción y a la determinación de la variación en peso molecular de las fracciones presentes en el extracto acuoso mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Sephadex G-100 (Pharmacia, 1x48 cm) siguiendo la metodología descrita en los apartados 4.6. y 5.4.2. de Material y métodos, respectivamente.

Resultados

La incubación del ADOR con la lacasa purificada de *C. rigida* crecido en el residuo durante 24 horas produjo una disminución significativa en el contenido en fenoles totales llegando a alcanzar el 41,7% de reducción (Figura 11).

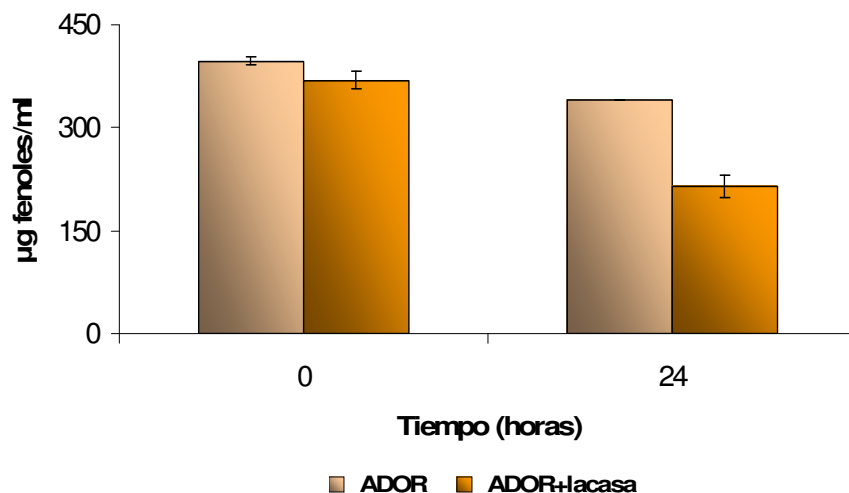


Figura 11. Contenido fenólico del ADOR incubado con lacasa purificada de *C. rigida* cultivada en ADOR.

Los perfiles obtenidos tras la cromatografía de exclusión molecular de las muestras de ADOR incubadas o no con la lacasa de *C. rigida* crecido en el residuo durante 24 horas muestran diferencias notables entre ambas muestras. En este tipo de cromatografía, los componentes de mayor peso molecular eluyen antes que los componentes fenólicos de menor peso. Por tanto, se observa un aumento de la fracción correspondiente a los fenoles de mayor peso tras la incubación con la lacasa purificada respecto al control sin tratar. La fracción donde se encuentran la mayor parte de los compuestos fenólicos de bajo peso, disminuye sensiblemente respecto al control tras el tratamiento con la lacasa purificada (Figura 12).

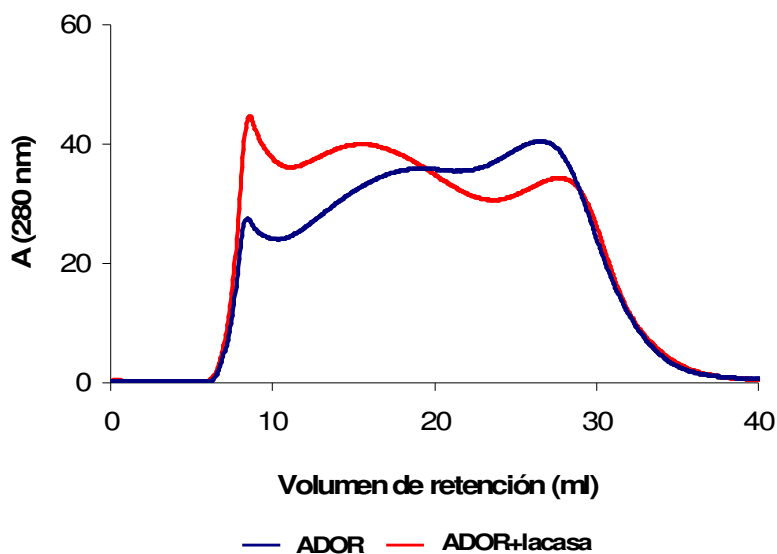


Figura 12. Perfil cromatográfico de exclusión molecular de ADOR tratado o no con lacasa purificada de *C. rigida* crecido en ADOR

DISCUSIÓN

Los hongos de la podredumbre blanca han desarrollado un sistema oxidativo no específico, en el que destacan las lacasas y peroxidasas, capaces de degradar polímeros orgánicos complejos y compuestos xenobióticos (Martínez *et al.*, 2005). Se sabe que la composición de los medios de cultivo puede influir considerablemente en la producción de actividad lacasa de algunos hongos de la podredumbre blanca. De hecho, dependiendo de la fuente de carbono principal utilizada en el medio, puede producirse aumento o inhibición en la actividad lacasa. Por ejemplo, en medios con glucosa como fuente de carbono, se observa inhibición de la producción de lacasa por el hongo *T. pubescens* en comparación con medios basados en fructosa (Galhaup *et al.*, 2002).

Además existen una serie de compuestos inductores de muy distinta naturaleza que pueden incrementar en gran medida la producción de la actividad lacasa. Así, la presencia de etanol y nitrógeno en el medio de cultivo puede incrementar los niveles de lacasa de *P. cinnabarinus* ss3 y *T. versicolor*

respectivamente (Collins y Dobson, 1997; Meza *et al.*, 2007). El hongo *Botryosphaeria rhodina* también produce mayores niveles de actividad lacasa en presencia de aceite de soja, Tween 80 o Cu^{2+} (Dekker *et al.*, 2007). Otros inductores importantes de la actividad lacasa son los compuestos aromáticos, de hecho, se han realizado numerosos estudios sobre el papel de dichos compuestos sobre la lacasa. Concretamente, la presencia de xilidina en cultivos de *T. versicolor* o *P. tigrinus* aumenta significativamente la producción de actividad lacasa de estos hongos (Minussi *et al.*, 2007; Quaratino *et al.*, 2008a). Algunos autores han descrito el aumento de los niveles de la lacasa por compuestos como la *o*-toluidina y 1-hidroxibenzotriazol (Collins y Dobson, 1997; Tong *et al.*, 2007)

La presencia de gran cantidad de compuestos aromáticos como los fenoles en los residuos de la industria olivarera nos hizo plantear el posible efecto inductor de la lacasa por el alpeorujo. De la Rubia *et al.* (2008) observó un gran aumento en los niveles de actividad lacasa de los hongos *T. versicolor*, *P. cinnabarinus*, *Poria subvermispora* y *P. pulmonarius* en medios de cultivo sin Mn^{2+} y en presencia de alpechín.

En nuestro estudio hemos detectado niveles considerables de actividad lacasa en cultivos de *C. rigida* crecidos en presencia de extracto acuoso de alpeorujo, aunque fueron menores que los producidos por este hongo crecido en medio MB con glucosa y Cu^{2+} y en ausencia de ADOR (Saparrat *et al.*, 2002). La menor actividad lacasa de *C. rigida* en presencia de ADOR puede deberse a la ausencia de inductores específicos de esta actividad enzimática. Concretamente, se ha demostrado que la presencia de cobre en el medio de cultivo, aumenta considerablemente la producción de lacasa en hongos de la podredumbre blanca como *T. versicolor* (Collins y Dobson, 1997) y *C. rigida*, más concretamente, tal y como demostraron Saparrat *et al.* (2002).

Por otro lado también hemos podido observar un aumento de la actividad lacasa relacionada con el incremento de la concentración de ADOR en los cultivos de *C. rigida* estudiados. Este hecho se ha observado anteriormente en cultivos de *Pleurotus* spp. y *P. flavido-alba* donde la producción de lacasa se incrementaba a medida que aumentaba la concentración de alpechín (Pérez *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2002; Tsioulpas *et al.*, 2002).

La aplicación de glucosa al medio MB con 50% de ADOR aumentó el tiempo de incubación necesario para que *C. rigida* obtuviera un nivel de actividad lacasa de 1 U/ml. Esto puede deberse a que, en los medios con glucosa, la actividad lacasa aumenta cuando la glucosa comienza a ser limitante (14 días de incubación) mientras que en otros medios, al no tener fuente de carbono de fácil asimilación, la actividad lacasa se detecta desde los inicios del ensayo (Rogalski *et al.*, 1991; Vinciguerra *et al.*, 1995). De hecho Dias *et al.* (2004) observaron un retraso en la producción de lacasa en medio de cultivo con glucosa interpretándose como fase de adaptación al mismo.

Diversos estudios han corroborado este retraso en la producción de actividad lacasa por la presencia de glucosa en hongos como el basidiomiceto Euc-1 y otros como *T. pubescens* y *Trametes* sp. AH28-2 (Galhaup *et al.* 2002; Dias *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2006). Este efecto inhibitor está relacionado con la presencia de elementos de regulación transcripcional dependientes de glucosa y denominados secuencias CreA que han sido identificadas en el promotor del gen *lap2* de lacasa de *T. pubescens* (Galhaup *et al.*, 2002). La función represora de estas secuencias conlleva el aprovechamiento por el organismo de la fuente de carbono del medio de más fácil asimilación, como es la glucosa, y permite la producción de lacasa cuando ésta se agota y es necesaria la búsqueda de una segunda fuente carbonada.

Las características de la lacasa de *C. rigida* crecido en presencia de ADOR son similares a las descritas para otras lacasas fúngicas. Así, el isoelectroenfoco mostró la presencia de dos bandas de actividad lacasa con un pI muy similar (3.33 y 3.43) y dentro del rango ácido descrito para lacasas de otros hongos de la podredumbre blanca como *P. eryngii* y *P. ostreatus* (pI 2.9 y 4.7) (Palmieri *et al.*, 1993; Muñoz *et al.*, 1997b), *P. cinnabarinus* (pI 3.7) (Eggert *et al.*, 1996), *Grammothele subargentea* (pI 3.5), *Cerrena unicolor* 137 (pI 3.6 y 3.7) y *P. tigrinus* (pI 3.15) (Michniewicz *et al.*, 2006; Quaratino *et al.*, 2007; Saparrat *et al.*, 2008).

Sin embargo, las condiciones de cultivo pueden producir diferentes patrones de isoenzimas o inducir la aparición de isoenzimas de lacasa aún no identificadas. Concretamente, se ha comprobado que la actividad Lac II de *P. eryngii* aumenta considerablemente ante la presencia de inductores como el

ácido vainílico y verátrico y el cobre induce la aparición de la isoenzima POXA 1b de la lacasa de *P. ostreatus* (Muñoz *et al.*, 1997a; Giardina *et al.*, 1998).

Se han realizado algunos estudios con alpechín como posible inductor de enzimas ligninolíticas y se ha observado que la inclusión del mismo en los medios de cultivo afecta considerablemente la producción y actividad de dichas enzimas. Concretamente, Dias *et al.* (2004), demostró que el alpechín inducía una isoenzima de lacasa (Lac2) del basidiomiceto Euc-1, no detectable en ausencia del residuo. En otros estudios, la lacasa del hongo *P. flavido-alba* se mostró muy estable en presencia de alpechín no siendo inhibida por la presencia de los componentes aromáticos monoméricos de este residuo añadidos al medio de cultivo. Por el contrario, la enzima MnPx del mismo hongo presentó una nueva isoenzima en presencia de alpechín no detectable en medio sin residuo (Pérez *et al.*, 1998).

En base a estas observaciones se pensó que *C. rigida* podía producir otras lacasas en presencia de los compuestos fenólicos presentes en el medio de cultivo con extracto acuoso de alpeorujo o que dicho residuo influyera en la producción de las isoenzimas ya descritas de dicho hongo. Sin embargo, nuestros estudios han indicado que la presencia de ADOR no induce la producción de nuevas isoenzimas de la lacasa de *C. rigida*.

La mayoría de las lacasas son glicoproteínas monoméricas que muestran un peso molecular entre 50 y 80 kDa (Thurston *et al.*, 1994; Yaropolov *et al.*, 1994). Las dos lacasas purificadas de *C. rigida* en cultivos en presencia de extracto acuoso de alpeorujo son proteínas monoméricas, como se deduce del idéntico peso molecular (66kDa) observado tras la cromatografía de exclusión molecular y posterior electroforesis SDS-PAGE. Una pequeña diferencia en el punto isoeléctrico es la que ha permitido la separación de dos isoenzimas mediante cromatografía de intercambio iónico al igual que se ha descrito en *C. rigida* crecido en medio MB con glucosa y en ausencia de ADOR (Saparrat *et al.*, 2002).

En contraste con la purificación de la lacasa de *C. rigida* crecido en medio MB con glucosa y en ausencia de ADOR llevado a cabo por Saparrat *et al.* (2002), el rendimiento global obtenido para cada una de las isoenzimas de la lacasa en presencia de alpeorujo fue muy bajo (2,2 y 2,6% del rendimiento final para la Lac I y Lac II, respectivamente), debido probablemente a la poca

cantidad de proteína producida por dicho hongo en presencia de extracto acuoso de alpeorujó. La actividad específica obtenida fue muy alta en comparación con la descrita por Saparrat *et al.* (2002), probablemente como consecuencia de las diferentes condiciones del cultivo. Sin embargo, tanto la Lac I como la Lac II muestran similar afinidad a los dos sustratos estudiados (ABTS y DMP) independientemente de que se hayan producido en ausencia o presencia de ADOR. La mayor afinidad de las isoenzimas se obtuvo para ABTS, al igual que observaron Saparrat *et al.* (2002). Sin embargo, estas dos isoenzimas de lacasa, tanto purificadas a partir de medios sin extracto de alpeorujó o con dicho residuo, presentan diferente afinidad a la indicada en el trabajo de Saparrat *et al.* (2002) observándose que, en nuestro caso, la afinidad por el DMP es mucho mayor que la obtenida en dicho trabajo. Valores similares de K_m a los descritos en nuestros ensayos se observaron para otros hongos de la podredumbre blanca como *P. coccineus* (27 y 36 para DMP y ABTS) y *Daedalea quercina* (48 y 38 μM para DMP y ABTS) (Baldrian, 2004; Jaouani *et al.*, 2005). En estudios con los hongos *P. sanguineus* o *P. tigrinus*, se ha observado que los medios o el uso de cepas distintas pueden producir diferencias catalíticas entre las lacasas del mismo organismo (Dantán-González *et al.*, 2008; Quaratino *et al.*, 2007).

Los resultados de la K_m , así como los datos de peso molecular, grado de glicosilación y punto isoelectrico observados en nuestros ensayos, indican que las isoenzimas de lacasa descritas en presencia de ADOR son las mismas que las encontradas en medios sin extracto acuoso de alpeorujó (Saparrat *et al.*, 2002).

La aplicación de la enzima purificada de *C. rigida* al extracto acuoso de alpeorujó produjo disminución en el contenido de fenoles. Además, los perfiles cromatográficos de exclusión molecular del ADOR tratado con lacasa de *C. rigida* purificada muestran que la fracción de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, disminuye sensiblemente respecto al control sin tratar mientras que la fracción correspondiente a los fenoles de mayor peso molecular aumenta tras la incubación del residuo con la lacasa purificada. Estos resultados indican que *C. rigida* produce en el ADOR la polimerización de los fenoles de menor peso molecular. Se piensa que la lacasa actúan sobre los fenoles produciendo radicales que polimerizan dando lugar a compuestos de


mayor peso. Este hecho coincide con estudios anteriores de la acción de la lacasa de hongos ligninolíticos sobre los fenoles de residuos de la industria oleícola. Se ha demostrado que la lacasa de *P. coccineus* produce la polimerización de los fenoles de menor peso molecular del alpechín (Jaouani *et al.*, 2005; Berrio *et al.*, 2007). También se ha descrito que la reducción de la fitotoxicidad del alpeorujo está relacionada directamente con la polimerización de los fenoles de dicho residuo (Aranda *et al.*, 2007).

La actividad de la lacasa de *C. rigida* parece ser la responsable de la polimerización de los fenoles del extracto acuoso de alpeorujo hecho que podría estar relacionado con la reducción de la fitotoxicidad del residuo. Estudios adicionales de la toxicidad del ADOR sobre semillas de berro tras el tratamiento con la lacasa determinarán la relación entre la polimerización de los fenoles producida por la lacasa y la posible reducción de la fitotoxicidad del ADOR.



Capítulo 2

Identificación del gen
de lacasa de
Corioloopsis rigida
expresado en
presencia de extracto
acuoso de alpeorujó



CAPÍTULO 2

IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LACASA DE *Coriolopsis rigida* EXPRESADO EN PRESENCIA DE EXTRACTO ACUOSO DE ALPEORUJO

Objetivo general

El estudio de purificación de la actividad lacasa de *C. rigida* producida en presencia de extracto acuoso de alpeorujo, determinó la presencia de dos isoenzimas de lacasa cuyas características físico-químicas y cinéticas demostraron que se trataban de las mismas isoenzimas producidas por dicho hongo crecido en medio basal e identificadas por Saparrat *et al.* (2002). Se pretende identificar el gen de la lacasa de *C. rigida* en presencia de alpeorujo para así corroborar dicha conclusión y completar el estudio de dicha fenoloxidasa.

Material y métodos

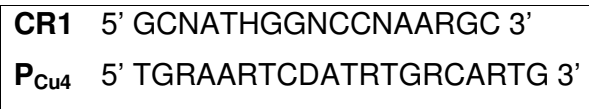
Para el estudio de la secuencia génica de la lacasa de *C. rigida* producida en presencia de alpeorujo se utilizó el mismo tipo de cultivo usado previamente para la purificación de la enzima, un cultivo líquido de *C. rigida* en medio MB con 50% de ADOR y 10 g/l de glucosa durante 60 días con máxima actividad lacasa. En dicho cultivo se separó el sobrenadante para la purificación de la proteína, tal y como se indica en el capítulo anterior, y el micelio del hongo para el estudio de identificación del gen de la lacasa. Este micelio se lavó con agua DEPC y conservó a -80 °C hasta su posterior uso. A partir del micelio de *C. rigida*, se extrajo el ARN del hongo, y tras tratamiento con ADNasa, se obtuvo el ADNc mediante una reacción de transcripción inversa. Todos estos procesos se realizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado general Material y métodos (7.2., 7.3.).

Para la obtención del gen completo de la lacasa de *C. rigida* en presencia de extracto acuoso de alpeorujo, se incubó el hongo en cultivo líquido de glucosa y extracto de levadura durante 5 días, y de ahí se extrajo el ADN genómico tal y como se describe en el apartado general de Material y Métodos (7.1.).

La estrategia que se siguió para conseguir el gen completo de la lacasa se desarrolló en dos etapas:

a) *Amplificación del fragmento del gen de la lacasa de C. rigida correspondiente al extremo amino terminal*

En una primera etapa se procedió a la obtención de un fragmento inicial del gen de la lacasa de *C. rigida* utilizando como molde el ADNc conseguido a partir del ARN. Para la obtención de este primer fragmento se diseñaron los cebadores degenerados: CR1, basado en la secuencia amino terminal descrita por Saparrat *et al.* (2002) tras la purificación de la lacasa de *C. rigida* producida en medio MB con glucosa y cobre, y P_{Cu4}, basado en la secuencia del sitio de unión al cobre IV (HCHIDFH) altamente conservado en las lacasas fúngicas y descrito previamente por Hong *et al.* (2007).



La mezcla de reacción utilizada para la amplificación fue similar a la descrita en el apartado 7.4. de Material y métodos. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 3 min seguida de 35 ciclos de 94 °C durante 1 min, 52 °C durante 40 s y 72 °C durante 1 min concluyendo con una etapa de extensión final de 72 °C durante 10 min. Se realizaron reacciones sin ADNc molde en paralelo como control. El producto de amplificación obtenido se visualizó en gel de agarosa y se extrajo para su inserción en vectores de clonación y posterior transformación de células competentes de *E. coli* DH5α con dicho vector. La secuenciación del fragmento se obtuvo a partir del plásmido aislado del clon transformado. Todos estos procesos se realizaron

según la metodología previamente descrita en los apartados 7.5., 7.6. y 7.7. del apartado general de Material y métodos.

La secuencia obtenida se comparó mediante una búsqueda BLAST (Altschul *et al.*, 1997) en la base de datos GenBank.

b) *Amplificación de las secuencias flanqueantes del gen de la lacasa de C. rigida*

Para la obtención del gen completo de la lacasa de *C. rigida* se procedió a una segunda etapa de amplificación del extremo flanqueante del gen de la lacasa correspondiente a la secuencia C-terminal de la proteína. En este caso se diseñaron nuevos cebadores basándonos en la información proporcionada por el fragmento obtenido en la fase anterior de amplificación. Concretamente se utilizó el cebador degenerado CR2, basado en el extremo 3' de las secuencias de lacasas fúngicas con las que el fragmento inicial presentó máxima homología; y el cebador CR3, basado en la secuencia exacta del fragmento amino terminal del gen de la lacasa obtenido en la etapa anterior.

CR2	5' AACGACGCCATAAGCCCAAAC 3'
CR3	5' GCCATCGGGCCCAAGG 3'

Las condiciones para la reacción de PCR fueron las mismas que las utilizadas en la etapa anterior. En este caso, se realizaron reacciones de amplificación usando como molde tanto el ADNc obtenido del ARN del cultivo de *C. rigida* crecido en presencia de alpeorujo como ADN genómico, a fin de identificar los intrones y exones y los dominios característicos del gen de la lacasa de *C. rigida* en presencia de alpeorujo.

El producto de la amplificación obtenido se visualizó en gel de agarosa y posteriormente se insertó en vectores para ser clonado en células competentes de *E. coli* DH5 α . La secuenciación del fragmento se obtuvo a partir del plásmido aislado del clon transformado según se describe en los apartados 7.7., 7.6. y 7.7. del apartado general de Material y métodos.

Por último, se procedió al estudio de la secuencia obtenida mediante búsqueda BLAST (Altschul *et al.*, 1997) para comparación con las secuencias homólogas en la base de datos GenBank (Material y métodos 7.7.5.).

Resultados

Del micelio de *C. rigida* en condiciones de máxima actividad lacasa en presencia de ADOR y tras una primera etapa de amplificación del gen usando los cebadores degenerados CR1 y P_{Cu4}, se consiguió una banda simple de ADNc de 1.2 kb.

La secuencia obtenida mostró la máxima homología (87%) con el gen *lcc1* de la lacasa de *Trametes* sp. C 30 (Número de identificación en Genbank AF491759.1). Otros genes de lacasas para los que este primer fragmento obtenido presentó gran homología fueron los genes *lac1* y *lacA* de *C. gallica* (86 y 85% de homología, respectivamente) (Número de identificación en Genebank: DQ431716.1 y AY875867.1, respectivamente).

Para la obtención de las regiones flanqueantes del gen de la lacasa, se llevaron a cabo reacciones de amplificación con los cebadores CR2 y CR3, diseñados gracias a la secuencia del fragmento anteriormente obtenido, y usando como molde ADNc y ADN genómico. En esta segunda etapa de la secuenciación del gen, se obtuvo una banda simple de 2.1 kb, si se utilizaba ADN genómico como molde, y una banda de 1.4 kb, al usar ADNc correspondiente al marco abierto de lectura del gen (Figuras 1 y 2).

El alineamiento del fragmento genómico y la correspondiente secuencia codificante del gen de lacasa mostró una correspondencia completa de las regiones coincidentes e indicó la presencia de un total de 11 exones (Figura 2). El marco de lectura abierto del gen de la lacasa de *C. rigida* producida en presencia de alpeorujo, nombrado como *lcc1*, se depositó en GenBank (Número de identificación en Genbank: GQ377839).

GCCATCGGGCCCAAGGCTGACATGACCATCACCGATGGTGCGGTCAGTCCCGATGGTTT
TGAGCGTCAGGCCATCCTGGTCAACAATGGCTTTCCAGTCCTCTCATTGTTGAAACA
AGGGCGACCGCTTCCAACCTGAACGTCGTTGACAACCTGACGAACCACACCATGTTGAAG
TCCACCAGTATCCACTGGCAGGCTTCTTCCAACACGGTACCAACTGGGCTGACGGCCC
CGCCTTCGTCAACCAGTGCCCCATTTCCACGGGCCACTCGTTCTCTACGACTTCCAGG
TCCCTGACCAGGCAGGTACTIONTCTGGTACCACAGTCACTTGTCCACCCAGTACTGTGAT
GGTCTCAGGGGCCCCATGGTGGTCTATGACCCGCAAGACCCCCACAAGGACCTCTACGA
CGTTGATGATGAATCCACCGTGATCACTCTGGCGGACTGGTACCACCTGGGCTGCCAAGG
TCGGCCCTGCCGTCCCGGCTGACGCGACGCTCATCAACGGCCTCGGTGCGAGCTTGAGC
ACGCTTAACGCCGATTTGGCTGTCTCGGTACGAAGGGCAAGCGCTACCGCTTCCG
CTTGGTGTGCTCTCATGCGACCCCAACCACACCTTCAGCATTGATGGTACACCATGA
CTGTCAATTGAGGCGGACAGCGTCAACCTGAAGCCCCAGGTTGTGACTCCATCCAGATC
TTCGCTGCTCAGCGTACTCGTTTGTGCTCAACGCAGATCAGGACATTGGCAACCACTG
GATCCGTGCCTTGCCCAATTCCGGCAATAGGGGATCTGATGCCGGTGTAACTCCGCCA
TCCTCCGCTACGACGGTGCTGACCCTGTGAGCCGACTACATCGCAAACGCCCTCGACG
CagCCTTTGATCGAGTCTGCCCTCACCACCTCGAGGGTACGCCTGCGCCCGGTGACCC
GACCCCGGGCGGTGTCGACCTGGCTATCAACATGGCCTTTGGCTTCGCTGCCGGCAAAT
TCACCATCAACGGCGGAGCTTCACCCGCCCACCGTGCCCGTGCTCCTACAGATCCTG
AGCGGTGCGCAGTCGGCGCAGGACCTCCTCCCCTCCGGTAGCGTGTACTCGCTCCCGTC
GAACGCGAACATTGAGATCTCGCTGCCCGGACCGCGGCCGCCCCGGCTTCCCCACC
CCTTCCACTTGACGGAGCACACCTTCGCCGTCTCGTCCGCAGCTCGGGCCAGCAGACGTA
CAACTACGCGAACCCCGTCTACCGCGACGTCGTGAGCAGGGCTCGCCTGGGGACAACG
TCACGATCCGCTTCCGCACTGACAACCCCGGCCCGTGGTTCCTCCACTGCCACATCGAC
TTCCACCTCGAGGCTGGGTTTGGCGTCTTCGCCGAGGACATCCCCGATGTTGCGGC
GACGAACCCGGTCCCCAGGCGTGGTCCGACCTTTGCCGACATATGATGCGCTCGCGC
CTGAGGATCAGTAG

Figura 1. Secuencia del ADNc para el gen de la lacasa de *C. rigida* (*lcc 1*) expresado en presencia de extracto acuoso de alpeorajo.

GCCATCGGGCCCAAGGCTGACATGACCATCACCGATGGTGCGGTCAGTCCCGATGGTTT
 TGAGCGTCAGGCCATCCTGGTCAACAATGGCTTTCCAGTCCTCTCATTGTTGGAAACA
 AGGCGAGTTGGCTTTGGTTGTCATTGCAGCTCCTCACTTATGCTGACCTGCCTACAGGG
 CGACCGCTTCCAACCTGAACGTCGTTGACAACCTGACGAACCACACCATGTTGAAGTCCA
 CCAGTATCGTGAGTAGCTCGGGCTACTGCATGATCTACCGCTCATATTTCTCCTTTTAG
 CACTGGCACGGCTTCTTCCAACACGGTACCAACTGGGCTGACGGCCCCGCCTTCGTCAA
 CCAGTGCCCCATTTCCACGGGCCACTCGTTCCTCTACGACTTCCAGGTCCCTGACCAGG
 CTGGTGAGTGCAATCTCCGCGTTGTGGCATGTAAGAGATTAGTGCTCACAGCTGGGACA
 TTGATTAGGTACTTTCTGGTACCACAGTCACTTGTCCACCCAGTACTGTGATGGTCTCA
 GGGGCCCATGGTGGTCTATGACCCGCAAGACCCCAAGGACCTCTACGACGTTGAT
 GATGGTGGAGCTAATCGACGATAACATGCCCGCACATTCTCAAGCATTCCCTTTGTAGAA
 TCCACCGTGATCACTCTGGCGGACTGGTACCATTGGCTGCCAAGGTCGGCCCTGCCGT
 CCCGTGAGTCAATTTGGCTGCGCCAATACTCTATTTTTGACTGACCTTCATCTTCTCAC
 AGGCAAGCTGACGCGACGCTCATCAACGGCCTCGGTGCGAGCTTGAGCACGCTTAACGC
 CGATTTGGCTGTCACTCTCGGTACGAAGGGCAAGCGGTATGTTTCGGAGCGAAGCACCG
 ATTAGACCGTGATCCTGATCGATTGTTCTCTAGCTACCGCTTCCGCTTGGTGTGCTCT
 CATGCGACCCCAACCACACCTTCAGCATTGATGGTCACACCATGACTGTCATTGAGGCG
 GACAGCGTCAACCTGAAGCCCCAGGTTGTCGACTCCATCCAGATCTTCGCTGCTCAGCG
 TTACTCGTTTTGTTGTAAGTCAACATCGAGGTTCTATCATTTGTCGGAGTCTGCTCACAGC
 CCTTCATAGCTCAACGCAGATCAGGACATTGGCAACCACTGGATCCGTGCCTTGCCCAA
 TTCCGGCAATAGGGGATCTGATGCCGGTGTAACTCCGCCATCCTCCGCTACGACGGTG
 CTGACCCTGTGAGCCGACTACATCGCAAACGCCCTCGACGC_{ag}CCTTTGATCGAGTCT
 GCCCTCACCACCTCGAGGGTACGCCTGCGGTATGTAATCCACACATGCACGCCACGAA
 CGAGTGTCTGACCTGTTCCGTTGCTAGCCCGGTGACCCGACCCCCGGCGGTGTCGACC
 TGGCTATCAACATGGCCTTTGGCTTCGTAAGTCTTCAGCTCCGCTTCGGTCCGTCGTGC
 ACGCATGGCTGACCATCATTCCCCATTCTAGACTGCCGGCAAATTCACCATCAACGGCG
 CGAGCTTACCCCGCCCACCGTGCCCGTGCTCCTACAGATCCTGAGCGGTGCGCAGTCG
 GCGCAGGACCTCCTCCCCTCCGGTAGCGTGTACTCGCTCCCGTCGAACGCGAACATTGA
 GATCTCGTGCCCCGCGACCGCGGCCGCCCGGCTTCCCCACCCCTTCCACTTGCACG
 GTGTACGTCTCCATTTCCGACCCTGACGCTCCCGCTCACGCACTCACCTTCATCCCAC
 AGCACACCTTCCCGTCGTCCGCAGCTCGGGCCAGCAGACGTACAAC_TACGCGAACCCC
 GTCTACCGCGACGTCGTCAGCACGGGCTCGCCTGGGGACAACGTCACGATCCGCTTCCG
 CACTGACAACCCCGGCCCGTGGTTCCCTCCACTGCCACATCGACTTCCACCTCGAGGCTG
 GTTTTGCGGTGCTCTTCGCCGAGGACATCCCCGATGTTGCGGCGACGAACCCGTCCCC
 CAGGCGTGGTCCGACCTTTGCCCGACATATGATGCGCTCGCGCCTGAGGATCAGTAG

Figura 2. Secuencia de ADN del gen de la lacasa de *C. rigida* (*lcc1*) expresado en extracto acuoso de alpeorujo. Se muestran en sombreado los exones.

