



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

Inducción de la actividad de lacasa del hongo termófilo

***Thielavia terrestris* Co3Bag1.**

**Purificación y caracterización bioquímica de la lacasa TtLacA
e inmovilización bajo el sistema lacasa-mediador.**

Clonación del gen *lacB* de este hongo

TESIS

Que presenta

GUTIÉRREZ ANTÓN MARINA

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de la tesis: Dra. María Eugenia Hidalgo Lara

Ciudad de México.

Septiembre, 2018

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.	8
ABREVIATURAS.	10
ÍNDICE DE TABLAS.	11
ÍNDICE DE FIGURAS.	12
RESUMEN	17
SUMMARY	18
I.ANTECEDENTES.	19
I.1 Lignina.	18
I.1.1 Biodegradación de la lignina.	20
I.1.2 Enzimas ligninolíticas.	21
I.2 Lacasas.	22
I.2.1 Organismos productores de lacasa y su función biológica.	23
I.2.1.1 Hongos productores de lacasas.	23
I.2.2 Estructura molecular.	24
I.2.3 Mecanismo catalítico y especificidad de sustrato.	27
I.2.4 Producción de lacasa.	29
I.2.4.1 Condiciones de cultivo.	30
I.2.4.2 Inducción de la producción de la lacasa.	31
I.2.4.2.1 Inducción por cobre.	32
I.2.4.3 Producción de lacasas recombinantes.	33
I.3 Sistema Lacasa-Mediador.	35
I.3.1 Mediadores sintéticos.	37
I.3.2 Mediadores naturales.	38
I.4 Inmovilización de enzimas.	38
I.4.1 Soporte y métodos de inmovilización.	39
I.4.2 Lacasas inmovilizadas.	41
I.5 Lacasas en la Industria Biotecnológica.	44

I.6 Antecedentes directos.	46
I.6.1 <i>Thielavia terrestris</i> .	46
I.6.2 Lacasa de <i>Thielavia terrestris</i> Co3Bag1.	47
II. JUSTIFICACIÓN.	49
III. HIPÓTESIS.	50
IV. OBJETIVOS.	51
IV.1 Objetivo general.	51
IV.2 Objetivos específicos.	51
V. METODOLOGÍA.	52
VI. MATERIALES Y METODOS.	53
VI.1 Microorganismos y vectores.	53
VI.1.1 Vectores.	53
VII.1.1 Vector de clonación pJET1.2.	53
VII.1.2 Vector de expresión p210/HYG.	54
VI.2 Medios de cultivo.	54
VI.2.1 Medios de cultivo de la cepa <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.	54
VI.2.2 Medio de cultivo para la cepa <i>A. niger</i> .	56
VI.2.3 Medio de cultivo de la cepa <i>E. coli</i> .	56
VI.3 Evaluación de la actividad de lacasa de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1 con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, y el ion Cu ²⁺ .	57
VI.3.1 Cinética de crecimiento y actividad de lacasa.	57
VI.3.1.1 Cuantificación de la actividad de lacasa.	57
VI.3.1.2 Cuantificación de proteína.	58
VI.3.2 Fuentes de carbono y nitrógeno .	58
VI.3.3 Inducción por cobre.	59
VI.4 Purificación de TtLacA del hongo <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.	59
VI.4.1 Ultrafiltración y diálisis.	59
VI.4.2 Purificación de la lacasa por cromatografía de intercambio iónico.	60
VI.4.2.1 SDS-PAGE.	60
VI.4.2.2 Zimograma.	60
VI.4.3 Secuenciación de proteínas y modelo 3D.	61

VI.5. Caracterización bioquímica de TtLacA.	61
VI.5.1 pH óptimo y estabilidad.	61
VI.5.2 Temperatura óptima y termoestabilidad.	62
VI.5.3 Parámetros cinéticos (K_M y V_{max}).	62
VI.5.4 Efecto de iones metálicos e inhibidores.	62
VI.6. Inmovilización de la actividad de lacasa y de TtLacA.	63
VI.6.1 Inmovilización de la actividad lacasa en nylon-6.	63
VI.6.1.1 Decoloración de tinte sintético azul de bromofenol.	64
VI.6.2 Inmovilización de la actividad de lacasa en perlas de alginato-Ca ²⁺ .	64
VI.6.3 Inmovilización de TtLacA en perlas de alginato-Cu ²⁺ .	64
VI.6.3.1 Caracterización bioquímica de TtLacA inmovilizada.	65
VI.7. Cuantificación de eficiencia de enlace.	65
VI.8. Reutilización de la actividad de lacasa y de TtLacA inmovilizada.	65
VI.9 Inmovilización de TtLacA-mediador.	65
VI.10 Evaluación de la actividad catalítica de TtLacA inmovilizada sobre sustrato no fenólico en un sistema: Lacasa-Mediador .	66
VI.11 Reutilización de TtLacA-ABTS inmovilizado.	66
VI.12 Clonación de un gen que codifica para una lacasa de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.	66
VI.12.1 Extracción de ácidos nucleicos de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.	66
VI.12.1.1 Extracción de ARN total.	67
VI.12.1.2 Extracción de ADN genómico de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.	67
VI.12.1.3 Extracción de ácidos nucleicos de <i>A. niger</i> .	67
VI.12.2 Síntesis de cDNA y amplificación del gen <i>lacB</i> .	68
VI.12.3 Transformación de células <i>E. coli</i> DH5- α .	70
VI.12.3.1 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> DH5- α .	70
VI.12.4 Amplificación del gen <i>lac</i> a partir de ADN genómico de <i>A. niger</i> .	70
VI.13 Electroforesis en gel agarosa.	71
VI.14 Análisis de secuencias.	71
VII. RESULTADOS.	73
VII.1 Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la actividad lacasa del hongo termófilo <i>Thielavia terrestris</i> Co3Bag1.	73