Mediante análisis BLASTp en la base de datos del EMBL, se encontró que la secuencia aminoacídica deducida para la lacasa presentaba la máxima homología (90%) con la Lac1 de *T. trogii* (Número de identificación en Genbank: CAC 13040) y una identidad del 89% con la lacasa de *C. gallica*

(Número de identificación en Genbank: ABD93940), seguidas por lacasas de otros hongos, muchos de ellos del género *Trametes* (Tabla 1).

Tabla 1. Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida para la lacasa de *C. rigida* expresada en extracto acuoso de alpeorujo con otras proteínas lacasa de hongos basidiomicetos de la base de datos Genbank tras análisis BLASTp.

Nº	Identificación	Organismo	Proteína	Aminoácidos	% Identidad
1	CAC13040.1	<i>T. trogii</i>	Lacasa Lcc1	517	90
2	ABD93940.1	<i>C. gallica</i>	Lacasa	517	89
3	ACS26245.1	<i>C. gallica</i>	Lacasa	517	88
4	AAM10738.1	<i>Trametes</i> C30	Lacasa 1	517	90
5	CAA78144.1	Basidiomicete PM1	Lacasa	517	90
6	AAW65489.1	<i>C. gallica</i>	Lacasa	496	87
7	AAM18407.1	<i>T. pubescens</i>	Lacasa 2	520	79
8	AAB63444.1	<i>Trametes</i> sp. I-62	Fenoloxidasa	520	77
9	ACN69056.1	<i>P. sanguineus</i>	Redoxasa multicobre	518	76
10	ACO53432.1	<i>Trametes</i> sp. 30	Lacasa 5	518	75
11	ACO53431.1	<i>Trametes</i> sp. 30	Lacasa híbrida	520	76
12	AAQ12269.1	<i>Trametes</i> sp. I-62	Lacasa	520	77
13	AAA33103.1	<i>T. hirsuta</i>	Fenoloxidasa ligninolítica	520	80
14	AAL93622.1	<i>T. versicolor</i>	Lacasa III	520	80
15	BAA22153.1	<i>T. versicolor</i>	Lacasa	520	80
16	AAA33104.1	<i>T. hirsuta</i>	Fenoloxidasa ligninolítica	520	79
17	CAA77015.1	<i>T. versicolor</i>	Lacasa	520	79
18	AAL07440.1	<i>T. versicolor</i>	Precursor de lacasa B	520	79
19	AAC41686.1 Q99044.1	<i>T. villosa</i>	Lacasa	520	79
20	AAQ12268.1	<i>Trametes</i> sp. I-62	Lacasa	520	75

La proteína deducida presenta 496 aminoácidos con una masa molecular de 66 kDa. En esta secuencia aminoacídica se han podido identificar los cuatro dominios de unión al cobre (II) altamente conservados en lacasas. Se observa el patrón repetitivo de His-X-His que siguen estos dominios implicados en la coordinación del sitio trinuclear tipo 2/tipo 3 de unión al cobre. Se observaron también los cuatro residuos de unión al cobre tipo I: His 394, His 455 y Cys 450, unidas fuertemente al ion cobre, y Phe 460. Igualmente se identificaron cuatro sitios susceptibles de N-glicosilación en las posiciones 51, 54, 207 y 433 siguiendo el patrón Asn-X-Ser/Thr (Figura 3).

AIGPKADMTITDGA VSPDGFERQAILVNNGFPSPLIVGNKGDRFQLNVVDNLTNHTMLK
 STSIHWHGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCD
 GLRGPMVVYDPQDPHKDLYDVDDDESTVITLADWYHLAAKVGPVPTADATLINGLGRSL
 STLNADLAVISVTKGKRYRFRLLVLSLSDPNHTFSIDGHTMTVIEADSVNLKPQVDSIQ
 IFAAQRYSFVLNADQDIGNHWIRALPNSGNRGS DAGVNSAILRYDGADPVEPTTSQTPS
 TQPLIESALTTLEGTPAGDPTPGGVDLA INMAFGFAAGKFTINGASFPTPTVPVLLQI
 LSGAQSAQDLLPSGSVYSLPSNANIEISLPATAAAPGFPHPFHLLHGHTFAVVRSSGQQT
 YNYANPVYRDVVSTGSPGDNVTIRFRTDNPGPWFLHCHIDFHLEAGFAVVF AEDIPDVA
 ATNPVPPQAWSDLCP TYDALAPEDQ

Figura 3. Secuencia aminoacídica deducida para la lacasa de *C. rigida* expresada en extracto acuoso de alpeorujo. Los aminoácidos subrayados pertenecen al sitio de unión al cobre tipo I. En verde, se identifica el cuarto aminoácido de esta región, la fenilalanina en posición 460. Se muestran en sombreado los residuos pertenecientes a los sitios de unión correspondientes al complejo híbrido tipo 2/tipo 3, que siguen el patrón His-X-His. En rojo se señalan los cuatro sitios potenciales de glicosilación de la proteína.

DISCUSIÓN

La secuencia nucleotídica de la banda simple de ADNc de 1.2 kb obtenida tras una primera etapa de amplificación del gen, mostró la máxima homología con el gen *lcc1* de la lacasa de *Trametes* sp. C 30 (Klonowska *et al.*, 2005). Sin embargo, la secuencia aminoacídica deducida del gen de la lacasa de *C. rigida* en presencia de extracto acuoso de alpeorujo identificado en el presente trabajo, mostró gran homología con la lacasa del hongo *T. trogii* (Colao *et al.*, 2003). Esta gran similitud ha sido descrita anteriormente entre la

secuencia amino terminal de la lacasa de *C. rigida* cultivado en medio MB con glucosa y cobre y la de la lacasa de *T. trogii* con una homología del 80% (Saparrat *et al.*, 2002). La secuencia aminoacídica mostró todos los dominios observados para las lacasas azules de otros hongos basidiomicetos como el mencionado *T. trogii* (Colao *et al.*, 2003). En nuestro caso, el cuarto aminoácido del sitio de unión al cobre tipo I y de enlace más débil al ión, se correspondía con una fenilalanina al igual que en el caso de la lacasa de *T. trogii* (Colao *et al.*, 2003).

Tanto en el presente trabajo, en presencia de alpeorujó, como en los anteriores realizados por Saparrat *et al.* (2002), en medio basal MB con glucosa y cobre, se purificaron y caracterizaron dos isoenzimas de lacasa del hongo *C. rigida*. El zimograma realizado, además, muestra la presencia de dos bandas de actividad. Sin embargo, en nuestro estudio sólo se ha podido amplificar una sola banda de ADNc de lacasa, utilizando un cebador basado en la secuencia amino terminal de la proteína descrita por Saparrat *et al.* (2002).


Este hecho sugiere que las dos isoenzimas Lacl y Lacll producidas tanto en medio basal MB en ausencia de alpeorujó como en presencia de este residuo, son variantes del mismo gen *lcc1* y que las pequeñas diferencias entre ellas podrían explicarse por la existencia de variantes alélicas del gen, ya que *C. rigida* es un hongo dicariótico (Ibáñez, 1998). Estudios anteriores han constatado este mismo hecho en otras enzimas de hongos dicarióticos, concretamente en la enzima VP de *P. eryngii* (Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999).

En definitiva, este estudio demuestra tanto proteómica como genéticamente que las isoenzimas de lacasa de *C. rigida* producidas en medio basal y en presencia de alpeorujó son las mismas ya que están codificadas por el mismo gen *lcc1*.



Capítulo 3

Regulación de la
expresión de la lacasa
de *Corioloopsis rigida*
por extracto acuoso de
alpeorrujo y cobre



CAPÍTULO 3

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA LACASA DE *Corioloopsis rigida* POR EXTRACTO ACUOSO DE ALPEORUJO Y COBRE

Objetivo general

Se ha descrito que las isoenzimas de lacasa producidas por *C. rigida* en presencia de alpeorujo son las mismas que las identificadas anteriormente en medio basal MB con glucosa y cobre tanto proteómica como genómicamente (Saparrat *et al.*, 2002). Se sabe, además, que determinados metales pesados, como el cobre, son capaces de aumentar significativamente los niveles de producción de actividad lacasa (Collins y Dobson, 1997; Saparrat *et al.*, 2002). De hecho, se ha estudiado el papel del cobre en la regulación del gen de determinadas lacasas y la expresión de las diferentes isoenzimas de dicha proteína (Collins y Dobson, 1997; Palmieri *et al.*, 2000; Quaratino *et al.*, 2008a). Los compuestos aromáticos son también decisivos en la producción de lacasa por determinados hongos como *P. tigrinus* (Quaratino *et al.*, 2007) y *T. versicolor* (Collins y Dobson, 1997; Minussi *et al.*, 2007).

Por ello en este capítulo se va a investigar la influencia del alpeorujo y el cobre en el desarrollo de cultivos de *C. rigida* y la expresión del gen de la lacasa de dicho hongo en esas condiciones.

Material y métodos

Para el estudio del efecto del extracto acuoso de alpeorujo y cobre en el desarrollo de los cultivos de *C. rigida* y en la expresión de la actividad lacasa se prepararon preinóculos de dicho hongo en medio de cultivo basal MB en presencia de glucosa y cobre tal y como se ha descrito anteriormente en Material y métodos (2.2.).

El medio de cultivo de *C. rigida* utilizado en este ensayo fue MB con glucosa, 300 μ M CuSO₄ y concentraciones del 0, 2,5, 10 y 20% (v/v) de extracto acuoso de alpeorujo (ADOR). Se realizaron los respectivos controles con suspensión de micelio autoclavado, sin ADOR y sin cobre. Estos cultivos se incubaron a 28 °C en agitación (150 rpm) durante 0, 5, 10 y 15 días. Transcurridos los diferentes tiempos de incubación se centrifugaron las muestras a 8000 rpm durante 10 min a 4 °C, separando el micelio del medio de cultivo. A los medios de cultivo de *C. rigida* se les determinó: pH, color, azúcares reductores, proteínas, biomasa, contenido en polifenoles totales y actividad lacasa tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado general de Material y métodos. El micelio se conservó inmediatamente a -80 °C para evitar la degradación del ARN del mismo. Posteriormente se extrajo el ARN para el posterior estudio por PCR cuantitativa a tiempo real (PCR-Q) de la expresión del gen de la lacasa de *C. rigida* en estas condiciones.

Para las reacciones de PCR-Q se extrajo el ARN del micelio de los cultivos de *C. rigida* con diferentes concentraciones de ADOR y cobre siguiendo la metodología descrita en el apartado general de Material y métodos (2.2.). Las muestras de ARN obtenidas se trataron con ADNasa I para eliminar cualquier resto de ADN genómico que pudiera interferir en los resultados. Posteriormente se procedió a la transcripción inversa del ARN para la obtención del ADNc correspondiente según el apartado 7.3. de la sección general de Material y métodos. Para ello, se realizaron dos mezclas de reacción para cada una de las muestras: una que incluía la enzima retrotranscriptasa y otra control sin dicha enzima. Ambas mezclas se utilizaron en las reacciones de PCR-Q asegurándonos así que las amplificaciones obtenidas eran a partir del ADNc y no de restos de ADN genómico no eliminado por el tratamiento con ADNasa I.

Para normalizar los resultados de las amplificaciones se utilizó como control el gen constitutivo para el ARNr 18S, cuyos cebadores específicos fueron 18S-R y 18S-F. Para determinar la expresión del gen de lacasa de *C. rigida* se utilizaron los cebadores LCC1-F y LCC1-R. Las secuencias exactas de todos estos cebadores se encuentran descritas en el apartado 8.1. del apartado general de Material y métodos. Las reacciones de PCR cuantitativa a

tiempo real se llevaron a cabo siguiendo las condiciones descritas en la sección general de Material y métodos (8.1.).

Resultados

pH

La determinación de pH a lo largo del proceso de incubación de *C. rigida* en ausencia de ADOR, mostró un pequeño descenso del mismo respecto a los controles con micelio de *C. rigida* inactivado tanto en ausencia como en presencia de cobre al inicio de la incubación. Sin embargo, a partir de los 10 días de incubación se observó un aumento de pH en los medios de cultivo de *C. rigida* respecto a los controles independientemente de la presencia o ausencia de cobre (Figura 1A).

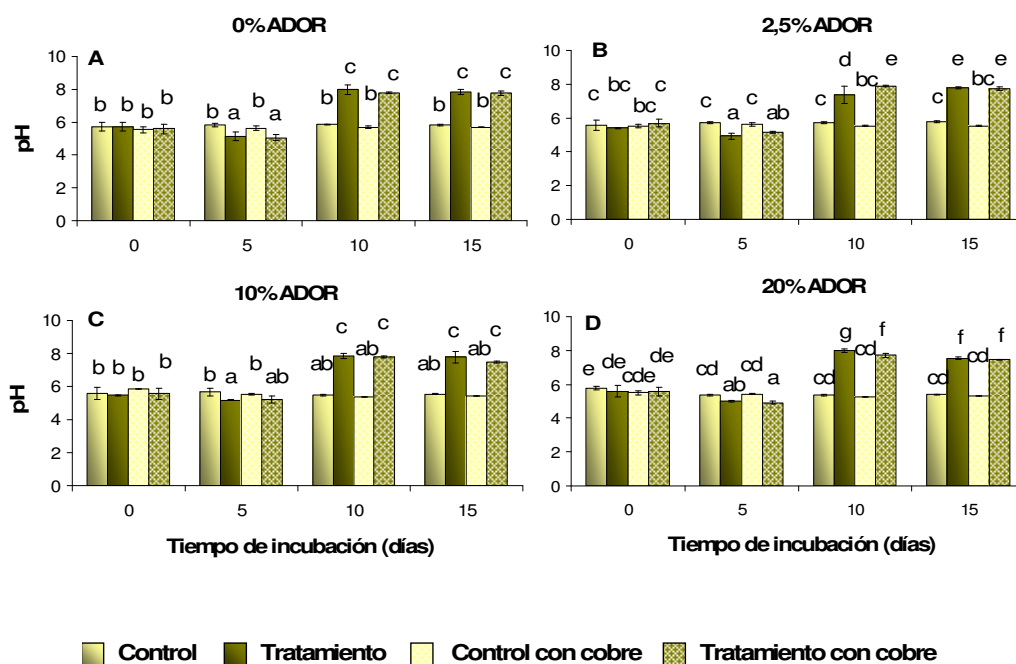


Figura 1. pH de cultivos de *C. rigida* en presencia o no de cobre y de diferentes concentraciones de ADOR (0, 2,5, 10 y 20%) durante 5, 10 y 15 días de incubación. Las letras distintas en cada barra para cada concentración de ADOR indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

En los medios de cultivo en presencia de diferentes concentraciones de extracto acuoso de alpeorujó se obtuvieron los mismos resultados que los observados en los cultivos sin ADOR detectándose una ligera acidificación del medio tras 5 de incubación y un aumento significativo de pH a los 10 y 15 días de incubación tanto en ausencia como en presencia de cobre (Figuras 1B, C y D).

Color

La determinación de unidades colorimétricas en cultivos de *C. rigida* en ausencia o presencia de ADOR permitió la detección de color tanto en los controles como en los tratamientos en todas las concentraciones estudiadas de extracto acuoso de alpeorujó, siendo mayor éste al aumentar la concentración de residuo (Figura 2).

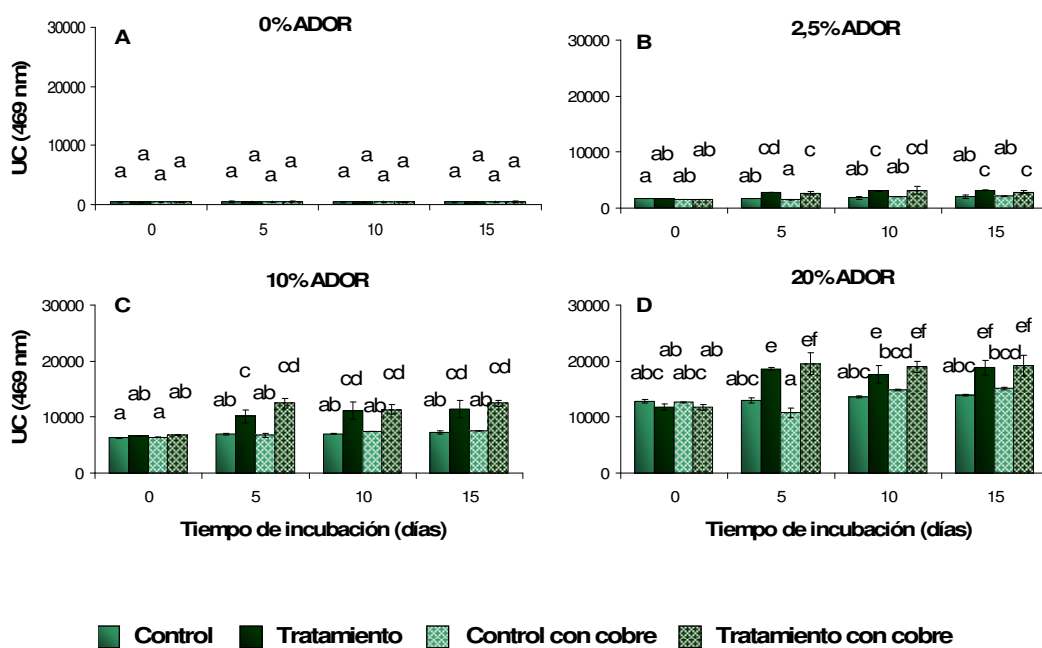


Figura 2. Unidades colorimétricas (UC) de cultivos de *C. rigida* en presencia o no de cobre y de diferentes concentraciones de ADOR (0, 2,5, 10 y 20%) durante 0, 5, 10 y 15 días de incubación. Las letras distintas en cada barra para cada concentración de ADOR indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Durante la incubación, no se detectó variación en la medición del color en ninguno de los cultivos en ausencia de extracto acuoso de alpeorujo. Sin embargo, sí se observó un aumento similar de las unidades colorimétricas respecto a sus controles a partir de los 5 días de incubación en todos los medios de cultivo de *C. rigida* que presentaban extracto acuoso de alpeorujo independientemente de la presencia o no de cobre así como del tiempo de incubación (Figura 2).

Azúcares reductores

La cantidad de azúcares reductores en el medio de cultivo de *C. rigida* sin ADOR disminuyó drásticamente tras 5 de incubación, tanto en los tratamientos en ausencia como en presencia de cobre (Figura 3A).

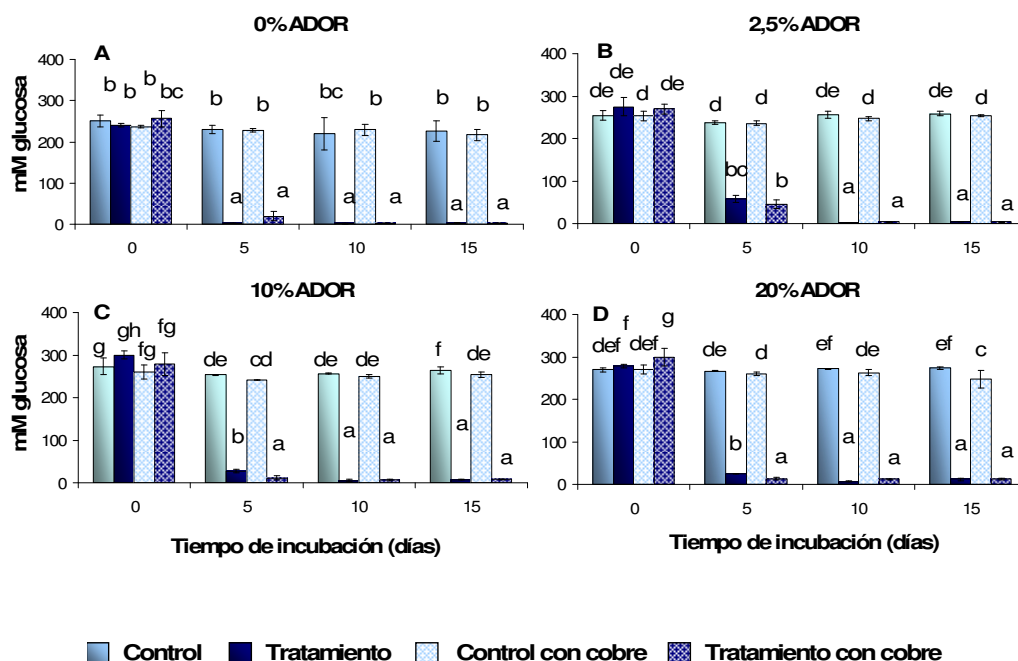


Figura 3. Azúcares reductores (mM glucosa) de cultivos de *C. rigida* en presencia o no de cobre y de diferentes concentraciones de ADOR (0, 2,5, 10 y 20%) durante 0, 5, 10 y 15 días de incubación. Las letras distintas en cada barra para cada concentración de ADOR indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

La aplicación de ADOR al medio produjo también una rápida disminución del contenido de azúcares de los cultivos de *C. rigida* que se incrementó al aumentar el periodo de incubación (Figura 3B, C y D). Sólo en los casos en los que el medio de cultivo del hongo tenía concentraciones de 10 ó 20% de alpeorujo se observó un mayor descenso en la cantidad de azúcares en los tratamientos con cobre respecto a los controles en ausencia de cobre a los 5 días de incubación (Figura 3C y D).

Proteínas

En general se observó un aumento progresivo de la cantidad de proteína de los cultivos a medida que la concentración de ADOR fue mayor, lo que hace pensar en una posible interferencia del color del residuo con la medición de proteínas del cultivo (Figura 4).

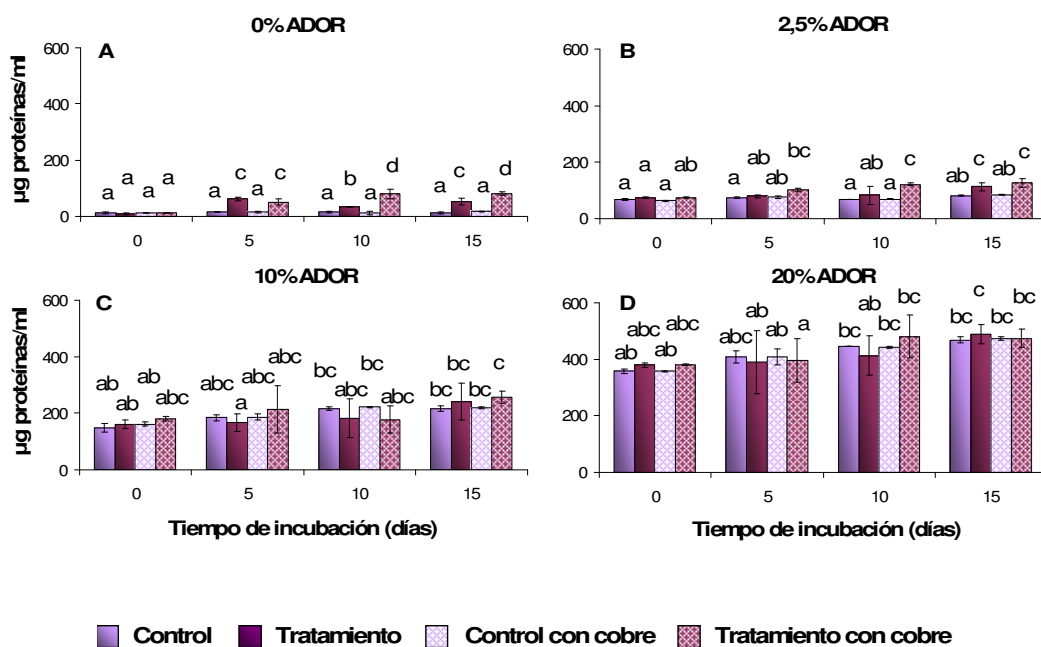


Figura 4. Determinación de proteínas (µg proteína/ml) de cultivos de *C. rigida* en presencia o no de cobre y diferentes concentraciones de ADOR (0, 2,5, 10 y 20%) durante 0, 5, 10 y 15 días de incubación. Las letras distintas en cada barra para cada concentración de ADOR indican diferencias significativas según el test de Duncan (p<0,05).

Se produjo un aumento significativo en la cantidad de proteínas en cultivos de *C. rigida* en ausencia de ADOR a partir de los 5 días de incubación. Este aumento fue superior en medios con cobre respecto a sus controles tras 10 días de cultivo (Figura 4A).

La presencia de 2,5% de extracto acuoso de alpeorujo en los medios de cultivo produjo un ligero aumento de proteínas en el tratamiento con cobre a partir de los 10 días de incubación (Figura 4B). Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas de proteínas en los medios de cultivo con concentraciones altas de alpeorujo (Figura 4C y D).

Biomasa

El crecimiento de *C. rigida* en ausencia de ADOR y cobre, medido mediante la determinación de biomasa fúngica experimentó un aumento a los 10 días de incubación que se mantuvo a lo largo del ensayo. Cabe destacar que tras 15 días de incubación se provocó una reducción de biomasa de *C. rigida* en los tratamientos en presencia de cobre (Figura 5A).

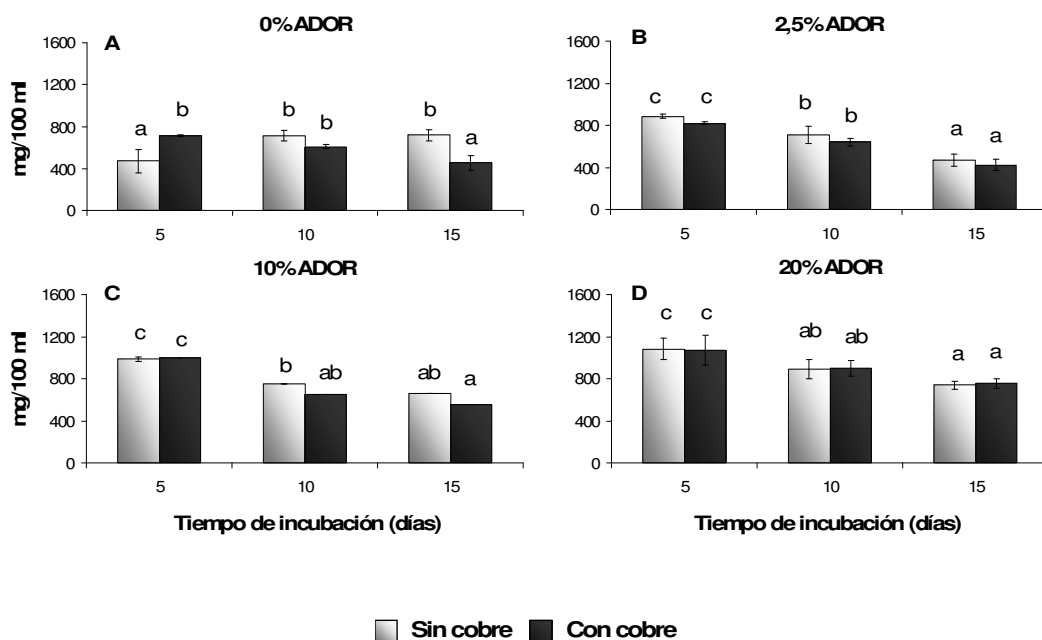


Figura 5. Determinación de la biomasa de cultivos de *C. rigida* en presencia o no de cobre y de diferentes concentraciones de ADOR (0, 2,5, 10 y 20%) durante 0, 5, 10 y 15 días de incubación. Las letras distintas en cada barra para cada concentración de ADOR indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tal y como se puede apreciar en las Figuras 5B, C y D la cantidad de biomasa al inicio de la incubación (día 5) es mayor cuanto más cantidad de extracto acuoso de alpeorujo posea el medio de cultivo de *C. rigida*. Sin embargo, en estos medios en presencia de distintas concentraciones de ADOR, la biomasa del hongo se redujo a lo largo del proceso de incubación, tanto en ausencia como en presencia de cobre (Figuras 5B, C y D).

Fenoles

Los resultados del estudio muestran que en cultivos de *C. rigida* sin ADOR, se detectan cantidades muy pequeñas de fenoles en todos los tratamientos probablemente debidas al color basal del medio de cultivo que produce interferencia con esta técnica colorimétrica (Figura 2A).

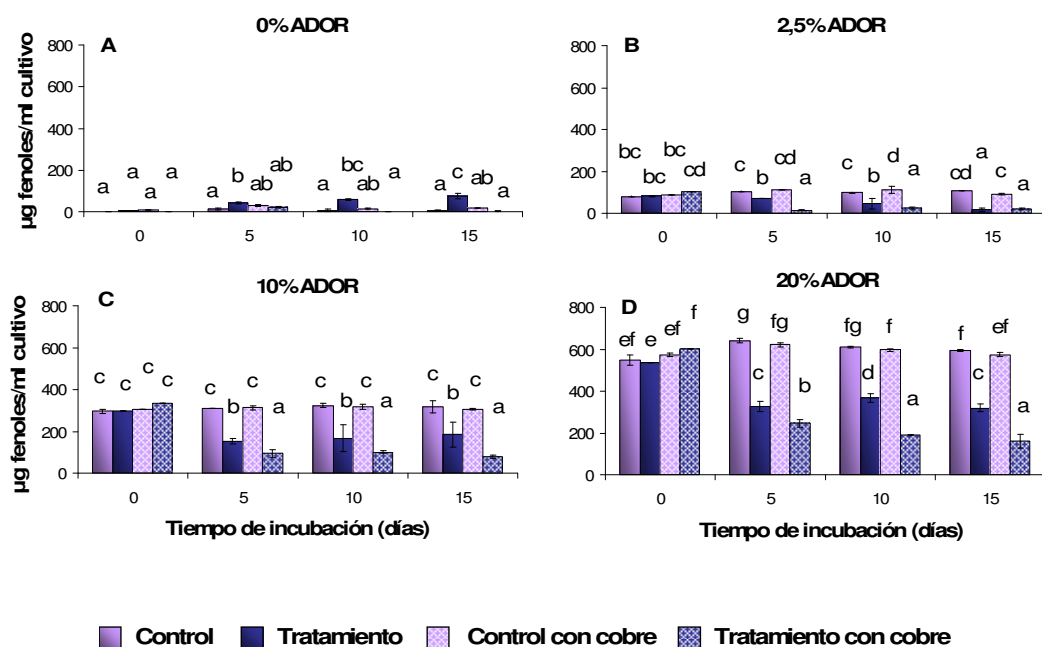


Figura 6. Contenido fenólico ($\mu\text{g fenoles/ml cultivo}$) de cultivos de *C. rigida* en presencia o no de cobre y de diferentes concentraciones de ADOR (0, 2,5, 10 y 20%) durante 0, 5, 10 y 15 días de incubación. Las letras distintas en cada barra para cada concentración de ADOR indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

La cantidad de fenoles en medios con extracto acuoso de alpeorujó se incrementó progresivamente a medida que aumentó la concentración de extracto acuoso de alpeorujó en el medio de cultivo. La inoculación de *C. rigida* en estos medios de cultivo con ADOR, produjo un descenso significativo en el contenido de fenoles libres del medio desde el quinto día de incubación. Cabe destacar que la presencia de cobre en los medios de cultivo de *C. rigida* favoreció el descenso de fenoles (Figura 6B, C y D).

Actividad lacasa

Se detectó actividad lacasa en cultivos de *C. rigida* sin cobre, tanto en presencia como en ausencia de ADOR, aunque esta actividad aumentó en presencia de porcentajes altos de residuo (Figura 7).

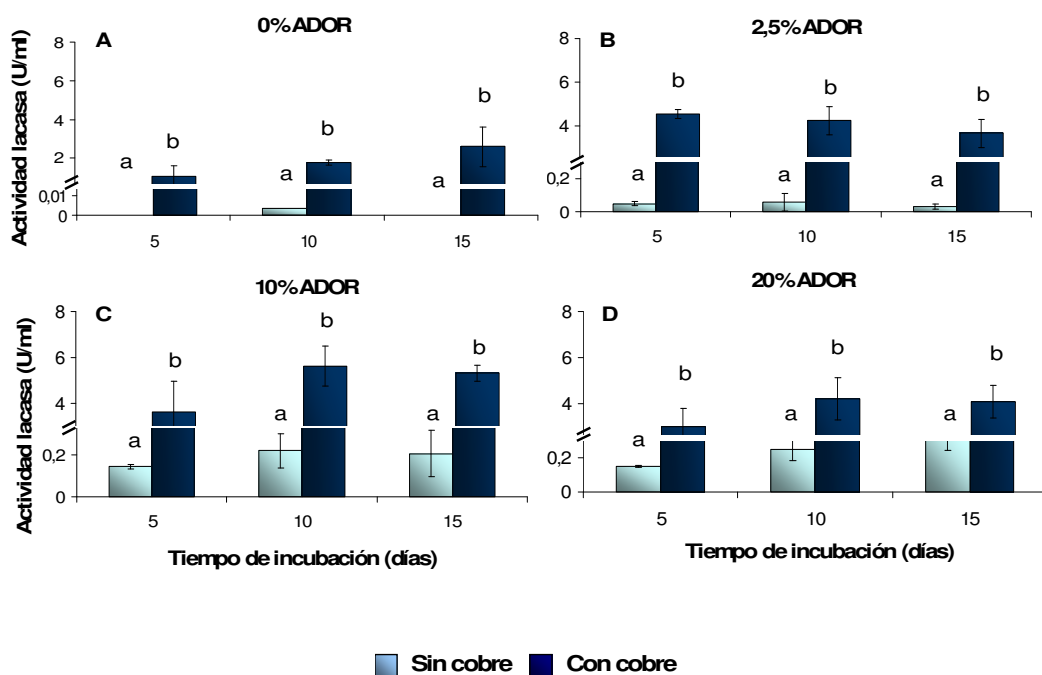


Figura 7. Determinación de la actividad lacasa (U/ml) de cultivos de *C. rigida* en presencia o no de cobre y de diferentes concentraciones de ADOR (0, 2,5, 10 y 20%) durante 0, 5, 10 y 15 días de incubación. Las letras distintas en cada barra para cada concentración de ADOR indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

La presencia de cobre en los medios de cultivo de *C. rigida* produjo un aumento significativo de dicha actividad enzimática tanto en presencia o ausencia de ADOR. La actividad lacasa no se modificó a lo largo del periodo de incubación en ninguno de los tratamientos ensayados (Figura 7).

Regulación de la expresión de la lacasa de *C. rigida* por extracto acuoso de alpeorujío y cobre

El estudio del nivel de transcripción del gen *lcc1* de la lacasa del hongo *C. rigida* mostró un aumento significativo de la expresión del gen en los tratamientos sin cobre a lo largo del proceso de incubación, independientemente de la cantidad de ADOR presente en el medio de cultivo (Figura 8).

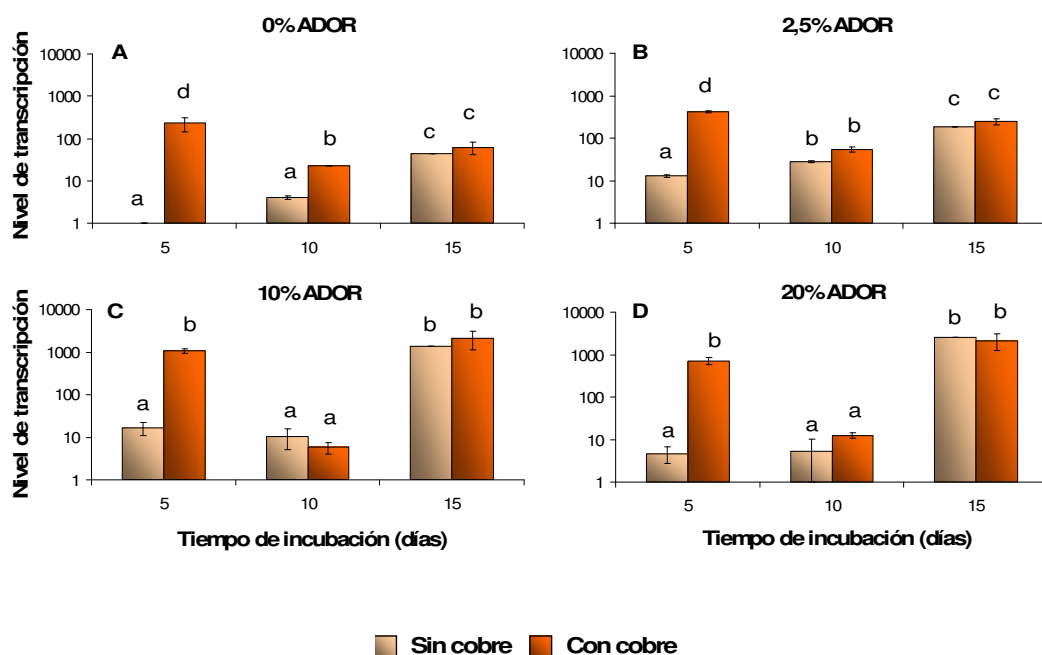


Figura 8. Expresión del gen medido como nivel de transcripción de cultivos de *C. rigida* en presencia o no de cobre y de diferentes concentraciones de ADOR (0, 2,5, 10 y 20%) durante 0, 5, 10 y 15 días de incubación. Las letras distintas en cada barra para cada concentración de ADOR indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

La expresión del gen de la lacasa de *C. rigida* fue significativamente superior en cultivos con cobre a los 5 días de incubación, tanto en presencia como en ausencia de ADOR. Sin embargo, hay que destacar que esta activación del gen de la lacasa en presencia de cobre no se mantuvo a lo largo del periodo de incubación (Figura 8). De hecho, en nuestro ensayo se observan generalmente niveles parecidos del nivel de transcripción del gen a los 5 y 15 días de incubación sobre todo en concentraciones elevadas de extracto acuoso de alpeorujó, aunque este nivel de expresión disminuye considerablemente a los 10 días de incubación (Figura 8).

Con los resultados obtenidos podemos concluir que a los 15 días de incubación de *C. rigida* no hubo correlación entre la concentración de ADOR en medios de cultivo y el porcentaje de reducción de fenoles. Sin embargo, sí se obtuvo buena correlación entre la concentración de extracto acuoso de

alpeorujos y el nivel de actividad lacasa en medios sin cobre ($r=0,91$). Cabe destacar también que los niveles de actividad lacasa y el porcentaje de reducción de fenoles de *C. rigida* no mostraron correlación. No obstante se observó correlación entre el nivel de transcripción del gen *lcc1* y la concentración de ADOR en los medios de cultivo de *C. rigida* en ausencia de cobre al final del proceso de incubación ($r=0,99$). Además, el nivel de expresión del gen de lacasa del hongo *C. rigida* y la actividad lacasa del mismo tuvieron también una correlación positiva en los casos de medios de cultivo sin cobre ($r=0,92$). Esta correlación entre el nivel de transcripción del gen *lcc1* y la actividad lacasa fue menor en aquellos cultivos en presencia de cobre ($r=0,384$).

DISCUSIÓN

Las lacasas de los hongos de la podredumbre blanca son enzimas muy influenciadas por las distintas variables del medio en las que se producen, por ello es importante optimizar las condiciones de cultivo para conseguir la máxima producción enzimática. Se han identificado numerosos compuestos de diferente naturaleza con efecto inductor o inhibidor de esta enzima como las distintas fuentes de carbono, el etanol, el nitrógeno y la presencia de metales pesados o compuestos aromáticos (Galhaup *et al.*, 2002; Meza *et al.*, 2007; Minussi *et al.*, 2007; Quarantino *et al.*, 2008a; Fonseca *et al.*, 2009).

En el estudio de la influencia del extracto acuoso de alpeorujos y del cobre en el crecimiento y producción de lacasa del hongo *C. rigida* se comprobó que tras 10 ó 15 días de incubación se produjo un incremento de pH del medio de cultivo. De hecho, Sampedro *et al.* (2007a) observaron un aumento de pH del alpeorujos seco y extractado tras 20 semanas de incubación con los hongos saprobios *P. subvermispora* y *P. radiata*. También se ha descrito un aumento del pH en el medio de cultivo de *C. rigida* sin ADOR al igual que ocurre en el caso de *T. pubescens* tras el agotamiento de la glucosa como fuente principal de carbono (Galhaup y Haltrich, 2001). Este aumento de pH podría deberse a la degradación de compuestos ácidos y la mineralización de compuestos orgánicos como proteínas, aminoácidos y péptidos a amonio

(Paredes *et al.*, 2002). Sin embargo, *C. rigida* produjo un descenso generalizado del pH del medio de cultivo tras 5 días de incubación. Esta misma evolución del pH la observaron Saparrat *et al.* (2002) en su estudio sobre la producción de lacasa de *C. rigida* en medio basal tanto en ausencia como en presencia de cobre como inductor. El descenso inicial de pH se identificó con la etapa de crecimiento vegetativo inicial del hongo, y el aumento posterior del mismo con el agotamiento de la glucosa del medio, tal y como se ha descrito anteriormente.

En nuestros ensayos el color del cultivo de *C. rigida* con extracto acuoso de alpeorujo en ausencia o presencia de cobre, aumentó tras 5 días de incubación, tiempo en el que se observó un descenso generalizado de fenoles. Se ha descrito un aumento de color en medios de cultivo de ciertos hongos en presencia de residuos de la industria del olivar debido a la polimerización de fenoles producida por la actividad lacasa (Jaouani *et al.*, 2005; Canfora *et al.*, 2008). No obstante, en otros trabajos se ha identificado un proceso de decoloración de residuos de la industria del olivar tras su incubación con hongos. Concretamente, los hongos *P. coccineus*, *P. sajor-caju*, *C. polyzona* y *L. tigrinus*, mostraron gran capacidad de decoloración del alpechín así como de disminuir la demanda química de oxígeno del residuo (Jaouani *et al.*, 2003). Se han descrito las enzimas peroxidasas del sistema ligninolítico de los hongos de la podredumbre blanca como las responsables de esta decoloración de los residuos de la industria del olivar. De hecho, en estudios con medios de cultivo de *P. flavido-alba* a los que se añadió el pigmento del alpechín a tiempo cero de incubación, no se observó decoloración en aquellos cultivos en los que predominaba la actividad lacasa y sí en aquéllos en los que se detectaron peroxidasas como la MnP y la LiP (Ben Hamman, 1997). Asimismo, Sayadi y Ellouz (1995) demostraron que la LiP era la principal responsable de la decoloración del alpechín y que este efecto se debía a la degradación de los compuestos polifenólicos del residuo en fragmentos más pequeños susceptibles de ser absorbidos por las células fúngicas y subsecuentemente mineralizados. Sin embargo, en otros trabajos se ha relacionado la actividad lacasa con la decoloración de los residuos. Concretamente, Dias *et al.* (2004) comprueban que la actividad lacasa del basidiomiceto Euc-1 puede decolorar el alpechín, residuo de la industria del olivar. Igualmente, Minussi *et al.* (2007)

detectaron reducción de color en el alpechín tras su tratamiento con lacasa semipurificada del hongo *T. versicolor*. Hay que tener en cuenta que otros estudios revelan que no siempre hay relación directa entre la disminución en el contenido fenólico del medio de cultivo de hongos en presencia de residuos del olivar con cambios en la coloración del mismo (D'Annibale *et al.*, 1998).

Por tanto, hay resultados contradictorios en la relación entre el color de los cultivos y la actividad lacasa que podría explicarse por la diferente composición fenólica de cada uno de los residuos. De hecho en un estudio sobre la transformación oxidativa de mezclas fenólicas realizada por Canfora *et al.* (2008) se observó que la lacasa de *T. versicolor* conseguía un oscurecimiento de aquellas soluciones de fenoles considerados altamente reactivos como el catecol o el metilcatecol, e incluso se producía la formación de un precipitado visible. Sin embargo para soluciones de fenoles más recalcitrantes, como *m*-tirosoles o protocatecuico, la solución mantenía su color. La reactividad de los fenoles depende de su masa molecular, número de grupos OH, su localización y del resto de sustituyentes de la molécula fenólica.

Los azúcares de los medios de cultivo de *C. rigida* disminuyeron rápidamente tras 5 días de incubación en todos los tratamientos ensayados, efecto que produjo un aumento considerable de los niveles de actividad lacasa y del valor de pH. Como se sabe, se produce incremento de la actividad lacasa en cultivos de hongos donde la glucosa comienza a ser limitante debido al agotamiento de esta fuente de carbono rápida (Galhaup *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2006). En estos casos, el hongo tras agotar la glucosa conseguiría una segunda fuente de carbono mediante la degradación de lignina u otros compuestos fenólicos del medio por la actividad lacasa. Además, este hecho se ha descrito anteriormente en esta Memoria Doctoral pues se constata un retraso en la producción de lacasa en medios suplementados con ADOR y glucosa respecto a medios con la misma concentración de extracto acuoso de alpeorujo pero sin glucosa. Se puede establecer una relación directa entre la producción de lacasa y el agotamiento de la glucosa que puede deberse a la inhibición de la transcripción del gen de la lacasa regulado por los elementos CreA en presencia de glucosa (Galhaup *et al.*, 2002).

La cantidad de proteínas de los cultivos de *C. rigida* con diferentes concentraciones de ADOR y en presencia o ausencia de cobre aumentó

significativamente a medida que se incrementaba la cantidad de residuo en el medio de cultivo, independientemente del crecimiento del hongo medido como producción de biomasa. Esto hecho evidencia la interferencia del color del extracto acuoso de alpeorujo en la determinación de proteínas del medio, por lo que no es posible determinar con fiabilidad la concentración y posibles variaciones en la cantidad de proteínas de los cultivos de *C. rigida* a lo largo del proceso de incubación. Este hecho se ha descrito también por Canfora *et al.* (2008) en su trabajo sobre la transformación oxidativa de mezclas de fenoles tanto naturales como sintéticos por parte de la lacasa de *T. versicolor*.

En cultivos de *C. rigida* sin ADOR la presencia de cobre disminuye el crecimiento del hongo al final del proceso de incubación. Algunos estudios han constatado un efecto inhibitor del crecimiento de los hongos *T. pubescens*, *P. tigrinus*, *Coriolus versicolor* y *P. sanguineus* por la presencia de cobre en el medio de cultivo (Galhaup y Haltrich, 2001; Quaratino *et al.*, 2008a; Fonseca *et al.*, 2009). En medios con ADOR, *C. rigida* disminuyó su biomasa a lo largo de la incubación en presencia o no de cobre, lo que induce a pensar que en este caso la inhibición del crecimiento pueda ser debida a la presencia de alpeorujo. Sin embargo, también hemos observado que los valores iniciales de biomasa en medios con alpeorujo son superiores a los que se obtuvieron sin extracto acuoso de alpeorujo, aunque, el aumento de la concentración de ADOR no conllevó un incremento proporcional de la biomasa del hongo. A este respecto, se han observado resultados contradictorios, ya que en estudios realizados por de la Rubia *et al.* (2008) se comprobó que la presencia de alpechín en el medio de cultivo aumentaba la biomasa de los hongos *T. versicolor*, *P. cinnabarinus*, *P. subvermispota*, *P. flavido-alba* y *P. pulmonarius*, sin embargo, otros estudios indicaron una disminución del crecimiento del hongo *P. chrysosporium* cuando se incubó en presencia de alpechín (Sayadi y Ellouz, 1995).

C. rigida disminuyó significativamente la cantidad de fenoles libres de cultivos con ADOR tras sólo 5 días de incubación, incrementándose este descenso al aumentar el tiempo de incubación. La reducción fenólica del alpeorujo tras la incubación con hongos de la podredumbre blanca se observó previamente en trabajos como el de Sampedro *et al.* (2007a) en el que se consiguió prácticamente la eliminación total del contenido fenólico del residuo tras su incubación durante 20 semanas con distintos hongos ligninolíticos,

entre los cuales destacó *C. rigida*. Otros autores han detectado un 73% de reducción de fenoles en el extracto acuoso de alpeorujo tras 15 días de incubación con *P. cinnabarinus* (Aranda *et al.*, 2006). De la Rubia *et al.* (2008) consiguieron un gran descenso de fenoles (83%) del alpechín mediante su incubación con *T. versicolor*, *P. cinnabarinus*, *P. subvermispora* y *P. flavido-alba*.

Se observó que al incrementar la concentración de ADOR en el medio de cultivo de *C. rigida* en tratamientos sin cobre se produjo mayor nivel de actividad lacasa. Este efecto, que también se observó previamente en esta Memoria Doctoral (Capítulo 1), apoyaría la hipótesis de la activación de la lacasa por los componentes fenólicos del residuo para su transformación. Este hecho además está apoyado por los estudios de Tsioulpas *et al.* (2002) donde se observó que el alpechín aumentaba la producción de lacasa de *Pleurotus* spp. a medida que se incrementaba la concentración del residuo en el medio de cultivo. Los fenoles de los residuos de la industria del olivar, como el alpeorujo, son compuestos tóxicos para el hongo y provocan la activación de la lacasa para su detoxificación mediante la polimerización de los fenoles que evita su entrada en las células (Sarkanen, 1991; Quaratino *et al.*, 2008a). A este respecto, se sabe que los compuestos aromáticos son decisivos en la producción de actividad lacasa por determinados hongos. Concretamente, la xilidina es uno de los compuestos aromáticos que más induce esta actividad enzimática en hongos como *P. tigrinus* (Quaratino *et al.*, 2007), *T. villosa* (Yaver *et al.*, 1996) y *T. versicolor* (Collins y Dobson, 1997; Minussi *et al.*, 2007). Otros compuestos aromáticos estudiados como posibles inductores de la actividad lacasa son la *o*-toluidina y el 3,5-dihidroxitolueno que pueden incrementar la actividad de diferentes isoenzimas del hongo *Trametes* sp. AH28-2 (Xiao *et al.*, 2006). No obstante, compuestos como los ácidos verátrico y gálico no producen efecto inductor en la actividad lacasa de *T. versicolor* (Collins y Dobson, 1997). Sin embargo, se ha encontrado muy baja correlación entre la concentración de ADOR y el nivel de actividad lacasa en aquellos medios que contenían cobre en su composición indicando una posible interacción de este compuesto en el efecto inductor del extracto acuoso de alpeorujo sobre los niveles de actividad lacasa. Collins y Dobson (1997) observaron el efecto contrario al añadir simultáneamente cobre y xilidina en

cultivos de *T. versicolor*, pues ambos inductores actuaron sinérgicamente en la activación de la transcripción del gen *lcc* resultando en una mayor y más rápida expresión de este gen comparado con la actuación por separado de los compuestos.

Se han realizado numerosos estudios sobre la relación existente entre la actividad lacasa de los hongos ligninolíticos y el descenso de fenoles. Así, de la Rubia *et al.* (2008) observaron un descenso similar de fenoles del alpechín en cultivos de los hongos *T. versicolor*, *P. cinnabarinus*, *P. subvermispora* y *P. flavido-alba* con diferentes actividades lacasas. Tampoco se encontró asociación entre los niveles de lacasa de *Pleurotus* spp. crecido en cultivos con alpechín y el descenso en su contenido fenólico (Tsioulpas *et al.*, 2002). De hecho, en nuestros ensayos no se encontró correlación entre la cantidad de actividad lacasa de *C. rigida* y la reducción de fenoles del extracto acuoso de alpeorujo. No obstante, en otros trabajos con *L. edodes* si se mostró una correlación positiva entre el nivel de actividad lacasa y la reducción de fenoles del alpechín (D'Annibale *et al.*, 2000; Casa *et al.*, 2003).

En relación a la expresión del gen de actividad lacasa pudimos observar, al final del proceso de incubación, una correlación positiva entre la cantidad de extracto acuoso de alpeorujo añadido al medio de cultivo de *C. rigida* en medios sin cobre y la transcripción del gen. Se han estudiado los mecanismos moleculares mediante los cuales se regula la transcripción de genes de lacasa de hongos basidiomicetos. Concretamente, se han identificado las denominadas secuencias XRE, secuencias consenso localizadas en los promotores de los genes de las enzimas lacasa que activan la transcripción de los mismos ante la presencia de elementos xenobióticos, como la *o*-toluidina y el 3,5-dihidroxitolueno, en el medio (Collins y Dobson, 1997; Xiao *et al.*, 2006). Su mecanismo de acción consiste en la unión de dicho elemento xenobiótico a proteínas receptoras específicas, lo cual produce la formación de un complejo que identifica e interactúa con las secuencias XRE en el promotor del gen de lacasa, aumentando la expresión del mismo (Collins y Dobson, 1997). Estas secuencias se han estudiado en el mecanismo de inducción del citocromo P-450c de mamíferos (Fujisawa-Sehara *et al.*, 1987). Además, se han localizado en los genes *lac1* y *lac4* del hongo *P. sajor-caju* y

en las regiones reguladoras de *lacA*, *lacB* y *lacC* de *Trametes* sp. AH28-2 (Soden y Dobson, 2001; Xiao *et al.*, 2006).

Cabe destacar en nuestros ensayos el aumento considerable de los niveles de actividad lacasa de *C. rigida* en presencia de cobre. Se ha descrito el efecto inductor del cobre sobre la actividad lacasa en *T. pubescens* (Galhaup *et al.*, 2002), *G. applanatum*, *Peniophora* sp., *P. sanguineus* y *C. versicolor f. antarcticus* (Fonseca *et al.*, 2009). El cobre, en grandes cantidades, resulta tóxico para las células (Labbé y Thiele, 1999) por lo que el aumento de la lacasa ante altas concentraciones del metal pesado se ha planteado como posible papel defensivo de la célula frente al cobre. Fernández-Larrea y Stahl (1996) atribuyen la función protectora de la lacasa a la quelación de iones de cobre durante la síntesis de la enzima, ya que este metal pesado forma parte de la estructura proteica de la misma. Una segunda hipótesis es la formación de melanina, en la que interviene la enzima lacasa, cuya función podría ser la de barrera fisiológica a altas concentraciones de cobre en el medio (Gadd y Griffith, 1980; Henson *et al.*, 1999). De hecho, Galhaup y Haltrich (2001) comprueban que cuando *T. pubescens* crece con altas concentraciones de cobre, el micelio se oscurece debido a un aumento del contenido en melanina de la biomasa fúngica. Por último, se ha especulado también con el papel defensivo de la melanina frente a altas concentraciones de cobre al comprobarse que este pigmento es capaz de captar metales muy eficientemente (Gadd y de Rome, 1988; Fogarty y Tobin, 1996; Henson *et al.*, 1999). En nuestros ensayos, sin embargo no se ha encontrado una fuerte correlación positiva, en presencia de cobre, entre la cantidad de ADOR en el medio de cultivo y el nivel de transcripción del gen *lcc1* poniéndose de manifiesto, de nuevo, que el cobre interfiere en el papel inductor del extracto acuoso de alpeorajo en la expresión del gen de lacasa de *C. rigida*.

Estudios moleculares indicaron un aumento de los niveles de expresión del gen de la lacasa del hongo *C. rigida* en presencia de cobre respecto a los tratamientos sin cobre independientemente de la cantidad de ADOR en el medio de cultivo. Se ha descrito también que la inducción de la actividad lacasa por cobre va asociada a un incremento de la transcripción del gen codificante de esta proteína en los hongos *T. versicolor* (Collins y Dobson, 1997) y *P. ostreatus* (Palmieri *et al.*, 2000). Se han identificado secuencias


activadoras de la expresión del gen como respuesta a la presencia de metales pesados, las denominadas secuencias MRE. Estas secuencias se han descrito en regiones promotoras de diferentes genes de lacasa de hongos de la podredumbre blanca como el gen *lap2* de lacasa de *T. pubescens* y en la región promotora del gen *pfaL* de lacasa de *P. flavido-alba* (Galhaup y Haltrich, 2001; Rodríguez, 2006).

De hecho, los estudios que relacionan el nivel de transcripción del gen y la cantidad de actividad lacasa indicaron una gran correlación entre ambos factores pero sólo en los medios en ausencia de cobre. El hecho de que los niveles de transcripción del gen de la lacasa sean similares tanto en ausencia como en presencia de cobre sugiere que se ha sintetizado la misma cantidad de enzima en ambos tratamientos. Sin embargo, el hecho de que haya mayor actividad lacasa en presencia de cobre sugiere que en ausencia de cobre, no se activa todo el enzima. En nuestros ensayos no puede demostrarse la existencia de una lacasa inactiva por ausencia de cobre ya que se ha encontrado interferencia en la medición de los niveles de proteína total de las muestras debido al color del ADOR. Sin embargo, trabajos anteriores han demostrado la presencia de una enzima inactiva que depende de la presencia de cobre para presentar actividad enzimática (Collins y Dobson, 1997). Se ha descrito en cultivos de *T. versicolor* que la concentración de proteínas era igual en los medios con o sin cobre pero la actividad lacasa detectada en presencia de cobre era mucho mayor que en ausencia del metal.



Capítulo 4

Inducción de la
actividad lacasa de
Corioloopsis rigida por
Penicillium commune



CAPÍTULO 4

INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD LACASA DE *Coriolopsis rigida* POR *Penicillium commune*

Objetivo general

Las lacasas de los hongos de la podredumbre blanca tienen gran aplicabilidad industrial, entre las que destaca su utilización en tratamientos de biorremediación de subproductos agroindustriales como el alpeorajo (Aranda *et al.*, 2006; Morillo *et al.*, 2009). Sin embargo, para que el proceso de biorremediación enzimática sea efectivo en la revalorización de grandes volúmenes de residuo, como es el caso de la mayoría de los subproductos, se necesita una elevada producción de dicha actividad enzimática. Se sabe que la aplicación de inductores químicos incrementan de forma significativa los niveles de actividad lacasa pero que su utilización industrial supone problemas adicionales como el alto coste y la posible toxicidad de los mismos (Baldrian, 2006). Por ello, en esta Memoria se intenta encontrar estrategias alternativas para conseguir una producción elevada de la lacasa de *C. rigida*.

En el presente capítulo se intentará aumentar la producción de lacasa de *C. rigida* sin la utilización de inductores químicos sino mediante cambios en las condiciones de crecimiento del cultivo y/o a través del cocultivo con otro hongo saprobio. Además, se investigará si la presencia de otro microorganismo en el cultivo de *C. rigida* induce la producción cuantitativa de lacasa o la expresión de otras isoenzimas.

1. Selección de hongos inductores de actividad lacasa

Material y métodos

Se cultivó *C. rigida* conjuntamente con los siguientes hongos saprobios de nuestra colección: *P. chrysogenum* 10, *P. farinosus*, *Penicillium* sp., *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *F. lateritium*, *F. oxysporum* 738, *F. concolor*, *F. graminearum* y *Mucor racemosus* (Tabla 1). Para ello, se prepararon inóculos de los hongos en medio de cultivo glucosa y extracto de levadura con las condiciones descritas en el apartado general de Material y métodos (2.2.). En Erlenmeyer de 250 ml que contenían 70 ml de medio MB con 5 g/l de glucosa se inocularon 500 mg del micelio de *C. rigida* y de los potenciales hongos inductores de actividad lacasa y se mantuvieron en agitación durante 15 días a 28 °C. Tras este periodo, los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min y el sobrenadante resultante se usó para la determinación de la actividad lacasa (Material y métodos 4.1.).

Tabla 1. Especies fúngicas utilizadas en la selección de inductores de la actividad lacasa de *C. rigida*.

Especie/cepa	Procedencia	Referencia
<i>P. chrysogenum</i> 10	Aislado suelo Castañar Ibor	Thom, C. 1910, EEZ 10
<i>P. farinosus</i>	Aislado de esporocarpos	Samsom, 1974, BAFC F8846
<i>Penicillium</i> sp	Aislado suelo bosque Xalapa	Thom, C. 1910, CCIE 1000
<i>P. brevicompactum</i>	Aislado suelo de Granada	Samsom <i>et al.</i> , 1976
<i>P. chrysogenum</i>	Aislado suelo de Granada	Thom, 1910, EEZ 1
<i>F. lateritium</i>	Aislado suelo Buenos Aires	Booth, C. 1977, BAFC, 2317
<i>F. oxysporum</i> 738	Aislado suelo Buenos Aires	Booth, C. 1977, BAFC, 738
<i>F. concolor</i>	Aislado suelo Buenos Aires	Reinking, 1934, BAFC, 2183
<i>F. graminearum</i>	Aislado suelo Buenos Aires	Booth, C. 1977 BAFC, 122
<i>M. racemosus</i>	Aislado de alpeorajo	Bull, 1791, EEZ 2

Resultados

Tras la incubación en agitación de *C. rigida* con los distintos hongos objeto de estudio se observó que ciertos hongos como *P. chrysogenum* 10 y *M. racemosus* no modificaron la actividad lacasa de *C. rigida*, sin embargo el resto de los hongos ensayados aumentaron su actividad sensiblemente. Hay que destacar que los hongos *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *P. chrysogenum* y *Penicillium* sp. incrementaron la actividad lacasa de *C. rigida* notablemente tras 12 días de incubación (Figura 1). Dado que la interacción que más actividad lacasa produjo fue la de *C. rigida* con *Penicillium* sp. (1,03 U/ml) se decidió identificar el microorganismo responsable de dicha inducción así como realizar un estudio detallado de la producción de lacasa en los cocultivos de *C. rigida* y *Penicillium* sp.

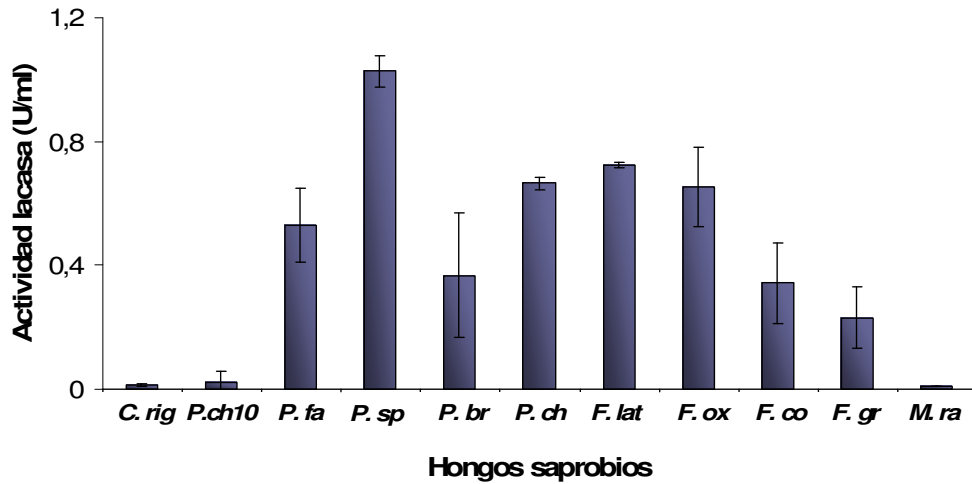


Figura 1. Actividad lacasa (U/ml) de cocultivos de *C. rigida* con los hongos saprobios *P. chrysogenum* 10 (*P. ch* 10), *P. farinosus* (*P. fa*), *Penicillium sp.* (*P. sp.*), *P. brevicompactum* (*P. br*), *P. chrysogenum* (*P. ch*), *F. lateritium* (*F. lat*), *F. oxysporum* 738 (*F. ox*), *F. concolor* (*F. co*), *F. graminearum* (*F. gr*), y *M. racemosus* (*M. ra*) tras 12 días de incubación.