VII.1.1 Efecto de la concentración de fuente de carbono y nitrógeno en la actividad de lacasa.	76
VII.2 Efecto de cobre sobre la actividad de lacasa.	77
VII.3 Purificación de TtLacA del hongo <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.	82
VII.3.1 Secuenciación de TtLacA.	83
VII.3.2 Predicción del modelo 3D de la multicobre-oxidasa.	87
VII.4 Caracterización bioquímica de TtLacA.	88
VII.4.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de TtLacA y su estabilidad	88
VII.4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de TtLacA y su termoestabilidad.	89
VII.4.3 Parámetros cinéticos (K_M y V_{max}) de TtLacA.	89
VII.4.4 Efecto de iones metálicos, EDTA y NaN_3 .	89
VII. 5 Inmovilización de la actividad de lacasa y de TtLacA.	90
VII. 5.1 Inmovilización de la actividad de lacasa en nylon-6.	91
VII.5.2 Inmovilización de la actividad de lacasa en perlas de alginato de calcio.	91
VII.5.3 Inmovilización de TtLacA.	92
VII.6 Caracterización bioquímica de TtLacA inmovilizada.	92
VII.6.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de TtLacA inmovilizada y su estabilidad.	92
VII.6.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de TtLacA inmovilizada y su termoestabilidad.	93
VII.6.3 Parámetros cinéticos (K_M y V_{max}) de TtLacA inmovilizada.	94
VII.6.4 Efecto de iones metálicos, EDTA y NaN_3 sobre la actividad de TtLacA inmovilizada.	95
VII.7 Reutilización de TtLacA inmovilizada.	96
VII.8 Inmovilización de TtLacA-mediador .	96
VII.9 Evaluación de la actividad catalítica de TtLacA-mediador .	96
VII.10 Reutilización de TtLacA-ABTS inmovilizador.	97
VII.11 Clonación de un gen que codifica para una lacasa de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.	98
VII.11.1 Síntesis de cDNA y amplificación del gen <i>lac</i> .	98
VII.11.2 Secuenciación del genoma de <i>T. terrestris</i> Co3Bag1.	99

VII.11.3 Análisis de la secuencia del gen <i>lacB</i> .	100
VII.11.4 Clonación del gen <i>lacB</i> en vector de clonación y transformación de <i>E.coli</i> DH5 α y <i>A. niger</i> .	101
VIII. DISCUSIÓN.	104
IX. CONCLUSIONES.	118
X. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.	119
XI. ANEXOS.	120
XI. Anexo A.	120
XI. Anexo B.	122
XI. Anexo C.	125
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	126

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por haberme otorgado la beca con número de registro 233424, para realizar mis estudios de Doctorado en Ciencias con la especialidad en Biotecnología.

ABREVIATURAS

Å	Amperes
ABTS	2,2'-azinobis-(3-eilbenztiazolina-6-sulfonato)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AEE	actividad enzimática específica
aa	aminoácidos
ARN	ácido ribonucleico
DMP	2,6-dimetoxifenol
DO ₀₀	Densidad óptica medida a.
EDTA	ácido etilendiamino tetraédrico
kb	kilo base
kDa	kilo Dalton
MCO	oxidasa multicobre (multicopper oxidase)
nm	nanómetros
pb	pares de bases
ORF	marco abierto de lectura
PCR	reacción en cadena de la ADNpolimerasa
RT-PCR	reverso transcriptasa PCR
T _m	temperatura de fusión de oligonucleótidos
CTN	cluster trinuclear
TtLacA	lacasa de <i>Thielavia terrestris</i>
SLM	Sistema Lacasa-mediador
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis/ electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla VI.1 Medios de cultivo con diferentes proporciones de fructosa y nitrato de sodio	
Tabla VI.2 Secuencia de oligonucleótidos para amplificar el ORF del gen <i>lacB</i> .	68
Tabla VI.3 Secuencia de oligonucleótidos con sitios de restricción para SpeI (directo) y PacI (reverso) para amplificar el gen <i>lacB</i> .	69
Tabla VII.1 Etapas de purificación de la lacasa TtLacA.	82
Tabla VII.2 Posición en la secuencia de aminoácidos de los sitios de unión a cobre, glicosilación y enlaces disulfuro.	86