2. Identificación molecular de *Penicillium sp.*

Objetivo

Tras la elección del hongo *Penicillium sp.* como inductor de la actividad lacasa de *C. rigida*, se identificó la especie concreta mediante la secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS) de los genes de ARNr y comparación en las bases de datos Genbank.

Material y métodos

Se prepararon matraces de 250 ml con 70 ml de medio glucosa y extracto de levadura y se inocularon mediante trozos de 0,5x0,5 cm de medio con el hongo a identificar. Estos cultivos se incubaron a 28 °C durante 7 días tras lo cual se centrifugaron y el micelio resultante se homogeneizó, lavó con DEPC y se mantuvo a -80 °C hasta la extracción de ADN.

Para la extracción de ADN genómico, este micelio se congeló con nitrógeno líquido y se trituró hasta obtener un polvo fino en un mortero de porcelana. A partir de este homogeneizado se procedió a la extracción del ADN genómico mediante el kit *Genomix DNA extraction* (Talent, Italia) y se cuantificó la concentración de ADN obtenido (Material y métodos, apartado 7.1.) mediante espectrofotometría.

Posteriormente se amplificó el ADN resultante mediante PCR utilizándose los cebadores degenerados correspondientes a las regiones ITS1 e ITS4 de hongos basidiomicetos descritos por White *et al.* (1990).

ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCG 3'
ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Para la amplificación por PCR se usó un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) y se preparó la mezcla de reacción tal y como se describe en el apartado general de Material y métodos (7.4.). Los parámetros usados para la amplificación fueron: una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 3 min, seguidos de 30 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales se desarrollaron a 94 °C durante 30 s, luego 45 °C durante 30 s, seguido de 72 °C durante 2 min y, una etapa final de extensión de 72 °C durante 10 min.

Los fragmentos amplificados se visualizaron en geles de agarosa y se extrajeron posteriormente mediante el kit de extracción Gene-clean, Q-BIOgene siguiendo las instrucciones del fabricante (Material y métodos 7.5. y 7.6.). El fragmento aislado se insertó en el vector de clonación *pGEM-T Easy* (Promega) con el que se procedió a la transformación de células competentes de *Escherichia coli* DH5α siguiendo la metodología descrita en el apartado general de Material y métodos (7.7.1. y 7.7.3.).

Tras la identificación del clon con el fragmento inserto se procedió a la purificación del ADN plasmídico mediante el kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega) según se indica en el apartado general Material y métodos (7.7.3. y 7.7.4.). Finalmente, se procedió a la secuenciación de dicho fragmento para su posterior búsqueda BLAST (Altschul *et al.*, 1997) en la base de datos GenBank

para la identificación del microorganismo objeto de estudio (Material y métodos 7.7.5.).

Resultados

Se amplificó el ADN genómico del organismo *Penicillium* sp. usando los cebadores universales ITS1-ITS4 y se obtuvo un fragmento específico de 600 pb aproximadamente. La secuencia nucleotídica mostró un 100% de homología con la secuencia del espaciador transcrito interno del hongo *P. commune* (Número de acceso DQ132843.1).

3. Estudio de la actividad lacasa de *C. rigida*

Material y métodos

Se cultivaron los hongos *C. rigida* y *P. commune* en matraces con 70 ml de medio MB con 10 g/l de glucosa, a partir de los respectivos inóculos preparados tal y como se describe en el apartado general de Material y métodos (2.2.), tanto en monocultivo como en cocultivo. En los hongos en cocultivo se inoculó en primer lugar *C. rigida* y posteriormente *P. commune*, al mismo tiempo, a los 3 y a los 6 días de crecimiento de *C. rigida*.

Tras 12, 18 y 21 días de incubación a 28 °C tanto de forma estacionaria como en agitación (150 rpm) los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min y en el sobrenadante resultante se determinó la actividad lacasa (Material y métodos 4.1.).

Resultados

3.1. Producción de lacasa de *C. rigida* en monocultivo

El análisis de la producción de lacasa por el hongo *C. rigida* se realizó tanto en condiciones estáticas como de agitación. Los resultados de nuestro trabajo muestran una mayor producción de actividad lacasa en condiciones

estáticas, observándose cantidades 20 veces superiores a las de cultivos en agitación (Figura 2). Además, el incremento de actividad lacasa de *C. rigida* en condiciones estáticas se observó desde el inicio del cultivo fúngico. La máxima actividad lacasa del hongo se detectó a los 21 días de cultivo tanto en cultivos de *C. rigida* en condiciones estáticas como de agitación, con valores de 25 y 2 U/ml, respectivamente (Figura 2).

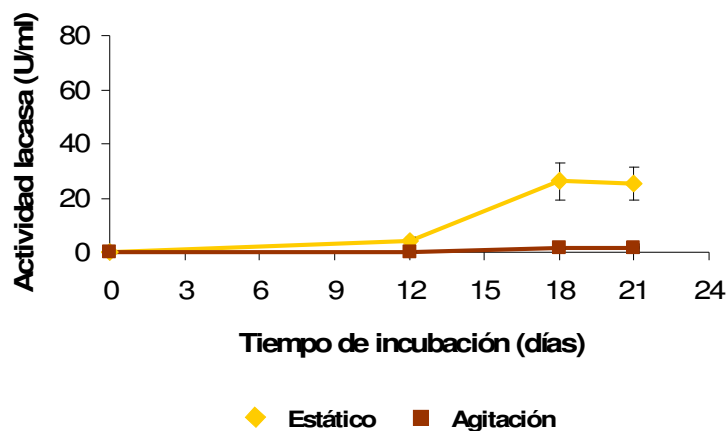


Figura 2. Actividad lacasa (U/ml) de *C. rigida* en monocultivos en condiciones estáticas y de agitación. Las barras de error expresan la desviación estándar.

3.2. Producción de lacasa de *C. rigida* en cocultivos con *P. commune*

Cultivos estáticos

El cocultivo estático de *C. rigida* y *P. commune* inoculados ambos hongos simultáneamente mostró menor actividad lacasa que el monocultivo de *C. rigida* en las mismas condiciones (Figura 3A). Sin embargo, como se puede ver en la Figura 3B la inoculación de *P. commune* a cultivos de 3 días de *C. rigida* produjo un incremento significativo de la actividad lacasa de *C. rigida*. El efecto inductor de *P. commune* sobre la actividad lacasa de *C. rigida* se observó desde el inicio del cultivo aunque alcanzó un máximo a los 12 días de cultivo del mismo (Figura 3B). Cabe destacar el efecto de la inoculación de *P. commune* a los 6 días de cultivo de *C. rigida* ya que, tras un periodo de

crecimiento de 21 días, se detectaron valores de actividad lacasa de 60 U/ml. Podemos concluir que *P. commune* inoculado a cultivos estáticos de *C. rigida* de 6 días triplicó la producción de lacasa respecto al monocultivo de *C. rigida* crecido en las mismas condiciones (Figura 3C).

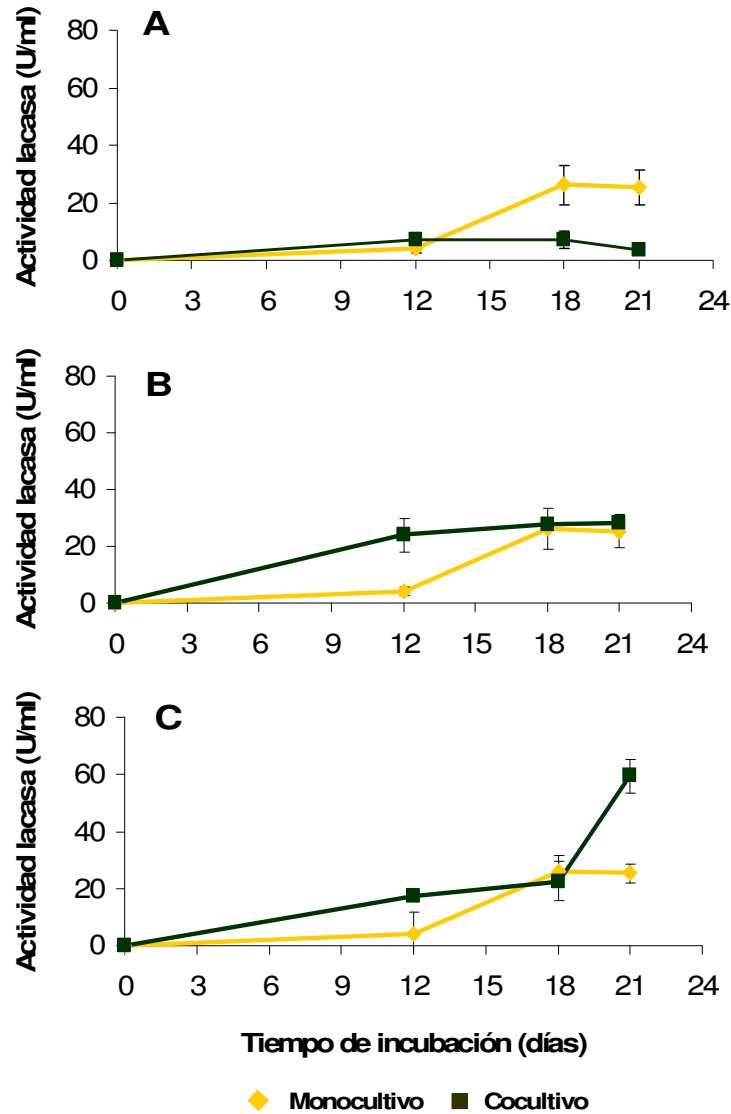


Figura 3. Actividad lacasa (U/ml) de *C. rigida* en monocultivo y cocultivos con *P. commune* estáticos e inoculado al mismo tiempo (A), tras 3 (B) y 6 días de inoculación (C) de *C. rigida*. Las barras de error expresan la desviación estándar.

Cultivos en agitación

Los valores de actividad lacasa de *C. rigida*, tanto en monocultivo como cocultivo en agitación fueron muy inferiores a los obtenidos en condiciones estáticas, independientemente del tiempo de inoculación de *P. commune* respecto a *C. rigida* (Figura 3 y 4). En cocultivos de *C. rigida* y *P. commune* inoculados de forma simultánea se obtuvo una inhibición de la producción de lacasa a tiempos de incubación mayores de 12 días mientras que cuando *P. commune* se inoculó a cultivos de *C. rigida* de 3 y 6 días, la actividad lacasa fue mayor que en los monocultivos de *C. rigida*. El mayor valor de actividad lacasa de *C. rigida* (4,7 U/ml) se detectó tras 12 días de crecimiento del cocultivo con *P. commune*, inoculado éste 3 días después de *C. rigida* (Figura 4).

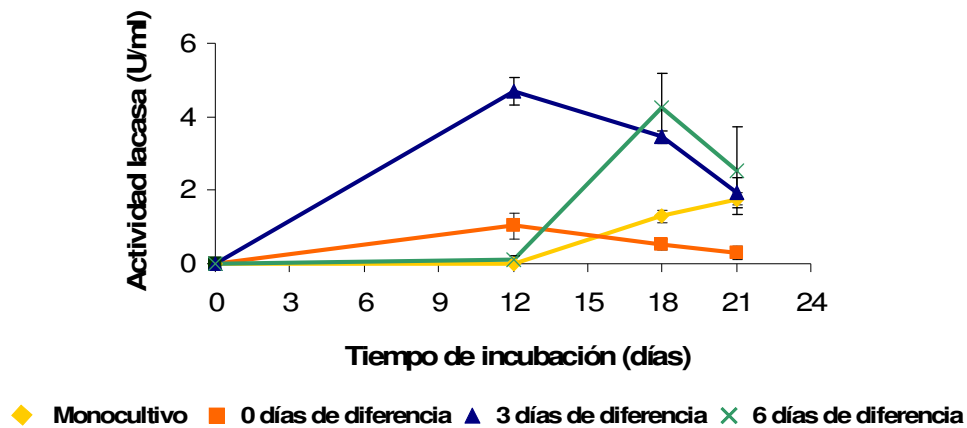


Figura 4. Actividad lacasa (U/ml) de *C. rigida* en monocultivos y cocultivos con *P. commune* en agitación e inoculado al mismo tiempo, tras 3 y 6 días de la inoculación de *C. rigida*. Las barras de error expresan la desviación estándar.

4. Purificación de la actividad lacasa de *C. rigida* en cocultivo con *P. commune*

Material y métodos

La purificación de la actividad lacasa se realizó mediante isoelectroenfoque y cromatografía de los sobrenadantes dializados y concentrados de *C. rigida* cultivado tanto individualmente como conjuntamente con *P. commune*. Para ello se utilizaron cultivos estáticos de *C. rigida* cultivados durante 21 días en monocultivo o cocultivo con *P. commune* inoculado tras 6 días de crecimiento de *C. rigida*, ya que mostraron la máxima actividad lacasa.

El punto isoeléctrico de la lacasa se determinó mediante análisis por isoelectroenfoque (zimogramas) en geles de poliacrilamida con las características descritas en el apartado general de Material y métodos (5.2.). Sin embargo, en este caso, la composición de los geles fue la siguiente:

Componente	Cantidad
Acrilamida	30%
Anfolitos	4%
Glicerol	50%
Agua milli Q	14 ml
Persulfato amónico	10%
N,N,N',N'- Tetramethylethylene- diamine (TEMED)	2,5%

Las muestras se prepararon con un tampón compuesto por: glicerol 30% (v/v), anfolitos (10%) y agua milli Q. El isoelectroenfoque se realizó en un equipo Mini-Protean II de Bio-Rad a una temperatura de 4 °C, y un voltaje variable: 100 V durante 30 min, 150 V 30 min, 200 V otros 30 min y finalmente 250 V durante 1,5-2 h. La visualización de las bandas y la determinación del gradiente del pH se realizó tal y como se describe en el apartado general de Material y métodos (5.2.).

Para la separación cromatográfica, muestras de los medios de cultivo de *C. rigida* en monocultivo y cocultivo con *P. commune* dializadas y concentradas se aplicaron a una columna Superdex 200 de alta resolución (Amersham Pharmacia Biotech HR 16/60) acoplada a un equipo AKTApurifier (Amersham Biosciences). Se siguió toda la metodología descrita en el apartado 5.4.2. de Material y métodos. Posteriormente, dichas fracciones se dializaron a través de una columna Pd 10 (Amersham Biosciences, Sephadex G-25) tal y como se indica en el apartado general de Material y métodos (5.4.3.). A continuación, 1 ml de la muestra obtenida se aplicó a una columna de intercambio iónico Mono-Q (Pharmacia HR 5/50) equilibrada previamente con tampón acetato sódico 10 mM pH 5. Las dos isoenzimas de lacasa detectadas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 250 mM durante 50 min y posteriormente con otro de 250 mM a 1 M durante 7,5 min con un flujo de 0,4 ml/min. Los picos de lacasa se agruparon, concentraron y conservaron tal y como se describe en el apartado general de Material y métodos (5.4.3.).

Resultados

4.1. Isoelectroenfoque

El zimograma de la actividad lacasa obtenido por isoelectroenfoque de las muestras de *C. rigida* en monocultivo y cocultivo con *P. commune* permitió detectar dos bandas con un pI de 3.4 y 3.6, respectivamente. Como muestra la Figura 5, se observan las mismas bandas de actividad lacasa en *C. rigida* crecido de forma individual o conjuntamente con *P. commune*.

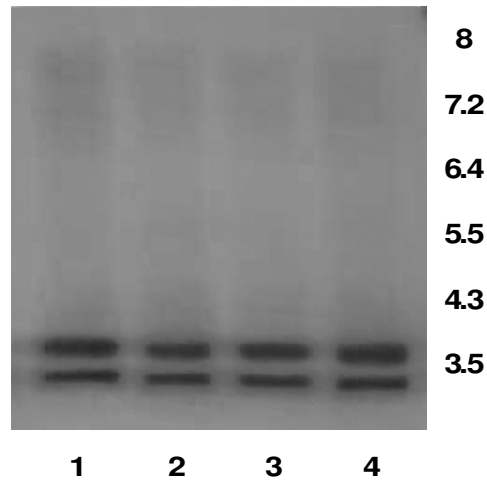


Figura 5. Isoelectroenfoque de monocultivos *C. rigida* (Columnas 1 y 2) y cocultivos de *C. rigida* y *P. commune* (Columnas 3 y 4).

4.2. Separación cromatográfica de la lacasa

4.2.1. Cromatografía de exclusión molecular

La separación cromatográfica de exclusión molecular de la lacasa de *C. rigida* producida tanto en monocultivo como cocultivo con *P. commune* determinó la presencia de un pico sin actividad lacasa y con gran absorbancia a 280 nm a los 260 min de elución que correspondería a los pigmentos e impurezas de la muestra (Figura 6A y Figura 7A). El pico mayoritario de actividad lacasa eluído a los 140 min en la separación cromatográfica tenía muy poca absorbancia a 280 nm lo que indicaba que estas fracciones con mayor actividad lacasa poseían muy poca cantidad de proteínas. Comparando las cromatografías de *C. rigida* cultivado de forma individual y conjuntamente con *P. commune* volvemos a constatar una actividad lacasa muy superior en las muestras de *C. rigida* en cocultivo (Figura 6A y Figura 7A).

4.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución

En la separación cromatográfica de intercambio aniónico de alta resolución mediante una columna MonoQ, tanto para el monocultivo como cocultivo de *C. rigida* y *P. commune*, se detectaron dos picos de actividad lacasa: Lac I y Lac II que eluyen a los mismos tiempos y concentraciones de sal (Figura 6B y 7B). Concretamente, Lac I eluye a los 48 min con una concentración del 14% de NaCl, y Lac II a los 50 min con 16% de NaCl (Tabla 3).

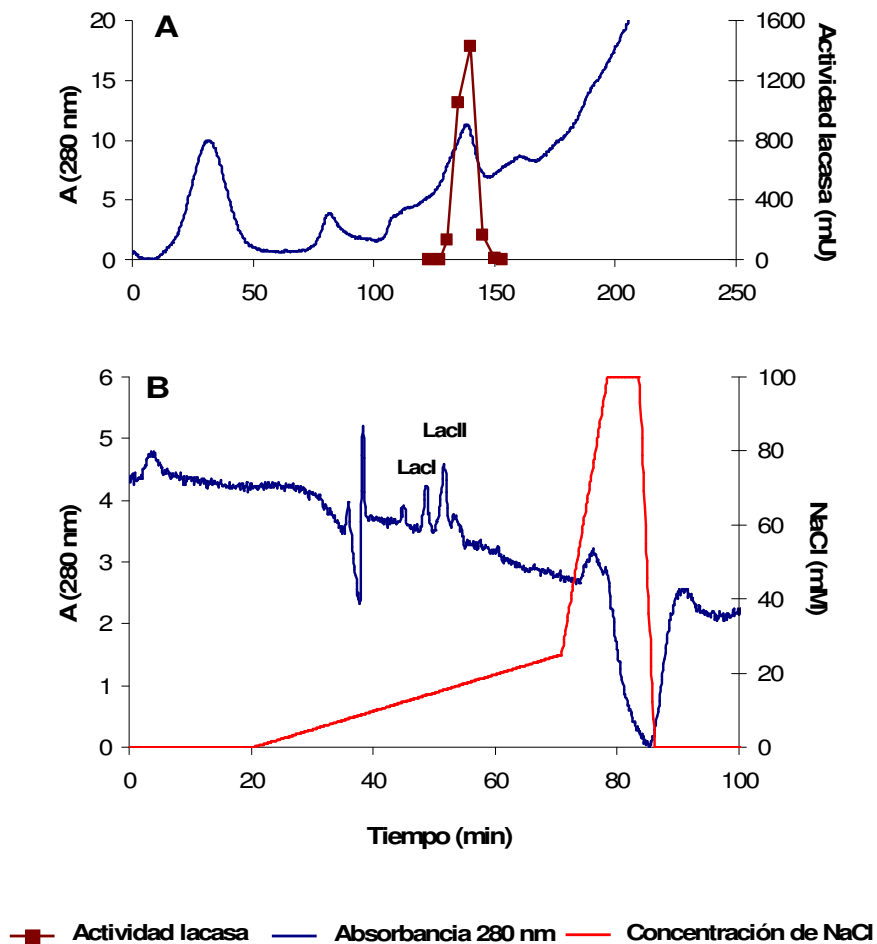


Figura 6. Perfil cromatográfico de exclusión molecular (A) y de intercambio aniónico de alta resolución (B) de *C. rigida*.

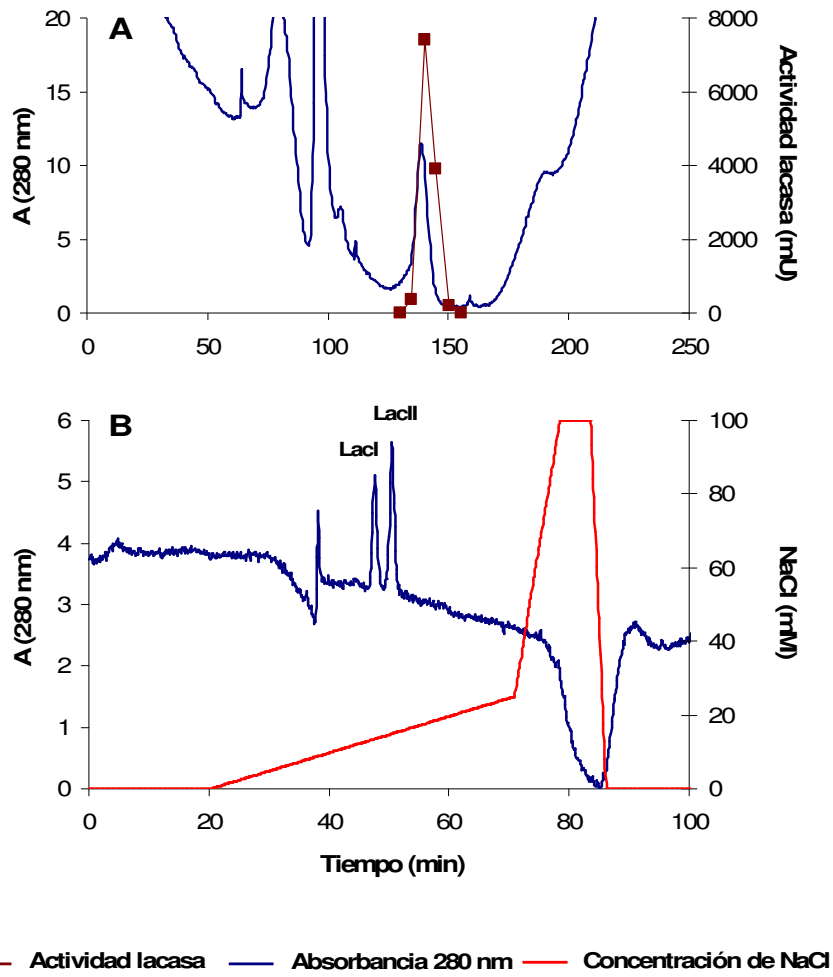


Figura 7. Perfil cromatográfico de exclusión molecular (A) y de intercambio aniónico de alta resolución (B) de *C. rigida* en cocultivo con *P. commune*.

Tabla 3. Datos relativos a los perfiles cromatográficos de exclusión molecular e intercambio anionico de las lacasas del monocultivo de *C. rigida* y cocultivo *C. rigida* y *P. commune*.

	Monocultivo <i>C. rigida</i>			Cocultivo <i>C. rigida/P. commune</i>		
	Tiempo	Volumen	% NaCl	Tiempo	Volumen	% NaCl
Cromatografía exclusión molecular	140 min	56 ml		140 min	56 ml	
Cromatografía intercambio aniónico	Lac I	Lac I	Lac I	Lac I	Lac I	Lac I
	48,67 min	19,47 ml	14,70%	47,71 min	19,09 ml	14,20%
	Lac II	Lac II	Lac II	Lac II	Lac II	Lac II
	51,55 min	20,62 ml	16,20%	50,47 min	20,19 ml	15,60%

La evaluación global del proceso de purificación en ambos tipos de cultivos determinó un rendimiento del 6 y del 6,1% para la isoenzima Lac I y del 7,5 y 7,6% para la Lac II de *C. rigida* en mono y cocultivos, respectivamente (Tablas 4 y 5). Se consiguió un grado de purificación del 2,9 para Lac I en ambos casos y del 1,71 y 2,10 para Lac II en mono y cocultivo de *C. rigida*, respectivamente (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Rendimiento del proceso de purificación de las isoenzimas de lacasa de *C. rigida* en monocultivo.

Purificación	Proteínas (mg/l)	Actividad (U/l)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Grado purificación
Medio de cultivo	114,24	13335,83	116,74	100	1
Superdex200	9,50	1923	202,41	14,42	1,73
Mono-Q (Lac I)	2,36	802	340,53	6,02	2,92
Mono-Q (Lac II)	5,07	1009	199,13	7,57	1,71
Mono-Q (Total)	7,42	1811	540	14	5

Tabla 5. Rendimiento del proceso de purificación de las isoenzimas de lacasa de *C. rigida* en cocultivo con *P. commune*.

Purificación	Proteínas (mg/l)	Actividad (U/l)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Grado de purificación
Medio de cultivo	100,76	24434,09	242,50	100	1
Superdex200	9,5	1922,90	202,41	7,87	0,83
Mono-Q (Lac I)	2,09	1500,12	715,23	6,14	2,95
Mono-Q (Lac II)	3,64	1855,91	509,92	7,60	2,10
Mono-Q (Total)	5,74	3356,03	1225,15	13,74	5,05

DISCUSIÓN

Se sabe que la actividad lacasa puede variar en función de determinados factores físicos como pH, grado de aireación o agitación del medio de cultivo (Jaouani *et al.*, 2003; Saparrat, 2004; D'Annibale *et al.*, 2006). En nuestros ensayos los valores de actividad lacasa de *C. rigida* en ausencia de cobre y en agitación fueron similares a los indicados previamente por Saparrat *et al.* (2002). Sin embargo se ha observado que en cultivos estáticos *C. rigida* produjo niveles de actividad lacasa 20 veces superiores a los descritos en condiciones de agitación. Resultados similares se observaron con *T. gallica* donde la producción de actividad lacasa también dependió de las condiciones de cultivo (Dong *et al.*, 2005). Sin embargo, en ensayos de producción de lacasa por *C. hirsitus* no se detectaron diferencias de producción de dicho enzima en función de las condiciones de cultivo (Koroleva *et al.*, 2002).

La producción de lacasa en cultivos en agitación disminuye dramáticamente respecto a los cultivos estacionarios, este fenómeno podría deberse a roturas en el micelio causadas por dicha agitación o por cambios en la morfología del hongo, tal y como observó Hess *et al.* (2002). No obstante, otros autores aducen este efecto a la desnaturalización enzimática causada por las fuerzas mecánicas generadas por la alta velocidad de los cultivos en agitación (D'Annibale *et al.*, 2006).

El cocultivo de *C. rigida* con los hongos saprobios *P. chrysogenum* 10, *P. farinosus*, *Penicillium* sp, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *F. lateritium*, *F. oxysporum* 738, *F. concolor*, *F. graminearum* y *M. racemosus* permitió observar que determinados hongos inducían la actividad lacasa de *C. rigida*. Se sabe que la producción de lacasa por determinados hongos puede activarse biológicamente por la presencia en el cultivo de otros hongos de la podredumbre blanca (Iakovlev y Stenlid, 2000). Por ello en nuestros ensayos se seleccionó *Penicillium* sp. como hongo inductor de la lacasa de *C. rigida*, ya que alcanzó una gran actividad tras 12 días de cultivo. El estudio molecular de *Penicillium* sp. para determinar la especie concluyó que se trataba de *P. commune*. Este hongo es de los más extendidos y fácilmente aislables de materias primas agrícolas y productos alimenticios (Lund, 1995; Sosa *et al.*, 2002) y posee gran capacidad para la hidrolización y condensación de taninos como fuente de carbono (Aguilar *et al.*, 2004; Cruz-Hernández *et al.*, 2005) por lo que se ha aplicado en la decoloración de tintes (Abd El-Rahim, 2006).

En nuestro estudio queda patente el aumento de producción de lacasa del hongo *C. rigida* cuando éste se cultiva en presencia de *P. commune*. La mayor producción de lacasa en los cocultivos se consiguió en condiciones estáticas y con una diferencia de inoculación de seis días entre *C. rigida* y *P. commune*, llegando a alcanzarse niveles de actividad lacasa 3 veces superior respecto al monocultivo de *C. rigida* en condiciones estáticas y 30 veces superior al monocultivo en agitación. Se ha descrito que la mezcla de hongos en un mismo medio de cultivo puede dar lugar a una mayor producción de enzimas ligninolíticas, aunque el resultado final parece depender de las especies y las condiciones nutricionales específicas que se utilicen (Chi *et al.*, 2007). Además, se tienen evidencias que sugieren que la competencia por espacio y nutrientes determinan una mayor degradación de lignina y producción de enzimas ligninolíticas como la lacasa (Sundman y Nåse, 1972; Freitag y Morrel., 1992; White y Boddy, 1992; Asiegbu *et al.*, 1996; Score *et al.*, 1997; Iakovlev y Stenlid, 2000; Savoie *et al.*, 2001; Baldrian, 2004).

C. rigida produce lacasa como única enzima ligninolítica y en determinadas condiciones de cultivo esta producción es superior a las encontradas en otros hongos. De hecho se ha observado que utilizando lignina *kraft*, subproducto de la industria papelera considerado como uno de los

inductores más eficaces, se obtienen actividades entre 4-8 U/l por el hongo *Trametes sp* (Xiao *et al.*, 2003) También se ha descrito que usando metales pesados por ejemplo el Cu^{2+} como inductor del hongo *Trametes sp.* se obtienen valores de actividad lacasa no superiores a 3,5 U/l (Xiao *et al.*, 2003). Sin embargo, en *C. rigida* se ha observado que utilizando como inductores una mezcla de fenoles se obtienen valores de actividad lacasa no superiores a 200 U/l (Saparrat *et al.*, 2010) y con metales pesados, por ejemplo el Cu^{2+} , como inductor se obtienen valores de 7.000 U/l (Saparrat *et al.*, 2002), que pueden incrementarse a 30.000 U/l después de 30 días de cultivo si se añade salvado de cebada al medio de cultivo además de cobre (Gómez *et al.*, 2006). Nuestros resultados muestran que los niveles de producción de lacasa de *C. rigida* cultivado estacionariamente y en presencia de *P. commune* inoculado con 6 días de diferencia respecto a *C. rigida* llegan a producir 60.000 U/l de actividad lacasa, valores que son muy superiores a los descritos en otros trabajos con inductores químicos y bajo condiciones de agitación. Este hecho supone una gran ventaja pues el incremento de lacasa mediante la utilización de compuestos fenólicos y/o metales pesados puede ocasionar graves problemas medioambientales (Zhang *et al.*, 2006). Por tanto, la modificación de las condiciones de cultivo y la presencia de un inductor biológico es una estrategia eficaz para incrementar la producción de actividad lacasa, imprescindible para el uso de estos hongos en biorremediación sin necesidad de recurrir al uso de inductores químicos. Se han descrito inducciones biológicas también interesantes, como en el trabajo realizado por Griffith *et al.* (1994) donde se observó un incremento de la producción de lacasa del hongo *Hypholoma fasciculare* mediante el cocultivo con la bacteria *Bacillus subtilis*. También se ha descrito que la producción de lacasa por *P. ostreatus* (Velázquez-Cedeño *et al.*, 2004) y *Trametes sp.* AH28-2 (Zhang *et al.*, 2006) se mejora mediante el cocultivo con *Trichoderma*, aunque hay que tener en cuenta que este hongo no siempre induce biológicamente la producción de lacasa de otros hongos (Savoie *et al.*, 2001). Sin embargo, los niveles de producción de lacasa obtenidos en nuestros ensayos con *P. commune* como inductor biológico de la actividad lacasa de *C. rigida* son muy superiores a los observados en estas investigaciones.