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura I.1** Estructura química de los tres alcoholes hidroxicinamílicos que polimerizan el complejo lignina (Tomado de: Sen et al., 2015). 18
- Figura I.2** Representación 3D del sitio activo lacasa. Imagen creada con PyMol de código abierto a partir de la estructura cristalina de una lacasa de *Trametes versicolor* (archivo PDB 1GYC) (izquierda). Representación esquemática del sitio activo de la misma lacasa que muestra la coordinación de residuos (derecha). Imagen tomada de Cannatelli y Ragauskas (2016). 25
- Figura I.3** Representación esquemática del sistema lacasa-mediador (Tomada de Barreca et al., 2003). 36
- Figura VI.1** **A**-Vector de clonación pJET1.2 (izquierdo); **B**-Vector de expresión p210/HYG (derecho). 54
- Figura VII.1** Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad de lacasa y cinética de crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1. **A**, glucosa; **B**, fructosa; **C**, maltosa y **D**, almidón 75.
- Figura VII.2** Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad de lacasa y cinética de crecimiento *T. terrestris* Co3Bag1. **A**, nitrato de sodio; **B**, sulfato de amonio, **C**; extracto de levadura y **D**, peptona. 76
- Figura VII.3** Efecto de la concentración de fructosa y nitrato de sodio sobre la actividad de lacasa en *T. terrestris* Co3Bag1 en medio líquido. El medio HCLN, alto contenido de carbono y bajo contenido de nitrógeno; LCLN, bajo contenido de carbono y bajo contenido de nitrógeno; HCHN, alto contenido de carbono y alto contenido de nitrógeno) y LCHN, bajo contenido de carbono y alto contenido de nitrógeno. 77
- Figura VII.4** Efecto del cobre sobre la actividad de lacasa por *T. terrestris* Co3Bag1 en medio HCHN. Medio suplementado con diferentes concentraciones de CuSO₄añadido al inicio del cultivo (↓0 día). Control (rojo); 0.20 mM (azul); 0.50 mM (morado); 1.0 mM (verde), 2.0 mM (amarillo); 2.5 mM (azul oscuro). 78
- Figura VII.5.** Efecto del cobre sobre la actividad de lacasa por *T. terrestris*Co3Bag1 en medio HCHN. Medio suplementado con diferentes concentraciones de CuSO₄ añadido

en la fase estacionaria de crecimiento ($\downarrow 8^\circ$ día). Control (rojo); 0.20 mM (azul); 0.50 mM (morado); 1.0 mM (verde), 2.0 mM (amarillo); 2.5 mM (azul oscuro). 79

Figura VII.6 Efecto del cobre sobre la actividad de lacasa por *T. terrestris* Co3Bag1 en medio HCHN. Medio suplementado con diferentes concentraciones de CuSO_4 añadido en la fase logarítmica de crecimiento ($\downarrow 4^\circ$ día). Control (rojo); 0.20 mM (azul); 0.50 mM (morado); 1.0 mM (verde), 2.0 mM (amarillo); 2.5 mM (azul oscuro). 80

Figura VII.7 Zimograma de actividad de lacasa. Muestras tomadas del día máximo de actividad de lacasa (día entre paréntesis), en medio modificado HCHN suplementado con diferentes concentraciones de CuSO_4 . 81

Figura VII.8 Efecto del cobre añadido en la fase logarítmica de crecimiento ($\downarrow 4^\circ$ día) sobre la actividad de lacasa y crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1 en medio HCHN. Actividad de lacasa (UL^{-1}), representado en barras: CuSO_4 a 1 mM, (----) y sin cobre (—). Biomasa (gL^{-1}) representado en líneas: CuSO_4 a 1 mM (----) y sin cobre (—). 82

Figura VII.9 A. Purificación de TtLacA del sobrenadante de cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1. Carriles: 1, marcador de PM conocido; 2, lacasa purificada. **B.** Análisis zimográfico, 1, ABTS como sustrato y 2, DMP, como sustrato. 83

Figura VII.10 Secuencia de aminoácidos de multicobre oxidasa de *T. terrestris* NRRL 8126. Los 5 péptidos de TtLacA son visualizados en color azul. 84