La lacasa de *C. rigida* crecida en presencia de *P. commune* mostró dos bandas con pl ácido (3.4 y 3.6, respectivamente) que se encuentran dentro del rango descrito para lacasas de otros hongos de la podredumbre blanca (2.6-6.9) como *P. eryngii*, *P. ostreatus* o *P. cinnabarinus* (Palmieri *et al.*, 1993; Eggert *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1997b; Saparrat *et al.*, 2008; Baldrian *et al.*, 2009). Este valor de pl es similar al detectado para las dos isoenzimas de lacasa de *C. rigida*, identificadas previamente en esta Memoria Doctoral, en presencia y ausencia de alpeorajo (pl 3.3 y 3.4 para Lacl y LaclI, respectivamente).


Se sabe que las diferentes condiciones de cultivo o el crecimiento del hongo en condiciones de cocultivo pueden inducir la expresión de nuevas isoenzimas de lacasa (Giardina *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Dantán-González *et al.*, 2008). En nuestro caso, los resultados de las cromatografías de exclusión molecular e intercambio aniónico muestran cómo las dos isoformas (Lacl y LaclI) que produce *C. rigida* en cocultivo con *P. commune* son las mismas que en condiciones de monocultivo. Sin embargo, la actividad específica detectada fue mayor en cocultivos que en monocultivos. Probablemente, este hecho pueda deberse a las diferentes condiciones de cultivo de las cepas o a diferencias en las propiedades catalíticas entre las lacasas de un mismo organismo como se ha descrito en *P. sanguineus* (Dantán-González *et al.*, 2008) y *P. tigrinus* (Quaratino *et al.*, 2008b).

Por tanto, se pone de manifiesto un nuevo sistema de producción de actividad lacasa mediante el cultivo conjunto del hongo ligninolítico *C. rigida* con el hongo saprobio *P. commune* en condiciones estáticas de incubación. Mediante este sistema se consiguen los niveles de actividad enzimática más altos hasta ahora descritos y evita el uso de inductores químicos que suponen un riesgo medioambiental, debido a su efecto tóxico, además de abaratar y acortar el proceso de producción.



Capítulo 5

Tratamiento del
extracto acuoso de
alpeorujó por lacasa



CAPÍTULO 5

TRATAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE ALPEORUJO POR LACASA

Objetivo general

Los compuestos fenólicos del alpeorujo son los principales responsables de la toxicidad de este residuo (Aranda *et al.*, 2007). Por tanto, para evitar los efectos contaminantes del alpeorujo, se necesita un tratamiento previo a su utilización como fertilizante orgánico, que garantice la reducción del contenido fenólico de dicho residuo. Se ha descrito el posible uso de hongos ligninolíticos en la biorremediación de alpeorujo (Sampedro *et al.*, 2007a), debido principalmente a su capacidad para reducir el contenido fenólico del mismo, aunque, se sabe que para ello se necesitan periodos de incubación bastante largos, lo que supone un gran inconveniente para este tipo de procesos. La utilización de enzimas extracelulares en los procesos de biorremediación permite acortar los tratamientos respecto a procesos de compostaje o fermentación de tales residuos (Rodríguez Couto y Toca Herrera, 2006).

En este capítulo se describen los experimentos llevados a cabo para optimizar la reducción de la toxicidad del extracto acuoso de alpeorujo por la lacasa de *C. rigida* y determinar el papel que tiene dicha enzima en este proceso. Asimismo, para conocer la eficacia de la lacasa producida por *C. rigida* en dicho proceso de biorremediación del alpeorujo, se procedió al tratamiento del residuo con diferentes tipos de esta enzima.

1. Condiciones experimentales del tratamiento de extracto acuoso de alpeorujó por lacasa

Material y métodos

Para la producción de actividad lacasa de *C. rigida*, el hongo se cultivó a 28 °C en matraces de 250 ml que contenían 70 ml de medio líquido de glucosa-extracto de levadura en un agitador a 150 rpm durante 7 días. Posteriormente, el micelio se homogeneizó con Ultra Turrax (Ika-Werk Alemania) y la suspensión se utilizó como inóculo del medio MB al que se añadieron 10 g/l de glucosa y 300 µM de cobre como inductores de la actividad lacasa. En este medio, *C. rigida* se incubó durante 9 días a 28 °C en oscuridad y sin agitación. El medio de cultivo resultante, considerado como medio rico en actividad lacasa, se utilizó para tratar el extracto acuoso de alpeorujó.

El tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó con el medio de cultivo de *C. rigida* rico en actividad lacasa, se llevó a cabo a diferentes diluciones y temperaturas. El extracto acuoso de alpeorujó se diluyó en tubos de ensayo hasta un 50, 25 y 10% con agua y medio de cultivo de *C. rigida* con alta concentración de actividad lacasa en un volumen de 6 ml y con una concentración final de lacasa de 1 U/ml. La incubación se llevó a cabo en baños termostatzados a 28, 37 y 60 °C durante 5 días. Se recogieron muestras para las determinaciones posteriores a los 0, 2 y 5 días. Se realizaron los respectivos controles sin actividad lacasa y con lacasa inactivada por choque térmico tal y como se describe anteriormente.

De cada una de las muestras recogidas se analizaron las unidades colorimétricas, fenoles, actividad lacasa y fitotoxicidad según la metodología descrita en el apartado general de Material y métodos (4.3., 4.6., 4.1., 10.1.).

Resultados

Color

Tal y como puede observarse en la Figura 1 no se detectó aumento de color tanto en los controles sin lacasa como con lacasa inactiva en ninguno de los tratamientos ensayados. Los tratamientos realizados con lacasa activa en muestras de ADOR al 10 y 25% mostraron diferencias en el nivel de color en comparación con sus respectivos controles sólo en algunos casos concretos de temperatura y tiempo de incubación (Figura 1 II y III). Sin embargo, la determinación de las unidades colorimétricas (UC) del extracto acuoso de alpeorujó al 50% tratado con extracto de lacasa de *C. rigida* producida en medio MB con glucosa y cobre, mostró un aumento significativo a todas las temperaturas ensayadas (Figura 1 I).

Concretamente, la incubación del ADOR al 50% a 60 °C de temperatura, produjo similar incremento de color a los 2 y 5 días de tratamiento (Figura 1 IC). La incubación a 28 °C, sin embargo, produjo mayor aumento de las UC a los 2 que a los 5 días de incubación (Figura 1 IA). El máximo aumento en la coloración del residuo se consiguió en el tratamiento realizado a 37 °C con extracto acuoso de alpeorujó al 50% tras 5 días de incubación, llegando a alcanzarse 44489 UC (Figura 1 IB).

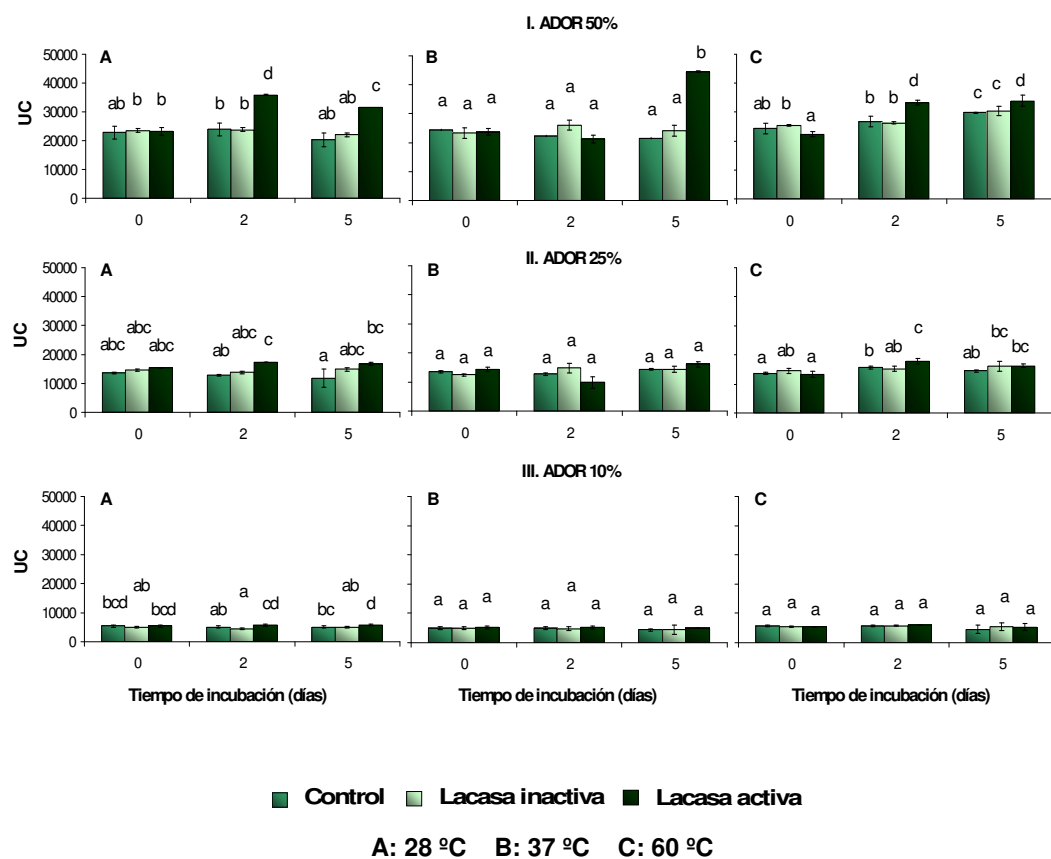


Figura 1. Unidades colorimétricas (UC) en ADOR a diferentes diluciones (50, 25 y 10%) tratado con lacasa de *C. rigida* producida en medio MB con glucosa y cobre durante 0, 2 y 5 días a 28, 37 y 60 °C. Las letras distintas en cada barra para cada temperatura de tratamiento del ADOR indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Fenoles

Se observó que la concentración de fenoles permanece inalterable durante todo el tratamiento tanto en los controles incubados sin actividad lacasa como en los que contenían lacasa inactiva por choque térmico (Figura 2).

La determinación del contenido fenólico del ADOR tratado con 1 U/ml de lacasa de *C. rigida* producida en medio MB con glucosa y cobre a diferentes temperaturas y diluciones mostró un descenso paulatino en la mayoría de los casos, observándose los mejores resultados con concentraciones bajas de

extracto acuoso de alpeorajo. Los mayores descensos en el contenido de fenoles de ADOR se consiguieron a 37 °C de incubación. Así, el tratamiento de extracto acuoso de alpeorajo diluido al 25% a una temperatura de 37 °C consiguió un 77,9 y un 92,6% de reducción del contenido fenólico respecto al control sin lacasa, a los 2 y 5 días de incubación, respectivamente (Figura 2 IIB).

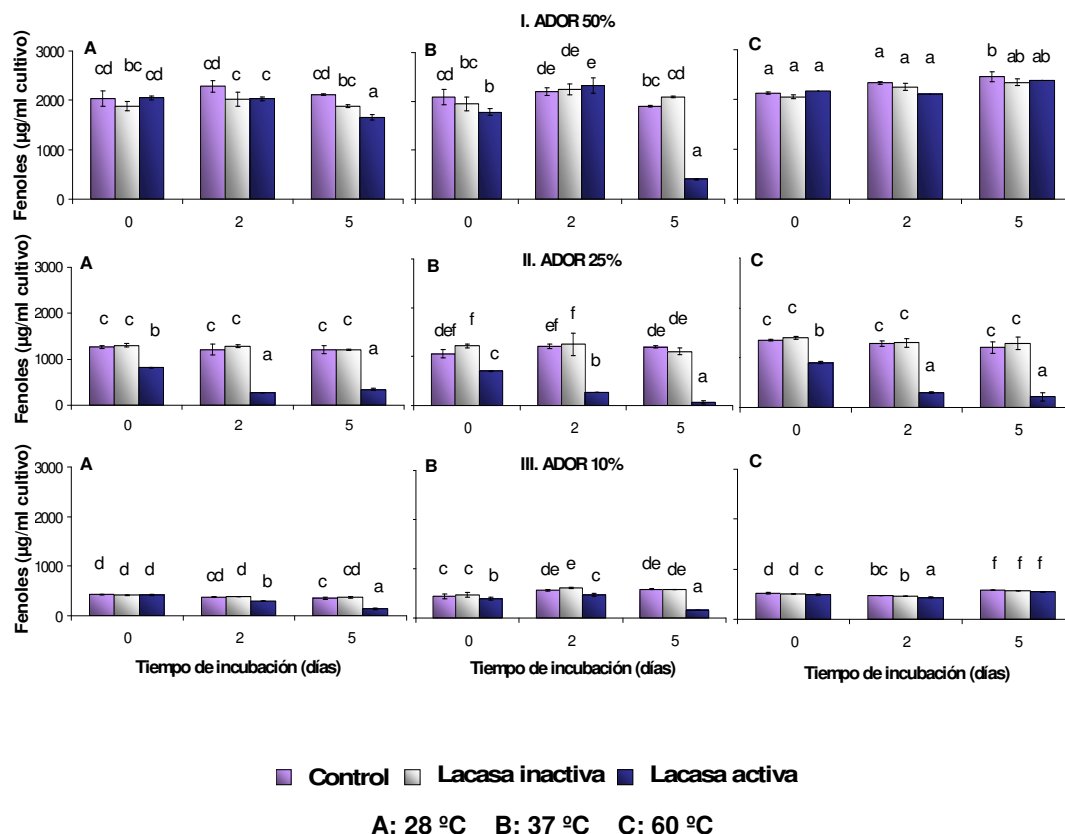


Figura 2. Contenido en polifenoles totales extractables (μg fenoles/ml cultivo) en ADOR a diferentes diluciones (50, 25 y 10%) tratado con lacasa de *C. rigida* producida en medio MB con glucosa y cobre durante 0, 2 y 5 días a 28, 37 y 60 °C. Las letras distintas en cada barra para cada temperatura de tratamiento del ADOR indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Actividad lacasa

Ante la presencia de concentraciones elevadas de extracto acuoso de alpeorujo 50 y 25%, la actividad lacasa se mantuvo más estable a los dos días de incubación del residuo a 60 °C, manteniendo un 90 y 76% de actividad respectivamente (Figura 3). Sin embargo, esta actividad no se mantuvo en el tiempo ya que tras 5 días de tratamiento se observaron sólo niveles de 8,4 y 0,5% respectivamente. No obstante, la actividad lacasa de *C. rigida* en las diluciones de 50 y 25% incubadas a 28 y 37 °C, aunque fue menor a los dos días de incubación que en el tratamiento a 60 °C, se mantuvo más estable a lo largo del proceso de incubación. La mayor estabilidad de la actividad lacasa a lo largo de los cinco días de incubación se consiguió en el tratamiento del ADOR al 50 y 25% a 37 °C, con un 27,5 y 20,4% de actividad en dichas diluciones, respectivamente (Fig 3A y B). La actividad lacasa de *C. rigida* en los tratamientos con 10% de ADOR sólo mantuvo un 20% de actividad tras dos días de incubación a 28 °C (Figura 3C).

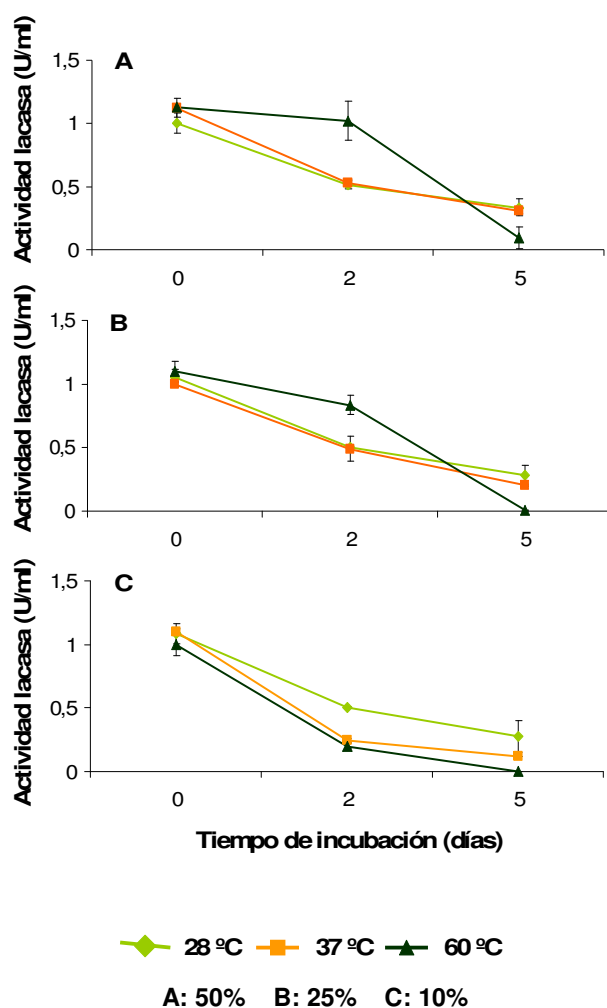


Figura 3. Actividad lacasa (U/ml) en ADOR a diferentes diluciones (50, 25 y 10%) tratado con lacasa de *C. rigida* producida en medio MB con glucosa y cobre durante 0, 2 y 5 días a 28, 37 y 60 °C. Las barras de error expresan la desviación estándar.

Fitotoxicidad

El ADOR control y el incubado con enzima inactiva tuvieron marcados efectos fitotóxicos a las concentraciones de 25 y 50%. La dilución del 10% del residuo no fue fitotóxica para las semillas de berro ya que superaron el 60% de germinabilidad, límite que marca la toxicidad de una sustancia para la planta

según diversos autores. Se pone de manifiesto que la fitotoxicidad del residuo se incrementa conforme aumenta la concentración del mismo (Figura 4).

La concentración de extracto acuoso de alpeorujo del 50% sin tratar con lacasa activa produjo prácticamente la total inhibición de la germinación de las semillas de *L. sativum* (Figura 4 I). La aplicación de lacasa del hongo *C. rigida* producida en medio MB con glucosa y cobre tras 5 días de tratamiento a 28° fue el tratamiento más efectivo ya que produjo un aumento significativo de la germinabilidad del 55% aproximadamente (Figura 4 IA). La incubación de ADOR al 25% con medio de cultivo de lacasa de *C. rigida* a 37 °C durante 2 días mostró un efecto potenciador de la germinación cercano al 50%, incremento que se redujo al aumentar el tiempo de incubación (Figura 4 IIB). A pesar de su ausencia de fitotoxicidad, el extracto de ADOR diluido al 10% tratado con extracto de lacasa a 28 y 60 °C de temperatura, produjo aumento del índice de germinabilidad respecto a su control tras dos días de tratamiento (Figura 4 III).

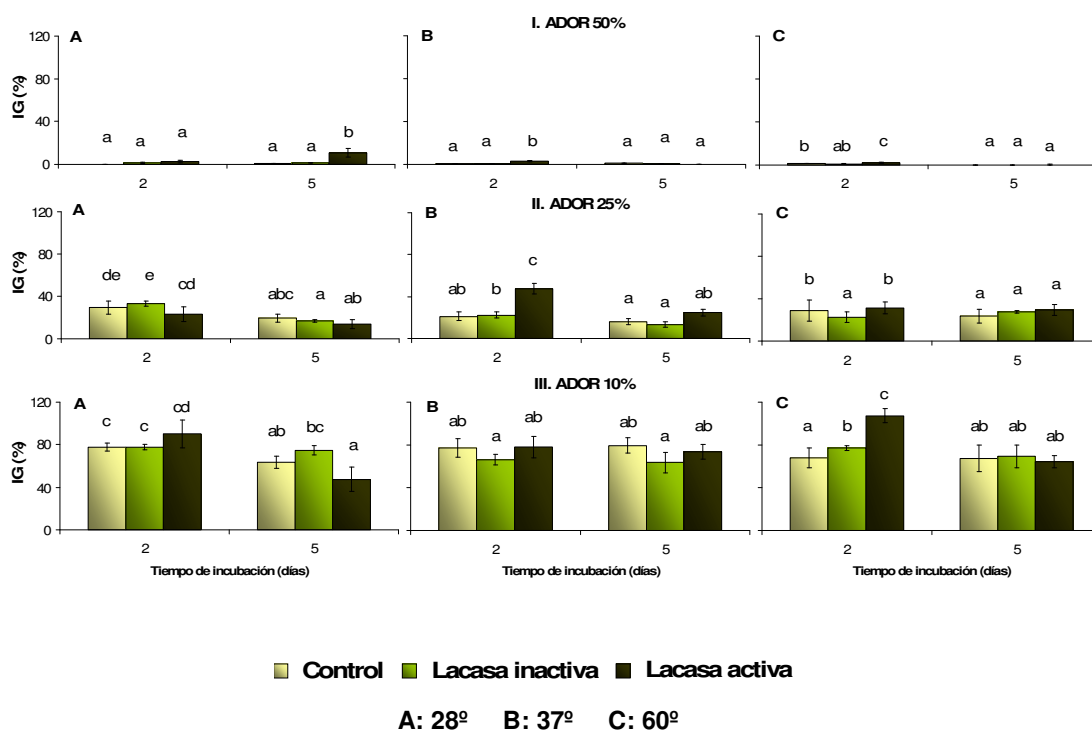


Figura 4. Índice de germinabilidad (%IG) del ADOR a diferentes diluciones (50, 25 y 10%) tratado con lacasa de *C. rigida* producida en medio MB con glucosa y cobre durante 0, 2 y 5 días a 28, 37 y 60 °C. Las letras distintas en cada barra para cada temperatura de tratamiento del ADOR indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tras este ensayo se puso de manifiesto que el mayor descenso de fenoles y fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó se obtuvo tras el tratamiento del mismo diluido al 25% durante dos días de incubación con extracto de lacasa activa a 37 °C de temperatura. Bajo estas condiciones se demostró que se producía un descenso en la concentración de fenoles del residuo que se correspondió con un aumento del índice de germinabilidad respecto a los controles sin lacasa o con enzima inactiva. Se seleccionaron, por tanto, tales condiciones como las óptimas para la biorremediación enzimática del alpeorujó con actividad lacasa.

2. Tratamiento de extracto acuoso de alpeorujo por distintas lacasas

Material y métodos

Para este experimento se utilizaron varios tipos de lacasa: comercial de *T. versicolor*, semipurificada de *C. rigida* y producida en el cocultivo de *C. rigida* y *P. commune*. La lacasa comercial de *T. versicolor* (Fluka) se preparó en una solución en agua milliQ, preparada extemporáneamente, y se esterilizó por filtración con filtros Millipore de 0,2 µm de tamaño de poro. La lacasa semipurificada de *C. rigida* se obtuvo mediante cromatografía de exclusión molecular siguiendo la metodología descrita anteriormente en el proceso de purificación de dicha enzima. Además, también se utilizó muestras del cocultivo en medio MB con 10 g/l de glucosa de *C. rigida* y *P. commune* crecido durante 21 días en condiciones estáticas, con un desfase de inoculación de *P. commune* de 6 días respecto a *C. rigida* con niveles elevados de actividad lacasa.

El ADOR diluido al 25% se incubó en baños termostatzados a 37 °C durante 2 días con 1 U/ml de lacasa comercial de *T. versicolor* o semipurificada de *C. rigida*. En el caso de lacasa producida en cocultivos de *C. rigida* con *P. commune* y sus respectivos monocultivos controles, se usó también 1 ml pero sin ajustar las unidades en el caso del cocultivo con objeto de poder comparar la eficacia de la productividad de la lacasa de *C. rigida* por unidad de volumen en condiciones de mono y cocultivo.

Tras el periodo de incubación al medio de cultivo se le determinaron las unidades colorimétricas, el contenido fenólico, la actividad lacasa, y la fitotoxicidad siguiendo los protocolos descrito en el apartado general de Material y métodos (4.3., 4.6., 4.1., 10.1.).

Resultados

2.1. Tratamiento de extracto acuoso de alpeorujó con lacasa comercial de *T. versicolor*

La aplicación de lacasa comercial de *T. versicolor* a extracto acuoso de alpeorujó produjo un aumento significativo del color tras dos días de incubación (Figura 5A).

Asimismo, en el estudio sobre el contenido fenólico del extracto acuoso de alpeorujó tras el tratamiento con esta lacasa comercial, se observó un 53,6% de reducción del mismo (Figura 5B).

Tras el tratamiento del ADOR diluido al 25% con lacasa comercial de *T. versicolor* bajo las condiciones de incubación seleccionadas como óptimas se pudo observar la baja estabilidad de la enzima a lo largo del tratamiento, llegando a mantener sólo un 14,5% de actividad (Figura 5C).

El ensayo sobre la fitotoxicidad del residuo señaló que el tratamiento del alpeorujó con lacasa comercial de *T. versicolor* se tradujo en un aumento en el índice de germinabilidad del 61,6% tras dos días de tratamiento (Figura 5D).

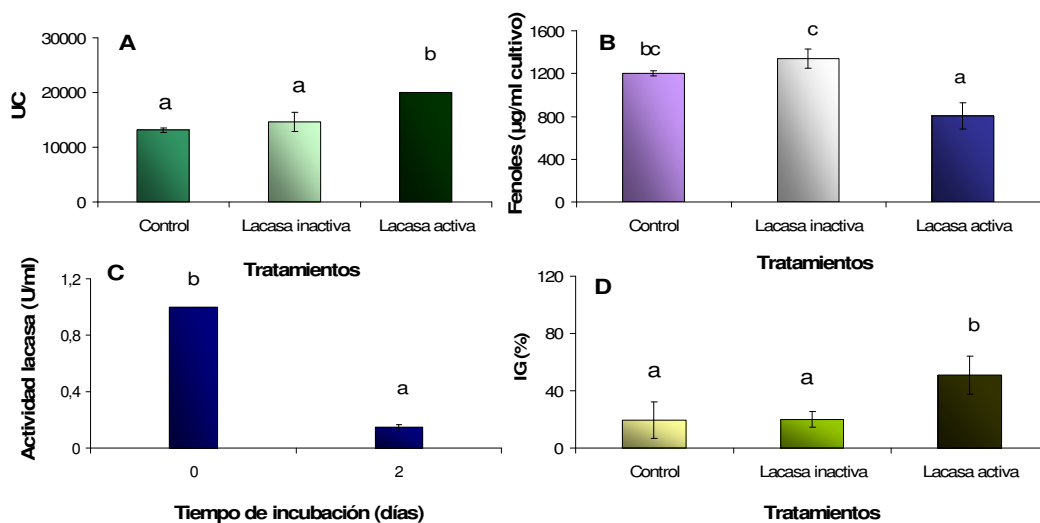


Figura 5. Unidades colorimétricas (A), contenido fenólico (B), actividad lacasa (C) e índice de germinabilidad (D) del ADOR diluido al 25% tratado con lacasa comercial de *T. versicolor* durante 2 días a 37 °C. Las letras distintas en cada barra para cada parámetro estudiado indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

2.2. Tratamiento de extracto acuoso de alpeorujó con lacasa del cocultivo de *C. rigida* con *P. commune*

Tras la incubación durante dos días a 37 °C de ADOR diluido al 25% con medio de cultivo de *C. rigida*, *P. commune* y el cocultivo de ambos se observó un aumento de unidades colorimétricas en todos los tratamientos realizados. Dicho incremento fue similar en el tratamiento con medio de cultivo de *C. rigida* y del cocultivo *C. rigida/P. commune*. Se obtuvo la máxima coloración del residuo tras el tratamiento con el monocultivo de *P. commune* (Figura 6A).

El análisis del contenido fenólico de extracto acuoso de alpeorujó incubado con los medios de cultivo de los diferentes hongos mostró que el *P. commune* no produjo disminución de dicho contenido respecto al ADOR control. Sin embargo, el tratamiento de dicho residuo con el medio de cultivo de *C. rigida* y el del cocultivo de *C. rigida* con *P. commune*, supuso una reducción similar del contenido fenólico del residuo, concretamente, del 74,4 y 76,4%, respectivamente (Figura 6B).

La incubación de ADOR diluido al 25% con 1 ml de mono o cocultivo de *C. rigida* con *P. commune* mostró mayor actividad lacasa en el cocultivo respecto a los monocultivos de *C. rigida*, tal y como se indicó anteriormente en el capítulo 4 de la presente Memoria Doctoral. No se detectó actividad lacasa en el monocultivo del hongo *P. commune*. Tanto en el tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó al 25% con lacasa de monocultivo de *C. rigida* como del cocultivo *C. rigida* y *P. commune* a 37 °C durante dos días, se observó similar estabilidad de la actividad enzimática (Figura 6C).

Los resultados de nuestros ensayos mostraron un alto índice de fitotoxicidad del ADOR, que se constató por la drástica disminución del índice de germinabilidad de *L. sativum* (Figura 6D). Los medios de cultivo de *P. commune* no produjeron modificaciones en la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó. Por el contrario, sí se observó una reducción significativa de la fitotoxicidad del residuo respecto a sus controles cuando éste se trató con la lacasa del monocultivo de *C. rigida* ya que la germinabilidad aumentó hasta un 85,7% respecto al control. No obstante, la mayor reducción de fitotoxicidad se obtuvo en el tratamiento del ADOR con la lacasa producida en el cocultivo de

C. rigida y *P. commune*, ya que en este caso, el índice de germinabilidad aumentó en un 91,5% respecto al control sin tratar (Figura 6D).

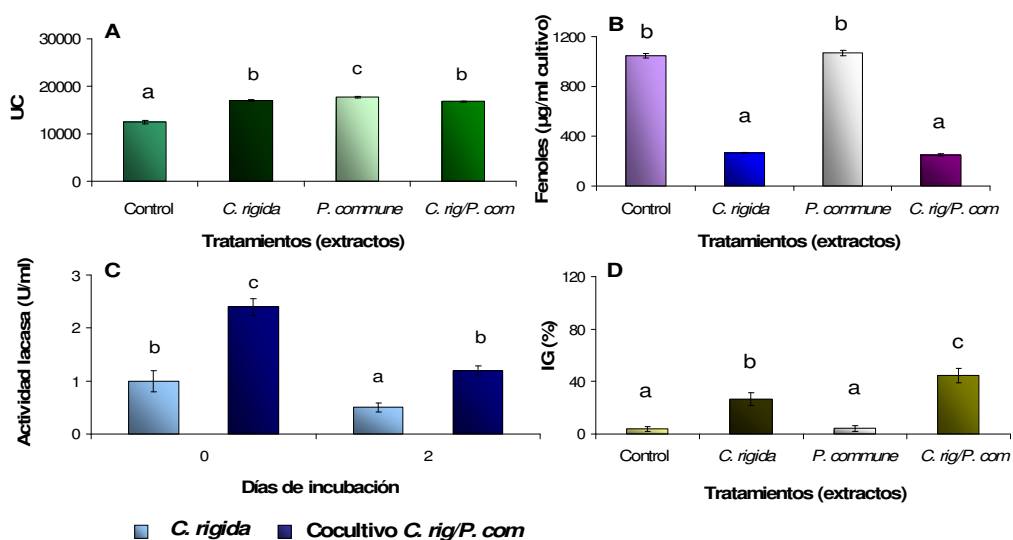


Figura 6. Unidades colorimétricas (A), contenido fenólico (B), actividad lacasa (C) e índice de germinabilidad (D) del ADOR diluido al 25% tratado con monocultivo de *C. rigida*, *P. commune* y cocultivo de *C. rigida* y *P. commune* durante 2 días a 37 °C. Las letras distintas en cada barra para cada parámetro estudiado indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Por otro lado, el análisis de regresión entre el porcentaje de germinación de las semillas de *L. sativum* y el contenido fenólico del extracto acuoso de alpeorujó mostró una correlación negativa ($r = -0,94$; $P = 0,01$).

2.3. Tratamiento de extracto acuoso de alpeorujó con lacasa semipurificada de *C. rigida*

El tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó diluido al 25% con lacasa semipurificada de *C. rigida* no produjo cambios en la coloración respecto a los controles tras 2 días de tratamiento a 37 °C (Figura 7A).

Sin embargo, esta actividad lacasa mostró un descenso significativo del contenido fenólico del extracto acuoso de alpeorujó, concretamente un 57,5% (Figura 7B).

La actividad lacasa semipurificada de *C. rigida* mantuvo un 37,5% de actividad residual tras dos días de incubación (Figura 7C).

En el estudio de la fitotoxicidad del extracto acuoso de alperujo tras su tratamiento con lacasa semipurificada de *C. rigida* se detectaron índices de germinabilidad muy bajos, concretamente se obtuvieron valores de 3,52 y 1,48 en el ADOR incubado con lacasa semipurificada inactiva y con lacasa semipurificada activa, respectivamente. Mediante estos resultados se pudo comprobar cómo el tampón en el que se realiza la purificación resultó tóxico para el crecimiento de semillas de *L. sativum*.

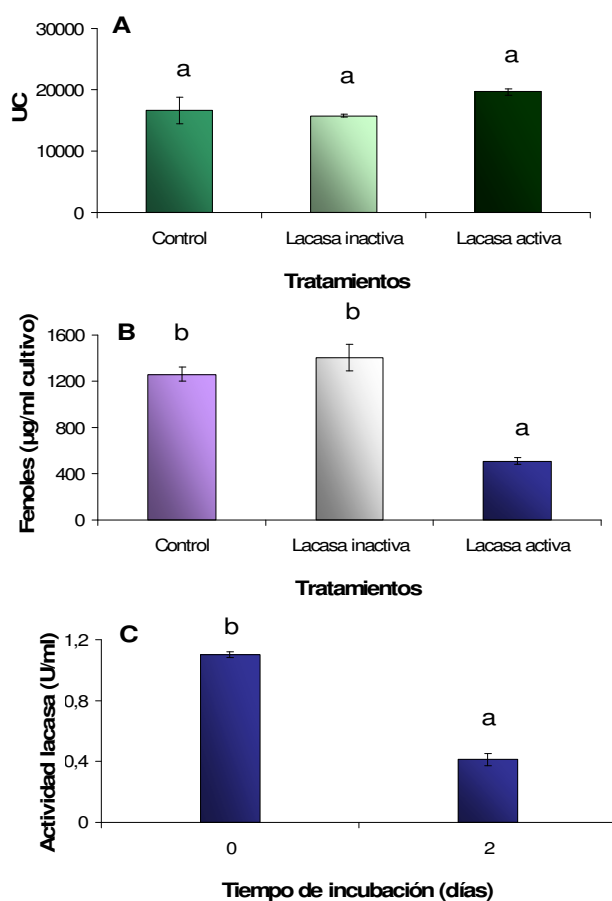


Figura 7. Unidades colorimétricas (A), contenido fenólico (B) y actividad lacasa (C) del ADOR diluido al 25% tratado con lacasa semipurificada de *C. rigida* durante 2 días a 37 °C. Las letras distintas en cada barra para cada parámetro estudiado indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

3. Efecto de la lacasa del cocultivo de *C. rigida* con *P. commune* en la microtoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó

Material y métodos

Para la determinación de la microtoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó tratado durante 2 días a 37 °C con medios de *C. rigida* y *P. commune* en monocultivo o en cocultivo tal y como se describe anteriormente en el capítulo 4 de la presente Memoria Doctoral, se usó la bacteria *A. brasiliense*. Una alícuota de la suspensión bacteriana se inoculó en ADOR sin tratar o previamente tratado con el medio de cultivo de *C. rigida* crecido tanto en monocultivo como en cocultivo con *P. commune* y se incubó en agitación (500 rpm) a 37 °C durante 24 h. La supervivencia relativa de la bacteria en ADOR sin tratar y tratado con medio de cultivo de *C. rigida* crecido en monocultivo o cocultivo con *P. commune* se evaluó siguiendo la metodología descrita en el apartado 10.2. de Material y métodos.

Resultados

Nuestros ensayos indicaron una alta microtoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó ya que la aplicación de este residuo al 25% inhibió totalmente el crecimiento de la bacteria *A. brasiliense* (Figura 8). La incubación del ADOR con el medio de cultivo de *C. rigida* no redujo la microtoxicidad del residuo, sin embargo, el medio de cultivo de *P. commune* sí permitió el crecimiento de la bacteria de estudio. La mayor reducción de microtoxicidad se detectó cuando el extracto acuoso de alpeorujó se incubó con el medio del cocultivo de *C. rigida* y *P. commune* ya que se observó un crecimiento de $3,73 \cdot 10^5$ UFC/ml (Figura 8).

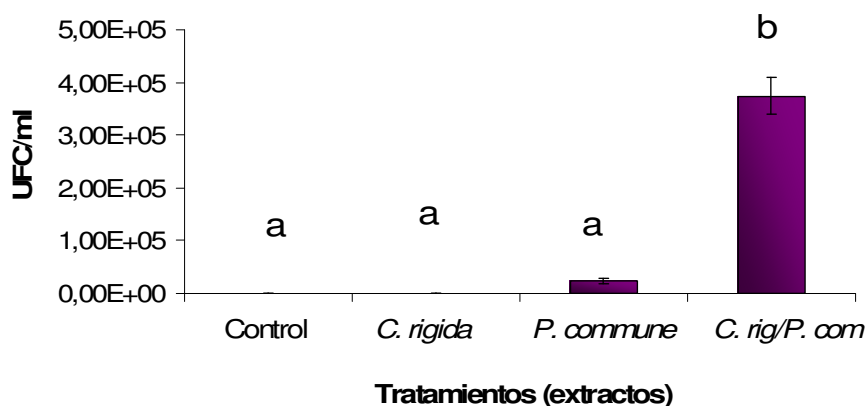


Figura 8. Supervivencia de *A. brasiliense* después de 24 horas de incubación en ADOR con extracto de *C. rigida* y *P. commune* crecidos tanto en monocultivo como en cocultivo. Las letras distintas en cada barra indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

En este estudio se plantea la biorremediación del extracto acuoso de alpeorujos mediante la lacasa del medio de cultivo de *C. rigida*, ya que se ha demostrado en estudios previos así como en los capítulos 1 y 3 de la presente Memoria, que este hongo sólo produce lacasa como enzima ligninolítica aún en presencia de peptona, reconocido inductor de actividades peroxidásicas (Saparrat *et al.*, 2002; Jaouani *et al.*, 2005).

Diversos estudios demuestran que la fitotoxicidad de los residuos de la industria del aceite de oliva, debida principalmente a sus componentes fenólicos, es especialmente severa durante la germinación y desarrollo de las semillas (Krogmeier y Bremner, 1989; Bonanomi *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la toxicidad de los fenoles en plantas superiores es debida a alteraciones en la absorción de agua o en el metabolismo de auxinas y/u otras fitohormonas (Lyu y Blum, 1990). Por tanto, en nuestros ensayos se midió la fitotoxicidad del alpeorujos mediante el estudio del índice de germinación en semillas de *L. sativum* ya que está descrita como una de las más sensibles al efecto fitotóxico de este tipo de residuos (Bonanomi *et al.*, 2006). Nuestros resultados mostraron una evidente relación entre la concentración del residuo y la

inhibición de la germinación, de hecho los extractos acuosos de alpeorujo diluidos al 25 y 50% disminuyeron drásticamente la germinación del berro y concentraciones bajas del mismo no mostraron fitotoxicidad. Este hecho se ha observado también con otros residuos de aceite de oliva como el alpechín, donde sólo las diluciones superiores a 1:8 no se consideraron fitotóxicas (Casa *et al.*, 2003).

En nuestros ensayos se puso de manifiesto que el mayor descenso de fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujo tuvo lugar tras el tratamiento del mismo, diluido al 25%, durante dos días de incubación a 37 °C con medio de cultivo de *C. rigida* con actividad lacasa. Se seleccionaron, por tanto, tales condiciones como las óptimas para los estudios de biorremediación de este residuo mediante enzima lacasa. Bajo estas condiciones se demostró que la lacasa parece ser la principal responsable de la disminución de la fitotoxicidad del ADOR. Si bien, el proceso de purificación de la lacasa producida por *C. rigida* no nos permitió determinar su efecto sobre la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujo, el hecho de que tanto la lacasa comercial de *T. versicolor* como el extracto de lacasa de cultivos de *C. rigida* incrementaran el índice de germinabilidad de las semillas de berro en presencia de ADOR, apoya la idea del papel de esta enzima en la disminución de la fitotoxicidad del alpeorujo.

La incubación del extracto acuoso de alpeorujo diluido al 25% con 1 U/ml de medio de *C. rigida* producida en medio MB con glucosa y cobre durante 2 días a 37 °C, mostró una gran reducción del contenido fenólico del residuo. La biorremediación enzimática de residuos del olivar mediante su incubación con lacasa de hongos de la podredumbre blanca produce un descenso significativo en la concentración fenólica de estos subproductos. Así, Casa *et al.* (2003) consiguió una reducción del 65% en el contenido de fenoles totales del alpechín tras la incubación de este con lacasa de *L. edodes*. Este mismo subproducto del olivar se sometió a biorremediación enzimática con lacasa semipurificada de *T. versicolor* en ausencia o presencia del mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT), llegando a reducir un 50% la concentración fenólica en ausencia de mediador, y hasta un 67% en presencia del mismo (Minussi *et al.*, 2007).

En nuestros ensayos se puso de manifiesto que el mayor descenso de fenoles y fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujo tuvo lugar tras el

tratamiento del mismo, diluido al 25%, durante dos días de incubación a 37 °C con extracto de medio de cultivo de *C. rigida* con actividad lacasa. Bajo estas condiciones se demostró que el aumento del índice de germinabilidad se correspondió con el descenso en la concentración de fenoles del residuo respecto a los controles sin lacasa o con enzima inactiva. La correlación positiva entre el contenido fenólico y la fitotoxicidad del alpeorujo también se ha puesto de manifiesto por otros autores en estudios de fermentación del alpeorujo con otros hongos de la podredumbre blanca (Aranda *et al.*, 2006; Sampedro *et al.*, 2007a; Sampedro *et al.*, 2009b). Asimismo, se ha descrito un descenso del efecto fitotóxico del alpechín en semillas de *Triticum durum* tras un proceso de biorremediación con lacasa de *L. edodes* (Casa *et al.*, 2003). Trabajos en nuestro grupo nos indican que la relación existente entre la reducción de la fitotoxicidad del ADOR y su contenido fenólico, es probablemente debida a la formación espontánea de polímeros a partir de fenoles monoméricos glicosilados por hongos (Aranda *et al.*, 2007).

Sin embargo, hay controversia en la relación entre el contenido fenólico y la fitotoxicidad de estos residuos, ya que existen otros trabajos de subproductos del aceite de oliva fermentados con hongos de la podredumbre blanca que muestran resultados contrarios. Tsioulpas *et al.* (2002) afirma que no existe correlación positiva entre el descenso fenólico del alpechín y el efecto fitotóxico tras su tratamiento con cepas de *Pleurotus* spp. En estudios con alpechín también se observó una reducción del contenido fenólico debido a un tratamiento fúngico (*P. ostreatus*) no relacionado con la reducción de la fitotoxicidad del residuo (Fountoulakis *et al.*, 2002). En nuestro trabajo encontramos que la aplicación de lacasa comercial de *T. versicolor* al ADOR incrementó el índice de germinabilidad de las semillas a unos niveles superiores al alcanzado por el extracto de lacasa de *C. rigida* cultivada en medio MB con glucosa y cobre a pesar de que la reducción de fenoles por la lacasa comercial de *T. versicolor* fue menor. Por otro lado, en el cocultivo de *C. rigida* y *P. commune* se observó el triple de actividad lacasa que el monocultivo de *C. rigida* en un mismo volumen. Sin embargo, a pesar de la diferencia de actividad, ambos medios de mono y cocultivo de *C. rigida* produjeron un descenso de fenoles similar en el extracto acuoso de alpeorujo. En este sentido, se han observado tasas similares de eliminación de fenoles y

disminución de fitotoxicidad en medios con grandes diferencias en su actividad lacasa, por lo que se piensa que aunque las lacasas parecen las principales responsables de estas disminuciones, hay otros mecanismos que pueden contribuir en este proceso (Saparrat *et al.*, 2010).

El tratamiento del extracto acuoso de alpeorujó con medio de cultivo del hongo *C. rigida* produjo aumento de color cuando el residuo acuoso estaba más concentrado, es decir, a la concentración del 50%. El incremento de color del ADOR tratado con lacasa podría ser debido a la reacción de la enzima con los fenoles monoméricos de la muestra, a los cuales retira un electrón del grupo hidroxilo, formándose radicales susceptibles de reaccionar entre sí dando lugar a polímeros que confieren un color más oscuro a las muestras e incluso llegan a formar un precipitado visible (Casa *et al.*, 2003). El oscurecimiento de las muestras se comprobó también en el tratamiento de mezclas acuosas de determinados fenoles comerciales como *m*-tiroso y metilcatecol durante 24 horas con lacasa de *R. vernificera* (Gianfreda *et al.*, 2003).

En nuestro estudio se observó un aumento de color del extracto acuoso de alpeorujó en medios que contenían actividad lacasa de *C. rigida* (monocultivo de *C. rigida* y cocultivo de *C. rigida*/*P. commune*), y otros con lacasa comercial de *T. versicolor*. Estos resultados corroboran los resultados obtenidos en nuestros trabajos de biorremediación del alpeorujó descritos en el capítulo 1 de la presente Memoria Doctoral, en los que el aumento de color del ADOR se debería al proceso de polimerización de sus fenoles mediante la actividad lacasa del medio. Sin embargo, otros trabajos de biorremediación de residuos de la industria del olivar han obtenido resultados totalmente contradictorios ya que observan una decoloración del residuo tras el tratamiento enzimático o mediante la incubación con hongos de la podredumbre blanca (Dias *et al.*, 2004; Sampedro *et al.*, 2004). Concretamente, se ha comprobado la reducción de color del alpechín tras 24 horas de tratamiento con lacasa de *T. versicolor*, efecto que fue más significativo ante la presencia del mediador HBT (Minussi *et al.*, 2007). La decoloración de este residuo se ha observado también tras su tratamiento con las enzimas ligninolíticas del hongo *P. chrysosporium* LiP y MnP purificadas, poniendo de manifiesto que el efecto producido en el color de la muestra no se debió

exclusivamente a la actividad lacasa (Sayadi y Ellouz, 1995). El hecho de que se produzca aumento de coloración en el monocultivo de *P. commune* en ADOR, carente de actividad lacasa, nos hace pensar que también debe de haber otros mecanismos por los que se produzca este aumento de coloración del medio.

La actividad lacasa de extracto acuoso de alpeorujos incubado con medio de cultivo de *C. rigida* desciende de forma generalizada a lo largo del tiempo de incubación. Algunos autores han visto que la desaparición de moléculas activas de lacasa es paralela a la disminución del contenido fenólico de la muestra tratada (Filazzola *et al.*, 1999; Canfora *et al.*, 2008). Gianfreda *et al.* (2003) observaron este efecto en el tratamiento de diferentes mezclas acuosas de fenoles puros con lacasa comercial de *Rhus vernificera*, explicándolo como la eliminación paulatina de moléculas enzimáticas de la solución al ser incorporadas (mediante procesos de adsorción o unión) a los nuevos polímeros formados por la actividad lacasa.

Observando la estabilidad de las distintas lacasas ensayadas en el tratamiento con extracto acuoso de alpeorujos comprobamos que la lacasa comercial de *T. versicolor* conservaba menos actividad residual (14,5%) que la lacasa de *C. rigida* producida en medio MB con glucosa y cobre, ya que de ésta última se conservaba un 49% de actividad tras dos días de incubación en ADOR y en las mismas condiciones. La actividad lacasa producida tanto en el cocultivo *C. rigida/P. commune* como en el monocultivo de *C. rigida* mostraron similar estabilidad a lo largo del proceso de incubación con extracto acuoso de alpeorujos al 25% a 37 °C de temperatura. Por otro lado, la estabilidad de la enzima semipurificada de *C. rigida* en el tratamiento de 2 días del extracto acuoso de alpeorujos a 37 °C fue superior a la de la lacasa comercial de *T. versicolor*, al obtenerse un 37,5% de actividad residual frente a un 14,5% de dicha lacasa comercial al final de la incubación con ADOR, aunque la estabilidad fue menor que la de la lacasa de *C. rigida* cultivada en medio MB con glucosa y cobre (49%). En general, la actividad lacasa de *C. rigida* parece ser más estable cuanto mayor es la concentración de extracto acuoso de alpeorujos en la mezcla de incubación. Este hecho es especialmente significativo en el caso de la incubación de extracto acuoso de alpeorujos con lacasa de *C. rigida* a 60 °C, ya que se mantiene la actividad enzimática tras dos

días de tratamiento a concentraciones de 25 y 50% de ADOR. Estos resultados coinciden con los estudios de Mai *et al.* (2000) en los que se observó que la estabilidad de la actividad lacasa de *T. versicolor* en el proceso de almacenamiento aumentaba en presencia de los compuestos fenólicos fluoroglucinol y ácido 3,5-dihidroxibenzoico. Estos compuestos son susceptibles de ser oxidados por la lacasa pero mucho más lentamente que otros compuestos fenólicos, por lo que confieren un efecto protector a las moléculas proteicas.

Para analizar la microtoxicidad del extracto acuoso de alpeorujo se utilizó una técnica muy empleada que tiene como objeto ver si una determinada especie bacteriana es capaz de crecer en determinados residuos (Fountoulakis *et al.*, 2002). De hecho, Kissi *et al.* (2001) en estudios de detoxificación del alpechín con *P. chrysosporium*, comprobó la eficacia del tratamiento mediante el crecimiento de la bacteria *B. cereus* con el residuo tratado. En nuestros ensayos utilizamos la bacteria *A. brasiliense*, por ser una bacteria muy sensible ante sustancias tóxicas y además un microorganismo promotor del crecimiento vegetal.

Se sabe que existe una posible relación entre la disminución del contenido fenólico de determinados residuos y la reducción de sus efectos antibacterianos (Rodríguez *et al.*, 1988). En cambio, en nuestros ensayos no se observa este efecto ya que la incubación del extracto acuoso de alpeorujo con la lacasa de *C. rigida* aunque disminuyó el contenido fenólico no produjo una reducción de la toxicidad. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que afirman que los efectos antibacterianos del alpeorujo tienen poca relación con la cantidad de fenoles o la actividad lacasa (de la Rubia *et al.*, 2008). Hemos observado que aunque *C. rigida* crecido en monocultivo no redujo la microtoxicidad del ADOR no ocurrió lo mismo cuando este hongo creció en presencia de *P. commune* ya que los niveles de reducción de toxicidad fueron mayores incluso a los del monocultivo de *P. commune*. Este hecho puede deberse a la posible inducción de otro tipo de enzimas u otros metabolitos por parte de *P. commune* o *C. rigida* cuando se crecen conjuntamente. Por otro lado se sabe que la presencia de otros componentes del ADOR además de los fenoles, así como determinados productos del metabolismo de los hongos, podrían ser responsables de este efecto antibacteriano.



Discusión general



DISCUSIÓN GENERAL

La escasez de materia orgánica en los suelos de la cuenca mediterránea y la elevada generación de residuos agroindustriales plantean la necesidad de la búsqueda de nuevos abonos orgánicos a través de la revalorización de estos residuos.

El alpeorujó posee un pH ligeramente ácido, macro y micronutrientes y un alto contenido en materia orgánica que lo hacen susceptible de ser empleado como abono para los cultivos. Sin embargo, el alpeorujó posee propiedades fitotóxicas y antimicrobianas que hacen inviable su aplicación directa al suelo. Estas características han sido demostradas en estudios anteriores a la presente Memoria Doctoral, constatándose que la aplicación de alpeorujó en dosis menores a la recomendada como abono orgánico producen índices de germinación de semillas de *Lepidium sativum* inferiores al 60%, límite estipulado por diversos autores para la determinación de la ausencia de fitotoxicidad en residuos y su posible utilización en agricultura como abonos orgánicos sin riesgo para las plantas.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que son los compuestos fenólicos del alpeorujó los que juegan el papel más importante en la toxicidad del residuo, afectando al crecimiento de plantas superiores o inhibiendo incluso la germinación de semillas debido a alteraciones en la absorción de agua y al incremento de la acción inhibidora del ácido abscísico en la germinación por parte de compuestos monohidroxifenólicos.

Para el estudio de la biorremediación enzimática del alpeorujó se procedió a la obtención del extracto acuoso del residuo mediante Soxhlet ya que mediante este sistema se realiza una extracción muy efectiva de los compuestos activos presentes en el mismo, incluidos los de naturaleza fitotóxica.

Se han descrito varios procesos de revalorización del alpeorujó como fertilizante orgánico destacando el uso de hongos ligninolíticos de la podredumbre blanca, debido a su capacidad para reducir el contenido fenólico del residuo. Sin embargo, este tipo de tratamientos requieren periodos largos

para conseguir un sustrato totalmente estable y sin efectos tóxicos. El uso de enzimas extracelulares en los procesos de biorremediación de tales residuos permite la realización de estos tratamientos en un periodo de tiempo mucho más corto. Además, este proceso conlleva otras muchas ventajas respecto a la biorremediación con organismos ya que las enzimas tienen gran especificidad de sustrato, son biodegradables y pueden actuar en condiciones ambientales a menudo desfavorables para el desarrollo de microorganismos o plantas, como pueden ser rangos amplios de pH, temperatura, salinidad, altas concentraciones de contaminantes, presencia de tóxicos o predadores. Entre estos enzimas cabe destacar por su eficacia las lacasas, enzimas fenoloxidasas que producen la oxidación directa de las unidades de lignina fenólicas, compuestos fenólicos y otros compuestos aromáticos, con el oxígeno molecular como aceptor de electrones, que se reduce a agua.

Por lo tanto, en este trabajo de investigación se planteó la revalorización del alpeorujo como fertilizante orgánico mediante su biorremediación enzimática con la lacasa producida por el hongo de la podredumbre blanca *C. rigida*. La selección de este hongo para la realización del trabajo se basó en estudios anteriores en los que se observó que *C. rigida* fue el hongo más eficaz en la degradación de lignina, fenoles totales y reducción de la fitotoxicidad del alpeorujo seco y extractado tras 20 semanas de incubación.

La optimización de la revalorización del alpeorujo mediante biorremediación enzimática con la lacasa del hongo *C. rigida* implicaba el estudio previo de dicha enzima. La actividad lacasa de este hongo se describió en trabajos anteriores en los que se purificaron dos isoenzimas Lacl y LacII de similar punto isoeléctrico (pI), masa molecular, contenido en carbohidratos, secuencia N-terminal, espectro de absorción y pH óptimo, a partir de un medio basal. Sin embargo, se sabe que la composición de los medios de cultivo puede influir considerablemente en la producción de actividad lacasa de algunos hongos de la podredumbre blanca. Asimismo, existen una serie de compuestos inductores de muy distinta naturaleza que pueden incrementar en gran medida la producción de la actividad lacasa o inducir la aparición de nuevas isoenzimas no descritas aún. La presencia de gran cantidad de compuestos aromáticos como los fenoles en los residuos de la industria

olivarera nos hizo plantear el posible efecto inductor del alpeorujo sobre la lacasa del hongo *C. rigida*.

Por tanto, se procedió a la purificación y caracterización de la lacasa de *C. rigida* crecido en medio basal con extracto acuoso de alpeorujo. Para ello, se estudió la producción de lacasa por el hongo *C. rigida* en un medio con un 25, 50 ó un 100% de extracto acuoso de alpeorujo. Se detectó un aumento de la actividad lacasa relacionada con el incremento de la concentración de extracto acuoso de alpeorujo en el medio, evidenciando el posible papel inductor de los componentes de este residuo en la producción de esta enzima. Sin embargo, estos niveles de actividad lacasa fueron menores que los producidos por este hongo crecido en el mismo medio basal con cobre, conocido inductor químico de esta enzima, posiblemente debido a la ausencia en el extracto acuoso de alpeorujo de otros inductores específicos de esta actividad.

Si bien la máxima actividad lacasa se consiguió cuando *C. rigida* se cultivó con un 100% de extracto acuoso de alpeorujo, para los ensayos posteriores se seleccionó el medio basal con 50% de extracto acuoso de alpeorujo como el óptimo para la producción de esta enzima ya que en dicho medio se produjo una actividad lacasa muy similar y con menor cantidad de pigmento, lo cual facilitaría su posterior procesamiento y estudio.

Con objeto de incrementar la producción de lacasa, se aplicaron diferentes concentraciones de glucosa al medio basal con 50% de extracto acuoso de alpeorujo anteriormente seleccionado. Sin embargo, la aplicación de glucosa aumentó el tiempo de incubación necesario para que *C. rigida* obtuviera un nivel de actividad lacasa de 1 U/ml. Este efecto inhibitor en la producción de la enzima lacasa ha sido explicado en otros trabajos por la presencia de elementos de regulación transcripcional dependientes de glucosa y denominados secuencias CreA. La función represora de estas secuencias conlleva el aprovechamiento por el organismo de la fuente de carbono del medio de más fácil asimilación, como es la glucosa, y permite la producción de lacasa cuando ésta se agota y es necesaria la búsqueda de una segunda fuente carbonada.

El estudio de producción de lacasa de *C. rigida* en presencia de alpeorujo permitió la selección del medio de cultivo basal con 50% de extracto acuoso de alpeorujo y 10 g/l de glucosa para el proceso de purificación del

enzima ya que es en el que *C. rigida* produjo mayor cantidad de actividad lacasa.

El proceso de purificación de la lacasa de *C. rigida* producida en presencia de extracto acuoso de alpeorajo, mostró la presencia de dos isoenzimas de lacasa denominadas Lacl y Lacll. Su caracterización posterior determinó que poseían propiedades similares a las descritas para otras lacasas fúngicas. De hecho, el isoelectroenfoque mostró la presencia de dos bandas de actividad lacasa con un pI muy similar (3.33 y 3.43) y dentro del rango ácido descrito para lacasas de otros hongos de la podredumbre blanca. La cromatografía de exclusión molecular y posterior electroforesis SDS-PAGE permitió determinar el peso molecular de ambas isoenzimas (66kDa) tratándose, por tanto, de dos proteínas monoméricas.

El rendimiento global obtenido para cada una de las isoenzimas de la lacasa en presencia de extracto acuoso de alpeorajo fue muy bajo (2,2 y 2,6% del rendimiento final para la Lacl y Lacll, respectivamente), debido probablemente a la poca cantidad de proteína existente en este residuo agroindustrial. Por otro lado, la actividad específica obtenida fue muy alta.

Para completar el estudio de las características de las isoenzimas purificadas, se realizó el estudio de la constante de Michaelis-Menten (K_m) mediante el cual se pudo observar que las dos isoenzimas presentaron la mayor afinidad para el sustrato ABTS y que la afinidad para el DMP era mayor que la observada en trabajos previos.

Los resultados de la K_m , así como los datos de peso molecular, grado de glicosilación y punto isoeléctrico descritos anteriormente, indican que las isoenzimas de lacasa descritas en presencia de extracto acuoso de alpeorajo son las mismas que las encontradas en medios sin extracto acuoso de alpeorajo, por tanto, el alpeorajo no induce la producción de nuevas isoenzimas de la lacasa de *C. rigida*.

La purificación de la lacasa de *C. rigida* permitió el estudio del papel exacto que esta enzima realiza sobre el contenido fenólico del extracto acuoso de alpeorajo. La aplicación de la enzima purificada de *C. rigida* al extracto acuoso de alpeorajo produjo la disminución en el contenido de fenoles del residuo. Asimismo, los perfiles cromatográficos de exclusión molecular del residuo tratado con lacasa de *C. rigida* purificada mostraron que la fracción de

los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, disminuye sensiblemente respecto al control sin tratar mientras que la fracción correspondiente a los fenoles de mayor peso molecular aumenta tras la incubación del residuo con la lacasa purificada. Estos resultados indican que la lacasa de *C. rigida* produce en el extracto acuoso de alpeorujos la polimerización de los fenoles de menor peso molecular. En estudios previos se ha constatado que las lacasas actúan sobre los fenoles monoméricos eliminando un electrón del grupo hidroxilo, formándose radicales susceptibles de reaccionar entre sí dando lugar a polímeros que confieren un color más oscuro a las muestras e incluso llegan a formar un precipitado visible.

Una vez realizado el estudio de purificación, caracterización y papel de la lacasa de *C. rigida* producida en presencia de extracto acuoso de alpeorujos, se procedió a la secuenciación del gen de la misma para completar el estudio sobre esta enzima ligninolítica. Tras una primera etapa de amplificación del gen, se obtuvo una banda simple de ADNc de 1.2 kb cuya secuencia nucleotídica mostró la máxima homología con el gen *lcc1* de la lacasa de *Trametes* sp. C 30. Sin embargo, la secuencia aminoacídica deducida del marco abierto de lectura del gen de la lacasa de *C. rigida* identificado posteriormente y en presencia de alpeorujos, mostró gran homología con la lacasa del hongo *T. trogii*. Esta gran similitud ha sido descrita anteriormente entre la secuencia amino terminal de la lacasa de *C. rigida* crecido en medio basal con glucosa y cobre y la de la lacasa de *T. trogii* con una homología del 80%. La secuencia aminoacídica mostró todos los dominios observados para las lacasas de otros hongos basidiomicetos como el mencionado *T. trogii*. En nuestro caso, el cuarto aminoácido del sitio de unión al cobre tipo I y de enlace más débil al ión, se correspondía con una fenilalanina al igual que en el caso de la lacasa de *T. trogii*.

A pesar de purificar dos isoenzimas de lacasa de *C. rigida* tanto en ausencia como en presencia de alpeorujos, en nuestro estudio sólo se ha podido amplificar una banda de ADNc de lacasa. Este hecho sugiere que las dos isoenzimas Lacl y LacII producidas tanto en medio basal en ausencia de alpeorujos como en presencia de este residuo, son variantes del mismo gen *lcc1* y que las pequeñas diferencias entre ellas podrían explicarse por la existencia de variantes alélicas del gen, ya que *C. rigida* es un hongo dicariótico.

Por tanto, se demuestra, tanto proteómica como genéticamente, que las isoenzimas de lacasa de *C. rigida* producidas en ausencia de alpeorujo son las mismas que las producidas en presencia de este residuo y que están codificadas por el mismo gen *lcc1*.

La identificación del gen de la lacasa del hongo *C. rigida* permitió realizar un estudio más exhaustivo sobre el comportamiento de esta enzima en el proceso de revalorización del alpeorujo. Para ello se procedió, por un lado, al estudio de la influencia del alpeorujo mediante las concentraciones de 0, 2,5, 10 y 20% de extracto acuoso de alpeorujo en el medio de cultivo, y por otro lado, al estudio de la influencia de un conocido inductor químico de esta actividad enzimática, como el cobre, en la expresión del gen *lcc1* del hongo *C. rigida*.

En el estudio de la influencia del extracto acuoso de alpeorujo y del cobre en la producción de lacasa de *C. rigida* se comprobó que la glucosa del medio disminuía rápidamente tras lo cual se observó un aumento del pH y de los niveles de la actividad lacasa, evidenciándose la influencia de la fuente de carbono en el metabolismo y demás factores del cultivo del hongo *C. rigida*. De hecho, durante los primeros días de incubación, se detectó un descenso generalizado del pH del medio de cultivo independientemente de la concentración de extracto acuoso de alpeorujo y la presencia o ausencia de cobre y que se identificó con la etapa de crecimiento vegetativo inicial del hongo. Posteriormente, se produjo un aumento del pH en todos los tratamientos estudiados y se relacionó con el agotamiento de la glucosa del medio ya que podría deberse a la degradación de compuestos ácidos y a la mineralización de compuestos orgánicos como búsqueda de una segunda fuente de carbono.

Se ha observado un aumento del nivel de actividad lacasa en cultivos de hongos donde la glucosa comienza a ser limitante, tras un retraso en la producción de esta enzima debido a la presencia de esta fuente de carbono rápida. En estos casos, el hongo tras agotar la glucosa conseguiría una segunda fuente de carbono mediante la degradación de lignina u otros compuestos fenólicos del medio por la actividad lacasa. De hecho, en nuestros resultados se puede establecer una relación directa entre la producción de lacasa y el agotamiento de la glucosa. Esta relación ha sido observada

anteriormente en nuestros ensayos sobre la producción de lacasa por el hongo *C. rigida* en presencia de alpeorujo en los que se describió un retraso en la producción de lacasa en medios suplementados con ADOR y glucosa respecto a medios con la misma concentración de extracto acuoso de alpeorujo pero sin glucosa. Se evidencia, por tanto, que la producción de lacasa tiene lugar tras el agotamiento de la fuente principal de carbono y que esta regulación podría ser debida a la presencia de elementos CreA en el promotor del gen.

En nuestros ensayos, el color de los cultivos de *C. rigida* con extracto acuoso de alpeorujo en ausencia o presencia de cobre aumentó a lo largo del tiempo de incubación mientras que la cantidad de fenoles mostraba un descenso generalizado en los medios de cultivo. Se ha descrito un aumento de color en medios de cultivo de ciertos hongos en presencia de residuos de la industria del olivar debido a la polimerización de fenoles producida por la actividad lacasa. No obstante, en otros trabajos se ha identificado un proceso de decoloración de estos residuos tras su incubación con hongos. A este respecto, hay resultados contradictorios en la relación entre la evolución del color de los cultivos y la actividad lacasa. Así, esta enzima produce la polimerización de los fenoles monoméricos, tal y como se ha descrito anteriormente, produciendo la aparición de un polímero de mayor tamaño molecular que proporciona un color más oscuro al residuo. De hecho, en otros trabajos no se ha descrito descenso de color en cultivos con residuos de la industria del olivar incubados con hongos de la podredumbre blanca en los que sólo se detectaba actividad lacasa, y sí se describía un proceso de decoloración sólo en aquellos medios en los que se encontraban actividades peroxidasas, como la MnP y la LiP. Estas enzimas serían responsables de la degradación de los compuestos polifenólicos del residuo en fragmentos más pequeños susceptibles de ser absorbidos por las células fúngicas y subsecuentemente mineralizados. Sin embargo, en otros estudios la lacasa ha sido relacionada con la decoloración de estos subproductos agroindustriales. Hay que tener en cuenta que no siempre hay relación directa entre la disminución en el contenido fenólico del medio de cultivo de hongos en presencia de residuos del olivar con cambios en la coloración del mismo. Por otro lado hay que tener en cuenta la complejidad de las reacciones que existen entre la lacasa y sus sustratos cuando están involucrados compuestos

fenólicos en relación al color del medio. Se ha comprobado que en la degradación de los residuos del olivar u otras mezclas fenólicas por enzimas lacasas, influye la composición fenólica, ya que, dependiendo del tipo y reactividad de los diferentes fenoles, éstos pueden producir un efecto inhibitor o protector de la actividad lacasa durante el tratamiento del residuo y producir mayor o menor decoloración del mismo.

La evolución del color del alpeorujó en su incubación con hongos de la podredumbre blanca como *C. rigida*, además de depender de la composición fenólica del mismo, puede verse afectada por el tipo y cantidad de la fuente principal de carbono en el cultivo, que puede facilitar el proceso de decoloración del residuo, así como del tipo de enzima producida por el organismo, tal y como se ha descrito.

El estudio del contenido proteico de los cultivos de *C. rigida* con las diferentes concentraciones de 0, 2,5, 10 y 20% de extracto acuoso de alpeorujó y en presencia o ausencia de cobre mostró un incremento significativo de proteínas a medida que se aumentaba la cantidad de residuo en el medio de cultivo, independientemente del crecimiento del hongo medido mediante la biomasa. Esto evidencia la interferencia del color del extracto acuoso de alpeorujó en la determinación de proteínas del medio por lo que no es posible determinar con fiabilidad la concentración y posibles variaciones en la cantidad de proteínas de los cultivos de *C. rigida* a lo largo del proceso de incubación.

En este estudio sobre la influencia del alpeorujó y el cobre en el hongo *C. rigida* y en la producción de su enzima lacasa, se pudo observar que en los cultivos de *C. rigida* sin extracto acuoso de alpeorujó la presencia de cobre tiene un efecto inhibitor del crecimiento del hongo. Igualmente, en medios con extracto acuoso de alpeorujó, *C. rigida* disminuyó su biomasa a lo largo de la incubación en presencia o no de cobre, lo que induce a pensar que tal inhibición del crecimiento pueda deberse a la presencia de alpeorujó. Sin embargo, también hemos observado que los valores iniciales de biomasa en medios con alpeorujó son superiores a los que se obtuvieron sin extracto acuoso de alpeorujó, aunque, el aumento de la concentración de residuo no conllevó un incremento proporcional de la biomasa del hongo. Se puede concluir, por tanto, que pequeñas concentraciones de extracto acuoso de

alpeorujo producen un incremento en el crecimiento del hongo que, sin embargo, no se mantiene a lo largo del periodo de incubación.

Respecto a los fenoles libres de los cultivos con extracto acuoso de alpeorujo, *C. rigida* disminuyó significativamente su concentración tras sólo 5 días de incubación, incrementándose este descenso al aumentar el tiempo del proceso. La concentración de fenoles en el medio de cultivo se ha relacionado con el nivel de actividad lacasa ya que los fenoles de los residuos de la industria del olivar, como el alpeorujo, son compuestos tóxicos para el propio hongo que provocan la activación de la lacasa para la detoxificación del residuo. La lacasa aumentaría el tamaño molecular de los fenoles por su polimerización, evitando así su entrada en las células fúngicas. A este respecto, se sabe que los compuestos aromáticos son decisivos en la producción de actividad lacasa por determinados hongos. Se observa que al incrementar la concentración de extracto acuoso de alpeorujo en el medio de cultivo de *C. rigida* en tratamientos sin cobre se produce mayor nivel de actividad lacasa. Este efecto, que también se observó previamente en esta Memoria Doctoral, apoyaría la hipótesis de la activación de la lacasa para la transformación de residuos por los componentes fenólicos del mismo.

Sin embargo, a pesar de la inducción de mayores niveles de actividad lacasa gracias a la creciente presencia de fenoles en el medio, en nuestros ensayos no se encontró correlación entre la cantidad de actividad lacasa de *C. rigida* y la reducción de fenoles del extracto acuoso de alpeorujo. Este hecho ha sido observado en trabajos anteriores a la presente Memoria Doctoral, en los que se detectaba similar descenso del contenido fenólico en cultivos con residuos de la industria del olivar con diferentes niveles de actividad lacasa.

En relación a la expresión del gen de la enzima lacasa pudimos observar una relación positiva entre la cantidad de extracto acuoso de alpeorujo añadido al medio de cultivo de *C. rigida* en medios sin cobre y la transcripción del gen. En estudios sobre los mecanismos moleculares mediante los cuales se regula la transcripción de genes de lacasa de hongos basidiomicetos, se han identificado las denominadas secuencias consenso XRE que se encuentran localizadas en los promotores de los genes de las enzimas lacasa y que activan la transcripción de los mismos ante la presencia de elementos xenobióticos en el medio. Su mecanismo de acción consiste en la unión de

dicho elemento xenobiótico a proteínas receptoras específicas, lo cual produce la formación de un complejo que identifica e interactúa con las secuencias XRE en el promotor del gen de lacasa aumentando la expresión del mismo. El aumento del nivel de expresión de la lacasa en relación con el incremento de la concentración de extracto acuoso de alpeorujo en el medio podría, por tanto, deberse a la presencia de secuencias XRE en el gen *lcc1* de la lacasa de *C. rigida*.

Además de la influencia del alpeorujo en la producción de la lacasa y expresión del gen de la misma, se estudió la influencia del cobre como inductor químico de dicha enzima. En este estudio, cabe destacar el aumento considerable de los niveles de actividad lacasa de *C. rigida* en medios con cobre. Se han postulado varias teorías que explican este efecto afirmando, muchas de ellas, el papel de la lacasa como mecanismo de defensa frente a altas concentraciones de cobre ya que éste es un micronutriente necesario para el metabolismo de los seres vivos pero en concentraciones muy bajas, concretamente, del orden de 1-10 μM . Mayores concentraciones de este metal pesado lo convierten en tóxico para las células, por lo que se plantea que el efecto inductor que este ión genera en los niveles de actividad lacasa es en realidad la activación de un mecanismo de defensa frente al efecto tóxico que puede ocasionar en el organismo. Se ha atribuido la función protectora de la lacasa a la quelación de iones de cobre durante la síntesis de la enzima, ya que este metal pesado forma parte de la estructura proteica de la lacasa. Sin embargo, posteriormente se demostró que dicho efecto quelante sería insuficiente para retirar una cantidad idónea de cobre del medio para evitar sus efectos tóxicos, por lo que se trataría de un mecanismo ineficaz de defensa frente a una alta concentración de este metal pesado en el medio de cultivo. Además, los hongos presentan otros mecanismos de quelación más eficaces frente al cobre, ya que poseen las denominadas metalotioneínas: complejos intracelulares capaces de captar los iones de cobre que posteriormente quedarán retenidos en la pared celular del organismo. Otras teorías expuestas sobre el mecanismo de la actividad lacasa como defensa frente a altas concentraciones de cobre, son las relacionadas con la formación de pigmentos. Concretamente, la lacasa interviene en la formación de melanina, polímero oscuro pigmentado que protege al organismo del estrés ambiental y que podría

funcionar como barrera fisiológica a la alta concentración de cobre en el medio además de ser un mecanismo adicional para conseguir cobre del medio extracelular en las concentraciones necesarias para el organismo, debido a que las melaninas fúngicas son pigmentos capaces de captar metales muy eficientemente.

En resumen, en esta Memoria Doctoral se demuestra el efecto inductor en la actividad lacasa de *C. rigida* por la presencia en los medios de cultivo de cobre y extracto acuoso de alpeorujó.

Respecto al efecto de estos factores en la expresión del gen de la lacasa de *C. rigida*, se observó que su nivel de transcripción fue superior en tratamientos con cobre respecto a los sin cobre en los días iniciales de la incubación. Este incremento de la transcripción del gen codificante de esta lacasa podría deberse a la presencia de secuencias activadoras de la expresión del gen como respuesta a la presencia de metales pesados identificadas en otros estudios y denominadas secuencias MRE.

Sin embargo, a mayor tiempo de cultivo de *C. rigida*, los niveles de transcripción de la actividad lacasa se igualan entre los distintos tratamientos en presencia o no de cobre. De hecho, los estudios de correlación entre el nivel de transcripción del gen y la cantidad de actividad lacasa indicaron una gran correlación entre ambos factores pero sólo en los medios en ausencia de cobre. El hecho de que los niveles de transcripción del gen de la lacasa sean similares tanto en ausencia como en presencia de cobre sugiere que se ha sintetizado la misma cantidad de enzima en ambos tratamientos. Sin embargo, el hecho de que haya mayor actividad lacasa en presencia de cobre sugiere que en ausencia de cobre, no se activa todo el enzima. En nuestros ensayos no puede demostrarse la existencia de una lacasa inactiva por ausencia de cobre ya que se ha encontrado interferencia en la medida de los niveles de proteína total de las muestras debido al color del extracto acuoso de alpeorujó. Sin embargo, trabajos anteriores han demostrado la presencia de una lacasa inactiva que depende de la presencia de cobre para presentar actividad enzimática.

Para poder llevar a cabo la aplicación industrial de las enzimas en la revalorización de residuos, es necesaria la producción de gran cantidad de las mismas, por lo que se han utilizado compuestos inductores capaces de

incrementar los niveles de producción de estas enzimas por los organismos correspondientes. Los inductores químicos como el cobre, aunque, como se ha demostrado, incrementan la producción de actividad lacasa, tienen una serie de inconvenientes que los hacen inviables para su utilización a nivel industrial ya que suelen tener efectos contaminantes y además, debido al proceso de elaboración, disminuyen la rentabilidad del proceso. Como alternativa al uso de inductores químicos, se propuso el estudio de otros factores tanto físicos como biológicos que incrementaran la producción de la lacasa. Como inductor físico, se investigó la forma de incubación del cultivo, en agitación o en condiciones de reposo, en la producción de esta enzima. Como factor biológico, se procedió al estudio de la producción de la enzima lacasa de *C. rigida* crecido en condiciones de cocultivo con otro hongo saprobio, ya que se sabe que la producción de lacasa por determinados hongos puede activarse biológicamente por la presencia en el cultivo de un segundo hongo.

En nuestros ensayos observamos que en cultivos estáticos, *C. rigida* produjo niveles de actividad lacasa 20 veces superiores a los encontrados en cultivos en agitación. La disminución dramática de la producción de lacasa en cultivos en agitación respecto a los cultivos en condiciones estáticas podría deberse a roturas en el micelio causadas por dicha agitación, por cambios en la morfología del hongo o por la desnaturalización enzimática causada por las fuerzas mecánicas generadas por la agitación.

El cocultivo de *C. rigida* con los hongos saprobios *P. chrysogenum* 10, *P. farinosus*, *Penicillium* sp, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *F. lateritium*, *F. oxysporum* 738, *F. concolor*, *F. graminearum* y *M. racemosus* permitió observar que determinados hongos inducían la actividad lacasa de *C. rigida*. Se seleccionó *Penicillium* sp. como hongo inductor de la producción de actividad lacasa de *C. rigida*, ya que se alcanzó la mayor actividad enzimática respecto al resto de cocultivos probados llegando a alcanzar 1,03 U/ml de actividad lacasa tras 12 días de cultivo en agitación. El estudio molecular de *Penicillium* sp. para determinar la especie concluyó que se trataba de *Penicillium commune*, uno de los hongos más extendidos y fácilmente aislables de materias primas agrícolas y productos alimenticios. Este hongo se ha utilizado también en procesos de biorremediación como la decoloración de tintes debido

a su gran capacidad para la hidrolización y condensación de taninos como fuente de carbono.

En nuestro estudio queda patente el aumento de la producción de lacasa del hongo *C. rigida* cuando éste se cultiva en presencia de *P. commune*. La mayor producción de lacasa en los cocultivos se consiguió en condiciones estáticas y con una diferencia de inoculación de seis días entre *C. rigida* y *P. commune*, llegando a alcanzarse niveles de actividad lacasa 3 veces superior respecto a un monocultivo de *C. rigida* en condiciones estáticas y 30 veces superior a un monocultivo en agitación. Este incremento de producción enzimática bajo condiciones de cocultivo se debe a la competencia por espacio y nutrientes entre los organismos, lo cual determina una mayor degradación de lignina y producción de enzimas ligninolíticas como la lacasa.

Nuestros resultados muestran que los niveles de producción de lacasa de *C. rigida* crecido en condiciones estáticas y en presencia de *P. commune* inoculado con 6 días de diferencia respecto a *C. rigida*, son muy superiores a los descritos en otros trabajos con inductores químicos y bajo condiciones de agitación. Este hecho supone una gran ventaja ya que existen estudios que indican cómo el incremento de lacasa mediante la utilización de compuestos fenólicos y/o metales pesados puede ocasionar graves problemas medioambientales. Por tanto, la modificación de las condiciones de cultivo y la presencia de un inductor biológico supone una estrategia eficaz para incrementar la producción de actividad lacasa, imprescindible para el uso de estos hongos en biorremediación sin necesidad de recurrir al uso de inductores químicos. Con estos resultados queda demostrado el gran potencial de *P. commune* como inductor biológico de lacasa.

El incremento de la actividad lacasa observada en los cocultivos de *C. rigida* con *P. commune* podía deberse a la aparición de nuevos isoenzimas de lacasa. Se sabe que las diferentes condiciones de cultivo o el crecimiento del hongo en condiciones de cocultivo pueden inducir la expresión de nuevas isoenzimas de lacasa. Por ello se procedió a la purificación y caracterización de la lacasa producida mediante el crecimiento conjunto de *C. rigida* con *P. commune*. Bajo estas condiciones, la lacasa de *C. rigida* mostró dos bandas con pl ácido (3.4 y 3.6, respectivamente) que se encuentran dentro del rango descrito para lacasas de otros hongos de la podredumbre y similar al detectado

para las dos isoenzimas de lacasa de *C. rigida* identificadas, previamente en esta Memoria Doctoral, en presencia de alpeorujos (pl 3.3 y 3.4 para Lacl y Lacll, respectivamente). Los resultados posteriores de las cromatografías de exclusión molecular e intercambio aniónico muestran cómo las dos isoformas (Lacl y Lacll) que produce *C. rigida* en cocultivo con *P. commune* son las mismas que en condiciones de monocultivo. Sin embargo, la actividad específica detectada fue mayor en cocultivos que en monocultivos. Por otro lado, el rendimiento global de cada isoenzima fue más bajo, tanto en monocultivo de *C. rigida* como en cocultivo, respecto al descrito en trabajos anteriores sobre purificación de la lacasa de *C. rigida* en medio basal en ausencia de alpeorujos y con cobre como inductor, aunque la actividad específica detectada fue mucho mayor que la obtenida en dichos trabajos. Estas diferencias pueden deberse, probablemente, a las diferentes condiciones de cultivo de las cepas o a diferencias en las propiedades catalíticas entre las lacasas de un mismo organismo.

Tras el estudio básico sobre la identificación, características y producción de la enzima lacasa del hongo de la podredumbre blanca *C. rigida*, producida en presencia de alpeorujos y tras la descripción de un método de producción eficaz a través del cocultivo del hongo *C. rigida* con *P. commune*, se procedió al diseño del proceso de biorremediación enzimática de dicho residuo. Para ello, se midió la fitotoxicidad del alpeorujos mediante el estudio del índice de germinación en semillas de *L. sativum*. Nuestros resultados mostraron una evidente relación entre la concentración del residuo y la inhibición de la germinación. De hecho, el extracto acuoso de alpeorujos diluido al 25 y 50% disminuyeron drásticamente la germinación de semillas de berro mientras que concentraciones más bajas del residuo no mostraron fitotoxicidad.

En nuestros ensayos se puso de manifiesto que el mayor descenso de fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujos tuvo lugar tras la incubación del residuo diluido al 25%, durante dos días a 37 °C con medio de cultivo de *C. rigida* con actividad lacasa. Se seleccionaron, por tanto, tales condiciones como las óptimas para los estudios de biorremediación de este residuo mediante su tratamiento con lacasa. Bajo estas condiciones se demostró que la lacasa parece ser la principal responsable de la disminución de la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujos. Si bien, el proceso de purificación de la lacasa

producida por *C. rigida* no nos permitió determinar su efecto sobre la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó, el hecho de que tanto la lacasa comercial de *T. versicolor* como el extracto de lacasa de cultivos de *C. rigida* incrementaran el índice de germinabilidad de las semillas de berro en presencia de extracto acuoso de alpeorujó, apoya la idea del papel de esta enzima en la disminución de la fitotoxicidad del alpeorujó.

En nuestros ensayos se puso de manifiesto que el descenso conjunto de fenoles y fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó tuvo lugar tras el tratamiento del mismo con medio de cultivo de *C. rigida* con actividad lacasa. Bajo estas condiciones se demostró la existencia de una correlación positiva entre el contenido fenólico y la fitotoxicidad del alpeorujó mediada por la acción de la lacasa. Sin embargo, en nuestro trabajo también encontramos que la aplicación de lacasa comercial de *T. versicolor* al extracto acuoso de alpeorujó disminuyó su fitotoxicidad a unos niveles superiores al alcanzado por el medio de cultivo de *C. rigida* con actividad lacasa, a pesar de que la reducción de fenoles por la lacasa comercial de *T. versicolor* fue menor. Por otro lado, en el cocultivo de *C. rigida* y *P. commune* se observó el triple de actividad lacasa que el monocultivo de *C. rigida* pero ambos produjeron un descenso de fenoles similar. Estos resultados nos indican que aunque las lacasas parecen las principales responsables de la disminución del contenido fenólico y de la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó, hay otros mecanismos que pueden intervenir en este proceso.

En nuestro estudio se observó un aumento de color del extracto acuoso de alpeorujó en medios que contenían actividad lacasa de *C. rigida* (monocultivo de *C. rigida* y cocultivo de *C. rigida*/*P. commune*), y otros con lacasa comercial de *T. versicolor*. Estos resultados corroboran los obtenidos en nuestros trabajos de biorremediación de alpeorujó descritos en el capítulo 1 de la presente Memoria Doctoral, en los que el aumento de color del extracto acuoso de alpeorujó se debería al proceso de polimerización de sus fenoles mediante la actividad lacasa del medio. Sin embargo, el hecho de que se produzca aumento de coloración en el monocultivo de *P. commune* en extracto acuoso de alpeorujó, carente de actividad lacasa, pone de manifiesto que el efecto producido en el color del residuo no se debió exclusivamente a la

actividad lacasa, lo que nos hace pensar que también debe de haber otros mecanismos por los que se produzca este aumento de coloración del medio.

La actividad lacasa del extracto acuoso de alpeorujos incubado con medio de cultivo de *C. rigida* desciende de forma generalizada a lo largo del tiempo de incubación. Observando la estabilidad de las distintas lacasas comprobamos que la lacasa comercial de *T. versicolor* conservaba menos actividad residual que el extracto de lacasa de *C. rigida* producida en el medio de cultivo. La actividad lacasa producida tanto en el cocultivo *C. rigida/P. commune* como en el monocultivo de *C. rigida* mostraron similar estabilidad a lo largo del proceso de incubación con extracto acuoso de alpeorujos. Por otro lado, la estabilidad de la enzima semipurificada de *C. rigida* en determinados tratamientos fue superior a la de la lacasa comercial de *T. versicolor*, e inferior a la de la lacasa obtenida de *C. rigida* en el medio de cultivo. En general, la actividad lacasa de *C. rigida* parece ser más estable cuanto mayor es la concentración de extracto acuoso de alpeorujos en la mezcla de incubación. Este hecho es especialmente significativo en el caso de la incubación del extracto acuoso de alpeorujos más concentrado con lacasa de *C. rigida* producida en el medio de cultivo a 60 °C.

Para completar el estudio sobre la revalorización del alpeorujos mediante su tratamiento con actividad lacasa, se procedió al análisis de la microtoxicidad del residuo frente a *A. brasiliense*, por ser una bacteria muy sensible ante sustancias tóxicas y además un microorganismo promotor del crecimiento vegetal.

En nuestros ensayos no se observó relación directa entre la disminución del contenido fenólico del alpeorujos y la reducción de sus efectos antibacterianos, ya que la incubación de extracto acuoso de alpeorujos con el hongo *C. rigida*, aunque disminuyó el contenido fenólico, no produjo una reducción de la toxicidad. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que afirman que los efectos antibacterianos del alpeorujos tienen poca relación con la cantidad de fenoles o la actividad lacasa. Hemos observado que aunque *C. rigida* crecido en monocultivo no redujo la microtoxicidad del extracto acuoso de alpeorujos, no ocurrió lo mismo cuando este hongo creció en presencia de *P. commune* ya que los niveles de reducción de toxicidad fueron mayores incluso a los del monocultivo de *P. commune*. Este hecho puede deberse a la posible inducción de otro tipo de enzimas u otros metabolitos por parte de *P. commune*

o *C. rigida* cuando se cultivan conjuntamente. Por otro lado se sabe que la presencia de otros componentes del extracto acuoso de alpeorujo, además de los fenoles, así como determinados productos del metabolismo de los hongos podrían ser responsables de este efecto antibacteriano.

En base a los resultados obtenidos se pone de manifiesto, por tanto, que la enzima lacasa de *C. rigida* actúa en la polimerización de los fenoles existentes en el alpeorujo, eliminando su efecto toxico en las plantas. Esto hace posible llevar a cabo un proceso muy eficaz de biorremediación enzimática sin la necesidad de purificación o inmovilización de la enzima. Este proceso se puede optimizar incrementando la producción del enzima mediante el crecimiento conjunto de *C. rigida* con el hongo saprobio *P. commune* que va a dar lugar a una gran producción de actividad lacasa y también de otro tipo de enzimas o metabolitos cuyo efecto conjunto proporciona mayor descenso no solo en la fitotoxicidad sino también en la microtoxicidad del residuo. Estos procesos van a permitir la revalorización del alpeorujo de una forma barata, efectiva y no contaminante.



Conclusiones



CONCLUSIONES

1. *Corioloropsis rigida* en presencia de extracto acuoso de alpeorujó produce solo dos isoenzimas de lacasa: Lacl y Lacll de igual peso molecular, grado de glicosilación y afinidad para los sustratos DMP y ABTS.
2. La lacasa de *Corioloropsis rigida* en presencia de extracto acuoso de alpeorujó produce la reducción de la cantidad de fenoles del residuo mediante la polimerización de los mismos.
3. *Corioloropsis rigida* en presencia de extracto acuoso de alpeorujó posee un solo gen de lacasa, llamado *lcc1*, por lo que las dos isoenzimas Lacl y Lacll producidas en medio en presencia de extracto acuoso de alpeorujó son variantes del mismo gen *lcc1*.
4. Tanto el cobre, conocido inductor químico de la lacasa, como el extracto acuoso de alpeorujó producen un aumento de los niveles de actividad lacasa en el medio de cultivo de *Corioloropsis rigida*, siendo mayor la inducción de actividad lacasa producida por la presencia de cobre que por el extracto acuoso de alpeorujó.
5. Se sintetiza la misma cantidad de enzima lacasa de *Corioloropsis rigida* tanto en ausencia como en presencia de cobre ya que los niveles de transcripción del gen de la lacasa son similares en ambos casos. Sin embargo, en ausencia de cobre no se activa todo el enzima ya que se detecta mayor actividad lacasa en presencia de cobre que en ausencia de este ión.
6. El cocultivo estático de *Corioloropsis rigida* con *Penicillium commune*, inoculado este último tras 6 días de incubación de *Corioloropsis rigida*, produjo una gran inducción de actividad lacasa y muy superior a la obtenida con inductores químicos.
7. El cultivo de *Corioloropsis rigida* junto con *Penicillium commune* en extracto acuoso de alpeorujó produjo las mismas isoenzimas de lacasa Lacl y Lacll descritas anteriormente en ausencia de *Penicillium commune*.

8. La lacasa es la principal pero no única responsable de la reducción de la fitotoxicidad del alpeorujó.
9. Existe una correlación positiva entre la disminución de la fitotoxicidad y el descenso del contenido fenólico del extracto acuoso de alpeorujó, mediada por la acción de la lacasa de *Coriolopsis rigida*.
10. La incubación del extracto acuoso de alpeorujó con el medio del cocultivo *Coriolopsis rigida*/*Penicillium commune* produjo el mayor descenso de la fitotoxicidad y microtoxicidad del residuo favoreciendo, de ese modo su utilización con fines agronómicos.



Bibliografía



BIBLIOGRAFIA

- Abd El-Rahim, W.M.** 2006. Assessment of textile dye remediation using biotic and abiotic agents. *Journal Basic Microbiology* 46: 318-328.
- Aguilar, C.N., Cruz, M., Rodríguez, R., Gutierrez-Sánchez, G., Ramírez-Coronel, A., Augur, C.** 2004. Catechin degradation by several fungal strains isolated from Mexican desert. *Journal Microbiology and Biotechnology* 14: 426-429.
- Alba, J., Ruíz, M.A., Hidalgo, F.** 1992. Control de elaboración y características analíticas de los productos obtenidos en una línea continua ecológica. *Dossier Oleo* 2: 43-48.
- Albarrán, A., Celis, R., Hermosin, M.C., López-Pineiro, A., Cornejo, J.** 2004. Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere* 54: 717-724.
- Albuquerque, J.A., Gonzalez, J., García, D., Cegarra, J.** 2004. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology* 91: 195-200.
- Albuquerque, J.A., Gonzalez, J., García, D., Cegarra, J.** 2006. Measuring detoxification and maturity in compost made from "alperujo", the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere* 64: 470-477.
- Albuquerque, J.A., González, J., Tortosa, G., Baddi, G.A., Cegarra, J.** 2009. Evaluation of "alperujo" composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation* 20: 257-270.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Aranda, E., García-Romera, I., Ocampo, J.A., Carbone, V., Malorni, A., Sannino, F., Capasso, R.** 2007. Chemical characterization and effects on *Lepidium sativum* of the native and bioremediated components of dry olive mill residue. *Chemosphere* 3: 229-239.
- Aranda, E., Kinne, M., Kluge, M., Ullrich, R., Hofrichter, M.** 2009. Conversion of dibenzothiophene by the mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Coprinellus radians* and their extracellular peroxygenases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 1057-1066.

- Aranda, E., Sampedro, I., Ocampo, J.A., García-Romera, I.** 2006. Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58: 176-179.
- Arjona, R., García, A., Ollero, P.** 1999. The drying of alpeorujo, a waste product of the olive oil mill industry. *Journal of Food Engineering* 41: 229-234.
- Asiegbu, F.O., Paterson, A., Smith, J.E.** 1996. The effects of co-fungal cultures and supplementation with carbohydrate adjuncts on lignin biodegradation and substrate digestibility. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 12: 273-279.
- Baldrian, P.** 2004. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 560-563.
- Baldrian, P.** 2006. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215-242.
- Baldrian, P.** 2009. Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology* 1: 4-12.
- Ballesteros, I., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M.** 2001. Ethanol production from lignocellulosic by-products of olive oil extraction. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-93, 237-252.
- Barakat, N., Makris, D.P., Kefalas, P., Psillakis, E.** 2009. Removal of olive mill waste water phenolics using a crude peroxidase extract from onion by-products. *Environmental Chemistry Letters*, DOI: 10.1007/s10311-009-0216-z
- Ben-Hamman, O.** 1999. Peroxidasas ligninolíticas de *Phanerochaete flavidobalba* y aplicación de este hongo al tratamiento del alpechín. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Berrio, J., Plou, F.J., Ballesteros, A., Martínez, A.T.** 2007. Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit: Stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters. *Biocatalysis and Biotransformation* 25: 130-134.
- Berk. y Mont. Murrill.** 1908. *Corioloopsis rigida*. *North American Flora* (New York) 9(2): 75.
- Bollag, J.M., Leonowicz, A.** 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 849-854.
- Bonanomi, G., Giorgi, V., Giovanni, D.S., Neri, D., Scala, F.** 2006. Olive mill residues affect saprophytic growth and disease incidence of foliar and soilborne plant fungal pathogens. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 115: 194-200.

- Booth, C.** 1977. *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute, London.
- Borja, R., Raposo, F., Rincón, B.** 2006. Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills. *Grasas y Aceites* 57: 32-46.
- Borja, R., Rincón, B., Raposo, F., Alba, J., Martín, A.** 2003. Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the two-phase olive mill solid waste. *Biochemical Engineering Journal* 15: 139-145.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bull.** 1791. *Mucor racemosus*. Histoire des champignons de la France 1: 104.
- Cabrera, F., López, R., Martínez-Bordiu, A., de Lome, E.D., Murillo, J.M.** 1996. Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38: 215-225.
- Cabrera, F., Madejón, E., Romero, S.A., López, R.** 2002. Diagnóstico y estudio de alpechines, orujos y alpeorujos. Jornadas de investigación y transferencia tecnológica del sector agrícola, pp.195-199.
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutiérrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martínez, M.J., Martínez, A.T.** 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 113-120.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J., Martínez, A.** 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1775-1784.
- Canfora, L., Iamarino, G., Rao, M.A., Gianfreda, L.** 2008. Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *Trametes versicolor* laccase. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 56: 1398-1407.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, I., Orru, G., Marciallis, M.A., Cristinzo, G.** 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal Applied and Bacteriology* 79: 393-398.
- Capelari, M., Zadrazil, F.** 1997. Lignin degradation and in vitro digestibility of wheat straw treated with Brazilian tropical species of white rot fungi. *Folia Microbiologica Prague* 42: 481-487.
- Cardoso, S.M., Coimbra, M.A., Lopes da Silva, J.A.** 2003. Calcium-mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydrate Polymers* 52: 125-133.

- Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S.R., Sermanni, G.G., Lo Cascio, B.** 2003. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 50: 959-966.
- Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A.** 2006. Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process Biochemistry* 41: 616-623.
- Chen, C.L., Chang, H.M.** 1985. Chemistry of lignin biodegradation. En: Biosynthesis and biodegradation of wood components (T. Higuchi, ed.) Academic Press, Orlando, USA. pp. 535-555.
- Chi, Y., Hatakka, A., Maijala, P.** 2007. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes?. *International Biodeterioration Biodegradation* 59: 32-39.
- Colao, M.C., Garzillo, A.M., Buonocore, V., Schiesser, A., Ruzzi, M.** 2003. Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes trogii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 153-158.
- Collins, P.J., Dobson, A.D.W.** 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3444-3450.
- Colombo, J.C., Cabello, M.N., Arambarri, A.M.** 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure culture of imperfect and ligninolytic fungi. *Environmental Pollution* 94: 355-362.
- Cox, L., Hermosin, M.C., Cornejo, J.** 2004. Influence of organic amendments on sorption and dissipation of imidacloprid in soil. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 84: 95-102.
- Cruz-Hernández, M., Contreras-Esquivel, J.C., Lara, F., Rodríguez, R., Aguilar, C.N.** 2005. Isolation and evaluation of tannin-degrading fungal strains from the Mexican desert. *Zeitschrift fur Naturforschung- Section C J. Bioscience* 60: 844-848.
- D'Annibale, A., Casa, R., Pieruccetti, F., Ricci, M., Marabottini, R.** 2004. *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 54: 887-894.
- D'Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V., Sermanni, G.G.** 1998. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology* 61: 209-218.
- D'Annibale, A., Quaratino, D., Federici, F., Fenice, M.** 2006. Effect of agitation and aeration on the reduction of pollutant load of olive mill

- wastewater by the white-rot fungus *Panus tigrinus*. *Biochemical Engineering Journal* 29: 243-249.
- D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Sermanni, G.G.** 2000. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* 77: 265-273.
- Dantán-González, E., Vite-Vallejo, O., Martínez-Anaya, C., Méndez-Sánchez, M., González, M.C., Palomares, L.A., Folch-Mallof, J.** 2008. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. *International Microbiology* 11: 163-169.
- Dekker, R.F.H., Barbosa, A.M., Giese, E.C., Godoy, S.D.S., Covizzi, L.G.** 2007. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Microbiology* 10: 177-185.
- De la Rubia, T., Lucas, M., Martínez, J.** 2008. Controversial role of fungal laccases in decreasing the antibacterial effect of olive mill waste-waters. *Bioresource Technology* 99: 1018-1025.
- De la Rubia, T., Ruíz, E., Pérez, J., Martínez, J.** 2002. Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavido-alba* induced by vanillin. *Archives of Microbiology* 179: 70-73.
- Dias, A.A., Bezerra, R.M., Pereira, A.N.** 2004. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology* 92: 7-13.
- Dong, J.L., Zhang, Y.W., Zhang, R.H., Huang, W.Z., Zhang, Y.Z.** 2005. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. *Journal Basic Microbiology* 45: 190-198.
- Durán, N., Esposito, E.** 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental* 28: 83-99.
- Duran, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A., Gianfreda, L.** 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 907-931.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E.** 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied Environmental Microbiology* 62: 1151-1158.
- Encinar, J.M., González, J.F., Martínez, G., Román, S.** 2009. Catalytic pyrolysis of exhausted olive oil waste. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 85: 197-203.

- Eriksson, K.E., Blanchette, R.A., Ander, P.** 1990. Microbial degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlín, New York, pp. 407.
- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F., Veness, R.G.** 1994. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology Review* 13: 235-240.
- FAOSTAT.** 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Felizón, B., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A., Guillén, A.** 2000. Steam-explosion pretreatment of olive cake. *Journal of the American Oil Chemists Society* 77: 15-22.
- Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Rodríguez, R., Felizón, B., Heredia, A., Jiménez, A.** 2000. Process for obtaining mannitol from pulp extracted from olives. Patent ES2143939 A.
- Fernández-Larrea, J., Stahl, U.** 1996. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Molecular and General Genetics* 252: 539-551.
- Filazzola, M.T., Sannino, F., Rao, M.A., Gianfreda, L.** 1999. Effect of various pollutants and soil-like constituents on laccase from *Cerrena unicolor*. *Journal of Environmental Quality* 28: 1929-1938.
- Freitag, M., Morrel, J.J.** 1992. Changes in selected enzyme activities during growth of pure and mixed cultures of the white-rot decay fungus *Trametes versicolor* and the potencial biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal Microbiology* 38: 317-323.
- Fogarty, R.V., Tobin, J.M.** 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 311-317.
- Fonseca, M.I., Shimizu, E., Zapata, P.D., Villalba, L.L.** 2009. Laccase-producing ability and the inducing effect of copper on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme and Microbial Technology*. DOI:10.1016/j.enzmictec.2009.12.017.
- Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N., Komaros, M.E., Aggelis, G.G., Lyberatos, G.** 2002. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 36: 4735-4744.
- Fujisawa-Sehara, A., Sogawa, K., Yamane, M., Fujii-Kiruyama, Y.** 1987. Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-metabolizing cytochrome P-450c gene: similarity to glucocorticoid regulatory elements. *Nucleic Acids Research* 15: 4179-4191.
- Gadagi, R.S., Krishnaraj, P.U., Kulkarni, J.H., Sa, T.** 2003. The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. *Science Horticulture—Amsterdam* 100: 323-332.

- Gadd, G.M., Griffith, A.J.** 1980. Influence of pH on toxicity and uptake of copper in *Aureobasidium pullulans*. Transactions of the British Mycological Society 75: 91-96.
- Gadd, G.M., de Rome, L.** 1988. Biosorption of copper by fungal melanin. Applied Microbiology and Biotechnology 29: 610-617.
- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C.K., Strauss, J., Haltrich, D.** 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. Microbiology 148: 2159-2169.
- Galhaup, C., Haltrich, D.** 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. Applied Microbiology and Biotechnology 56: 225-232.
- Gianfreda, L., Rao, M.A.** 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. Enzyme and Microbial Technology 35: 339-354.
- Gianfreda, L., Sannino, F., Rao, M.A., Bollag, J.M.** 2003. Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. Water Research 37: 3205-3215.
- Giardina, P., Palmieri, G., Cennamo, G., Vincenza, F., Fontanella, B., Iaccarino, M., Sannia, G.** 1998. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. Proceeding of the International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry 2: B191-B194.
- Ginzinger, D.G.** 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. Experimental Hematology 20: 503-512.
- Golz-Berner, K., Walzel, B., Zastrow, L., Doucet, O.** 2004. Cosmetic and dermatological preparation containing copper-binding proteins for skin lightening. International Patente Applications WO2004017931.
- Gómez, J., Rodríguez Solar, D., Pazos, M., Sanromán, M.A.** 2006. Applicability of *Corioloropsis rigida* for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biotechnology Letters 28: 1013-1017.
- Graystone, S.J., Campbell, C.D.** 1996. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). Tree Physiology 16: 1031-1038.
- Griffith, G.S., Rayner, A.D.M.R., Wildman, H.G.** 1994. Interspecific interactions and mycelial morphogenesis of *Hypholoma fasciculare* (Agaricaceae). Nova Hedwig 59: 47-75.
- Guillén, F., Martínez, M.J., Muñoz, C., Martínez, A.T.** 1997. Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular

- production of superoxide anion radical. Archives of Biochemistry and Biophysics 339: 190-199.
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M.J., Martínez, A.T.** 2000. Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics 383: 142-147.
- Guillén, R., Heredia, A., Felizón, B., Jiménez, A., Montano, A., Fernández-Bolaños, J.** 1992. Fiber fraction carbohydrates in *Olea europaea* (Gordal and Manzanilla Var). Food Chemistry 44: 173-178.
- Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews 13: 125-135.
- Henson, J.M., Butler, M.J., Day, A.W.** 1999. The dark side of the mycelium melanins of phytopathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology 37: 447-471.
- Hess, J., Leitner, C., Galhaup, C., Kulbe, K.D., Hinterstoisser, B., Steinwender, M., Haltrich, D.** 2002. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. Applied Biochemistry and Biotechnology-Part A. Enzyme Engineering and Biotechnology 98-100: 229-241.
- Hong, Y.Z., Zhou, H.M., Tu, X.M., Li, J.F., Xiao, Y.Z.** 2007. Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes* sp 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. Current Microbiology 54: 260-265.
- Hoshida, H., Fujita, T., Murata, K., Kubo, K., Akada, R.** 2005. Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 69: 1090-1097.
- Iakovlev, A., Stenlid, J.** 2000. Spatiotemporal patterns of laccase activity in interacting mycelia of wood-decaying basidiomycete fungi. Microbiology Ecology 39: 236-245.
- Ibañez, C.G.** 1998. Contribución al estudio de hongos xilófagos en la Provincia de Misiones, Argentina (Basidiomycetes, Aphyllophorales) II. Polyporaceae. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 33: 157-169.
- Jaouani, A., Guillén, F., Penninckx, M.J., Martínez, A.T., Martínez, M.J.** 2005. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. Enzyme and Microbial Technology 36: 478-486.
- Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthourhout, M., Penninckx, M.J.** 2003. Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. Enzyme Microbiology and Technology 33: 802-809.

- Jiménez, A., Rodríguez, R., Fernández-Caro, I., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A.** 2001. Olive fruit cell wall: Degradation of pectic polysaccharides during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 409-415.
- Joseleau, J.P., Gharibian, S., Comtat, J., Lefebvre, A., Ruel, K.** 1994. Indirect involvement of ligninolytic enzyme system in cell wall degradation. *FEMS Microbiology Review* 13: 255-263.
- Jurado, F., Cano, A., Carpio, J.** 2003. Modelling of combined cycle power plants using biomass. *Renewable Energy* 28: 743-753.
- Kaddour, S., Bouhache, M., Bouya, D.** 2005. Evolución de la viabilidad de las semillas de jopo (*Orobanche crenata* Forsk.) enterradas en una mezcla de suelo y orujo de oliva, en función de la profundidad y la duración del enterramiento. *Olivae* 103: 42-47.
- Kapellakis, I.E., Tsagarakis, K.P., Crowther, J.C.** 2008. Olive oil history, production and by-product management. *Reviews in Environmental Science and Technology* 7: 1-26.
- Kirk, T.K., Farrell, R.L.** 1987. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.
- Kissi, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G., Giardina, P., Sannia, G.** 2001. Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 221-226.
- Klonowska, A., Gaudin, C., Asso, M., Fournel, A., Reglier, M., Tron, T.** 2005. LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 34-41.
- Kohler, J., Tortosa, G., Cegarra, J., Caravaca, F., Roldán, A.** 2008. Impact of DOM from composted "alperujo" on soil structure, AM fungi, microbial activity and growth of *Medicago sativa*. *Waste Management* 28: 1423-1431.
- Koroleva, O.V., Gavrilova, V.P., Stepanova, E.V., Lebedeva, V.I., Sverdlova, N.I., Landesman, E.O., Yavmetdinov, I.S., Yaropolov, A.I.** 2002. Production of lignin modifying enzymes by co-cultivated white-rot fungi *Cerrena maxima* and *Coriolus hirsutus* and characterization of laccase from *Cerrena maxima*. *Enzyme Microbiology and Technology* 30: 573-580.
- Krogmeier, M.G., Bremner, J.M.** 1989. Effects of phenolic acids on seed germination and seedling growth in soil. *Biology and Fertility of Soils* 8: 116-122.
- Kumar, S.V.S., Phale, P.S., Durani, S., Wangikar, P.P.** 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering* 83: 386-394.

- Labbé, S., Thiele, D.J.** 1999. Pipes and wiring: the regulation of copper uptake and distribution in yeast. *Trends Microbiology* 7: 500-505.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lang, G., Cotteret, J.** 1999. Hair dye composition containing a laccase. (L'Oreal, Fr.). International Patent Applications WO9936036.
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J.** 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal and Basic Microbiology* 41: 185-227.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Hofrichter, M., Rogalski, J.** 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.
- Livak, K.J., 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.
- Lund, F.** 1995. Diagnostic characterization of *Penicillium palitans*, *P. commune* and *P. solitum*. *Letters in Applied Microbiology* 21: 60-64.
- Lyu, S.W., Blum, U.** 1990. Effects of ferulic acid, an allelopathic compound, on net P, K and water uptake by cucumber seedlings in a split-root system. *Journal of Chemical Ecology* 16: 2429-2439.
- Mai, C., Schormann, W., Milstein, O., Hüttermann, A.** 2000. Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 510-514.
- Martínez, M.J., Böckle, B., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, A.T.** 1996. MnP isoenzymes produced by two *Pleurotus* species in liquid culture and during wheat-straw solid-state fermentation. *ACS Symposium Series* 655: 183-196.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruíz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C.** 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8: 195-204.
- Martínez-García, G., Bachmann, R.Th., Williams, C.J., Burgoyne, A., Edyvean, R.G.** 2006. Olive oil waste as a biosorbent for heavy metals. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58: 231-238.
- Matos, A.J.F.S., Bezerra, R.M.F., Dias, A.A.** 2007. Screening of fungal isolates and properties of *Ganoderma applanatum* intended for olive mill wastewater decolourization and dephenolization. *Letters in Applied Microbiology* 45: 270-275.

- McGuirl, M.A., Dooley, D.M.** 1999. Copper-containing oxidases. *Current Opinion in Chemical Biology* 3: 138-144.
- Meza, J.C., Auria, R., Lomascolo, A., Sigoillot, J-C. Casalot, L.** 2007. Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 162-168.
- Michniewicz, A., Ullrich, R., Ledakowicz, S., Hofrichter, M.** 2006. The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 682-688.
- Minussi, R.C., Miranda, M.A., Silva, M.A., Ferreira, C.V., Aoyama, H., Marangoni, S., Rotilio, D., Pastore, G.M., Duran, 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. *African Journal and Biotechnology* 6: 1248-1254.
- Molina, E., Nefzaoui, A.** 1996. Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38: 227-235.
- Molina-Alcaide, E., Yáñez-Ruiz, D.R.** 2008. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: a review. *Animal Feed Science and Technology* 147: 247-264.
- Moreno, B., Vivas, A., Nogales, R., Macci, C., Masciandaro, G., Benítez, E.** 2009. Restoring biochemical activity and bacterial diversity in a trichloroethylene-contaminated soil: the reclamation effect of vermicomposted olive wastes. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 253-264.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sánchez, M., Ramos Cormenzana, A., Russel, N.J.** 2009. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 25-39.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I.** 2007. "Blue" laccases. *Biochemistry (Moscow)* 72: 1136-1150.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez M.J.** 1997a. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology* 34: 1-5.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J.** 1997b. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2166-2174.

- Mustafa, R., Muniglia, L., Rovel, B., Girardin, M.** 2005. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Research International* 38: 995-1000.
- Nicotra, S., Cramarossa, M.R., Mucci, A., Pagnoni, U.M., Riva, S., Forti, L.** 2004. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron* 60: 595-600.
- Nogales, R., Benítez, E.** 2006. Absorption of zinc and lead by *Dittrichia viscosa* grown in a contaminated soil amended with olive-derived wastes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76: 538-544.
- Nogales, R., Melgar, R., Guerrero, A., Lozada, G., Benítez, E., Thompson, R., Gómez, M.** 1999. Growth and reproduction of *Eisenia andrei* in dry olive cake mixed with other organic wastes. *Pedobiologia* 43: 744-752.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sannia, G.** 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 920-924.
- Palmieri, G., Giardina, P., Marzullo, L., Desiderio, B., Nitti, G., Cannio, R., Sannia, G.** 1993. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39: 632-636.
- Pankhurst, C.E., Hawke, B.G., McDonald, H.J., Kirkby, C.A., Buckerfield, J.C., Michelsen, P., O'Brien, K.A., Gupta, V.V.S.R., Doube, B.M.** 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35: 1015-1028.
- Paredes, C., Bernal, M.P., Cegarra, J., Roig, A.** 2002. Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. *Bioresource Technology* 85: 1-8.
- Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., Bernal, M.P.** 1999. Characterization of olive mill wastewater (alpechín) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology* 67: 111-115.
- Pérez, J., de la Rubia, T., Ben Hamman, O., Martínez, J.** 1998. *Phanerochaete flavido-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2726-2729.
- Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T.** 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 37663-37669.
- Pointing, S.B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20-33.

- Quarantino, D., Ciaffi, M., Federici, E., D'Annibale, A.** 2008a. Response surface methodology study of laccase production in *Panus tigrinus* liquid cultures. *Biochemistry Engineering Journal* 30: 236-245.
- Quarantino, D., D'Annibale, A., Federici, F., Cereti, C.F., Rossini, F., Fenice, M.** 2008b. Enzyme and fungal treatments and a combination thereof reduce olive mill wastewater phytotoxicity on *Zea mays* L. seeds. *Chemosphere* 66: 1627-1633.
- Quarantino, D., Federici, F., Petruccioli, M., Fenice, M., D'Annibale, A.** 2007. Production, purification and partial characterisation of a novel laccase from the white-rot fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 91: 57-69.
- Reinking, O.A., Manns, M.M.** 1934. Parasitic and other *Fusaria* conted in Colombia soils. *Zentbl. Bakt. Parasitkde. Abt. 2*: 502-519.
- Ribereau-Gayon, P.** 1968. *Les Composes Phenoliques des Vegetaux*. Dumond, Paris.
- Robles, A., Lucas, R., de Cienfuegos, G.A., Gálvez, A.** 2000. Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 484-490.
- Rodríguez, F.** 2006. Análisis molecular de la lacasa de *Phanerochaete flavidoalba*. Caracterización del gen y regulación por fenoles y metales. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J.** 2008. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology* 99: 5261-5269.
- Rodríguez, G., Lama, A., Trujillo, M., Espartero, J.L., Fernández-Bolaños, J.** 2009. Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT-Food Science and Technology* 42: 483-490.
- Rodríguez, M.M., Pérez, J., Ramos-Cormenzana, A., Martínez, J.** 1988. Effect of extracts obtained from olive oil mill waste waters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *Journal of Applied Bacteriology* 64: 216-219.
- Rodríguez-Cáceres, E.** 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 990-991.
- Rodríguez Couto, S., Sanromán, M.A., Gübitz, 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., Toca Herrera, J.L.** 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances* 24: 500-513.

- Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., Hatakka, A.** 1991. Influence of aromatic compounds and lignin on production of ligninolytic enzymes by *Phlebia radiata*. *Phytochemistry* 30: 2869-2872.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Cazau, M.C., Arambarri, A.M.** 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* 26: 960-969.
- Ruiz, J.C., de la Rubia, T., Pérez, J., Martínez López, J.** 2002. Effect of olive oil mill wastewater on extracellular ligninolytic enzymes produced by *Phanerochaete flavid-alba*. *FEMS Microbiology Letters* 212: 41-45.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Camarero, S., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J., Martínez, A.T.** 2001. A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochemical Society Transactions* 29: 116-122.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T.** 1999. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular Microbiology* 31: 223-235.
- Russell, A.D., Chopra, I.** 1996. *Understanding Antibacterial Action and Resistance*, 2nd ed.; Ellis Horwood: Chichester, U.K.
- Saavedra, M., Benítez, E., Cifuentes, C., Nogales, R.** 2006. Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation* 17: 93-102.
- Sambrook, J., Russell, D.** 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Vol. 1-3. 3rd Editorial Cold Spring Harbor. Laboratory Presses U.S.A.
- Sampedro, I.** 2005. Disminución de la fitotoxicidad de alpeorajo seco y extractado por hongos saprobios y arbusculares. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Sampedro, I., Romero, C., Ocampo, J.A., Brenes, M., García, I.** 2004. Removal of monomeric phenols in dry mill olive residue by saprobic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4487-4492.
- Sampedro, I., D'Annibale, A., Ocampo, J.A., Stazi, S.R., García-Romera, I.** 2005. Bioconversion of olive-mill dry residue by *Fusarium lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. *Chemosphere* 60: 1393-1400.
- Sampedro, I., Marinari, S., D'Annibale, A., Grego, S., Ocampo, J.A., García-Romera, I.** 2007a. Organic matter evolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60: 116-125.
- Sampedro, I., D'Annibale, A., Ocampo, J.A., Stazi, S.R., García-Romera, I.** 2007b. Solid-state cultures of *Fusarium oxysporum* transform aromatic components of olive-mill dry residue and reduce its phytotoxicity. *Bioresource Technology* 98: 3547-3554.

- Sampedro, I., Cajthaml, T., Marinari, S., Petruccioli, M., Grego, S., D'Annibale, A.** 2009a. Organic matter transformation and detoxification in dry olive mill residue by the saprophytic fungus *Paecilomyces farinosus*. *Process Biochemistry* 44: 216-225.
- Sampedro, I., Cajthaml, T., Marinari, S., Stazi, S.R., Grego, S., Petruccioli, M., Federici, F.** 2009b. Immobilized inocula of white-rot fungi accelerate both detoxification and organic matter transformation in two-phase dry olive-mill residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 5452-5460.
- Sansom, R.A.** 1974. *Studies in mycology*. CBS, Baarn, Netherlands.
- Sansom, R.A., Stolk, A.C., Hadlok, R.** 1976. Revision of the subsection *Fasciculata* of *Penicillium* and some allied species. *Studies in Mycology* (Baarn) 11: 1-47.
- Sánchez-López, M.I., Vanhulle, S.F., Mertens, V., Guerra, G., Figueroa, S.H., Decock, C., Corbisier, A.M., Penninckx, M.J.** 2008. Autochthonous white rot fungi from the tropical forest: potential of Cuban strains for dyes and textile industrial effluents decolourisation. *African Journal of Biotechnology* 7: 1983-1990.
- Saparrat, M.C.N.** 2004. Optimizing production of extracellular laccase from *Grammothele subargentea* CLPS no. 436 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 583-586.
- Saparrat, M.C.N., Guillén, F., Arambarri, A.M., Martínez, A.T., Martínez, M.J.** 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1534-1540.
- Saparrat, M.C.N., Jurado, M., Díaz, R., García Romera, I., Martínez, M.J.** 2010. Transformation of the water soluble fraction from "alpeorujo" by *Coriolopsis rigida*: The role of laccase in the process and its impact on *Azospirillum brasiliense* survival. *Chemosphere* 78: 72-76.
- Saparrat, M.C.N., Martínez, M.J., Tournier, H.A., Cabello, M.N., Arambarri, A.M.** 2000. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 799-803.
- Saparrat, M.C.N., Mocchiutti, P., Liggieri, C.S., Aulicino, M.B., Caffini, N.O., Balatti, P.A., Martínez, M.J.** 2008. Ligninolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain. *Process Biochemistry* 43: 368-375.
- Sarkanen, S.** 1991. Enzymatic lignin degradation. An extra-curricular view. *ACS Symposium Series* 460: 1546-1550.
- Savoie, J.M., Mata, G., Mamoun, M.** 2001. Variability in brown line formation and extracellular laccase production during interaction between white-rot

- basidiomycetes and *Trichoderma harzianum* biotype Th2. *Mycologia* 93: 243-248.
- Sayadi, S., Ellouz, R.** 1995. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolourization of olive mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1098-1103.
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A., Autio, K.** 2006. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science* 43: 152-159.
- Schoemaker, H.E., Leisola, M.S.A.** 1990. Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology* 13: 101-109.
- Schwarze, F.W.M.R., Engels, J., Mattheck, C.** 2000. Fungal strategies of decay in trees. Springer, Berlin.
- Score, A.J., Palfreyman, J.W., White, N.A.** 1997. Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. *International Biodeterioration Biodegradation* 39: 225-233.
- Scott, C., Pandey, G., Hartley, C.J., Jackson, C.J., Cheesman, M.J., Taylor, M.C., Pandey, R., Khurana, J.L., Teese, M., Coppin, C.W., Weir, K.M., Jain, R.K., Lal, R., Russell, R.J., Oakeshott, J.G.** 2008. The enzymatic basis for pesticide bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* 48: 65-79.
- Siracusa, G., la Rosa, A.D., Siracusa, V., Trovato, M.** 2001. Eco-compatible use of olive husk as filler in thermoplastic composites. *Journal of Polymers and the Environment* 9: 157-161.
- Soden, D.M., Dobson, A.D.W.** 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 147: 1755-1763.
- Solomon, E.I., Chen, P., Metz, M., Lee, S-K., Palmer, A.E.** 2001. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angewandte Chemie International Edition* 40: 4570-4590.
- Somogyi, M.** 1952. Notes on sugar determination. *Journal Biology and Biochemistry* 195: 19-23.
- Sosa, M.J., Córdoba, J.J., Díaz, C., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Asensio, M.A., Núñez, F.** 2002. Production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* isolated from dry-cured ham on a meat extract-based substrate. *Journal of Food Protection* 65: 988-992.
- Suárez, M., Romero, M.P., Ramo, T., Macía, A., Motilva, M.J.** 2009. Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential applications as food antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1463-1472.

- Sundman, V., Näse, L.** 1972. The synergistic ability of some wood-degrading fungi to transform lignins and lignosulfonates on various media. *Archives of Microbiology* 86: 339-348.
- Tekin, A.R., Dalgic, A.C.** 2000. Biogas production from olive pomace. *Resources Conservation and Recycling* 30: 301-313.
- Thom, C.** 1910. Cultural studies of species of *Penicillium*. Bureau of Animal Industry, Bulletin Nº 118, 1-109. Washington, D.C., USDA.
- Thurston, C.F.** 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.-UK* 140: 19-26.
- Tong, P., Hong, Y., Xiao, Y., Zhang, M., Tu, X., Cui, T.** 2007. High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp. *Biotechnology Letters* 29: 295-301.
- Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D., Aggelis, G.** 2002. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology* 84: 251-257.
- Uceda, M., Hermoso, M., González, J.** 1995. Evolución de la tecnología del aceite de oliva, nuevos sistemas ecológicos, ensayos y conclusiones. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 5: 93-98.
- Ullrich, R., Hofrichter, M.** 2007. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 271-293.
- Ullrich, R., Nüske, J., Scheibner, K., Spantzel, J., Hofrichter, M.** 2004. Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4575-4581.
- Velázquez-Cedeño, M.A., Farnet, A.M., Ferré, E., Savoie, J.M.** 2004. Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw. *Mycologia* 96: 712-719.
- Vinciguerra, V., D'Annibale, A., Dellemonache, G., Sermanni, G.G.** 1995. Correlated effects during the bioconversion of waste olive waters by *Lentinus edodes*. *Bioresource Technology* 51: 221-226.
- Weber, O.B., Cruz, L.M., Baldani, J.I., Doberiner, J.** 2001. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 201-205.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N.** 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22: 161-187.
- White, N.A., Boddy, L.** 1992. Extracellular enzyme localization during interspecific fungal interactions. *FEMS Microbiology Letters* 98: 75-80.

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J., White, T.J., editors. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, pp. 315-322. Academic Press, San Diego.
- Whithan, F.H., Blaydes, D.F., Deulin, R.M.** 1971. Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold Company. New York, USA. pp. 55-58.
- Widsten, P., Kandelbauer, A.** 2008. Adhesion improvement of lignocellulosic products by enzymatic pre-treatment. *Biotechnology Advances* 26: 379-386.
- Wong, D.W.S.** 2008. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157: 174-209.
- Wood, T.K.** 2008. Molecular approaches in bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 572-578.
- Xiao, Y.Z., Hong, Y.Z., Li, J.F., Hang, J., Tong, P.G., Fang, W., Zhou, C.Z.** 2006. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analysis of their differential expression. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 493-501.
- Xiao, Y.Z., Tu, X.M., Wang, J., Zhang, M., Cheng, Q., Zeng, W.Y., Shi, Y.Y.** 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from a basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 700-707.
- Yair, S., Ofer, B., Arik, E., Shai, S., Yossi, R., Tzvika, D., Amir, K.** 2008. Organophosphate degrading microorganisms and enzymes as biocatalysts in environmental and personal decontamination applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 28: 265-275.
- Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S., Varfolomeyev, S.D.** 1994. Laccase-Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 49: 257-280.
- Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., Dalbøge, H.** 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 834-841.
- Zabel, R., Morrell, J.** 1992. Wood microbiology: Decay and its prevention. Academic Press, London.
- Zhang, H., Hong, Y.Z., Xiao, Y.Z., Yuan, J., Tu, X.M., Zhang, X.Q.** 2006. Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73: 89-94.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoldi, M.** 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22: 54-57.