Figura VII.11 Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos y representación de elementos de la estructura secundaria (α , β y giros), así como los sitios de unión a cobre (*), en base a la asignación automática de la estructura de la proteína 3QPK de *Melanocarpus albomyces* LAC1_MELAO. 85

Figura VII.12 Predicción del modelo de lacasa de *T. terrestris* NRRL 8126, obtenido por el servidor I-TASSER. Las α -hélice están indicadas en color rosa y las β -lamina en color amarillo. 87

Figura VII.13 Efecto del pH sobre la actividad de TtLacA (A) y su estabilidad (B). El pH óptimo fue determinado a 50°C utilizando dos amortiguadores a 100 mM: glicina-HCl ($-\blacksquare-$) y citratos fosfatos ($-\blacktriangle-$). La actividad residual fue calculada incubando la enzima 50 min a 25°C . 88

Figura VII.14 Efecto de la temperatura sobre la actividad de TtLacA (A) y su termoestabilidad (B). La temperatura óptima fue determinada utilizando el amortiguador

- de glicina-HCl a 100 mM, pH 3.0. La vida media se determinó a diferentes tiempos incubación a $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm$ de su temperatura óptima. 89
- Figura VII.15** Análisis por Michaelis-Menten y por Lineweaver-Burk para el cálculo de K_M y V_{max} para el ABTS en amortiguador de glicina-HCl 100 mM, a pH 3.0. 90
- Figura VII.16** Efecto de los iones metálicos, EDTA y azida de sodio sobre la actividad de TtLacA en dos concentraciones diferentes 1 y 10 mM. La enzima se incubó en amortiguador glicina-HCl 100 mM, pH 3.0 que contenía cada uno de los componentes durante 5 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. 91
- Figura VII.17** Número de reúsos de las perlas de alginato de Ca^{2+} con el extracto enzimático. 92
- Figura VII.18** Efecto del pH sobre la actividad de TtLacA inmovilizada (**A**) y su estabilidad (**B**). El pH óptimo fue determinado a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando dos amortiguadores a 100 mM: glicina-HCl (—■—) y citratos fosfatos (—▲—). La actividad residual fue calculada incubando la enzima 50 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. 93
- Figura VII.19** Efecto de la temperatura sobre la actividad de TtLacA inmovilizada (**A**) y su termoestabilidad (**B**). La temperatura óptima fue determinada utilizando el amortiguador de glicina-HCl a 100 mM pH 3.0. La vida media se determinó a diferentes tiempos incubación a $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm$ de su temperatura óptima. 94
- Figura VII.20** Análisis por Michaelis-Menten y por Lineweaver-Burk para el cálculo de K_M y V_{max} para el ABTS en amortiguador de glicina-HCl 100mM, pH 3.0 a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. 95
- Figura VII.21** Efecto de los iones metálicos, EDTA y azida de sodio sobre la actividad de TtLacA inmovilizada en dos concentraciones diferentes 1 y 10 mM. 95
- Figura VII.22** Número de reúsos de las perlas de alginato de Cu^{2+} con TtLacA. 95
- Figura VII.23** Efectos de TtLacA ABTS, TtLacA-ABTS y TtLacA-ABTS inmovilizado en perlas de alginato- Cu^{2+} sobre la oxidación de alcohol veratrílico a veratraldehído. 96
- Figura VII.24** Número de reúsos de las perlas de alginato de Cu^{2+} con TtLacA-ABTS. 97
- Figura VII.25** Análisis electroforético en gel agarosa 0.8 % a 100 V. Carriles 1-3 RNA total de *T. terrestris* Co3Bag1. 98

- Figura VII.26** Análisis electroforético en gel agarosa 0.8 % a 100 V. Carriles 1, marcador 1 kb “DNA ladder”; 2, producto de RT-PCR purificado. .. 98
- Figura VII.27** Análisis electroforético en gel agarosa 1.0 % a 100 V. Carriles: 1, 1 kb “DNA ladder”; 2-3, ADN genómico. 99
- Figura VII.28** Secuencia del ORF del gen *lacB* (1716 pb) codifica para una proteína de 572 aa (PM 63 kDa). Péptido señal 21 aa (rojo). Cuatro regiones de unión a cobre (HXH, sombreado gris-azul). Sitios potenciales de N-glicosilación (8): Asn-X-Ser-Thr (subrayado). 100
- Figura VII.29** Análisis electroforético en gel agarosa 1.0 % a 100 V. Carriles: 1, 1 kb “DNA ladder”; 2, Producto de PCR gen completo *lacB*. 101
- Figura VII.30** Análisis electroforético en gel agarosa 1.0 % a 100 V. Carriles: **A-** Carriles M, 1 kb “DNA ladder” y 1-14, material plasmídico de las clonas positivas. **B-** 1, 1 kb “DNA ladder”; 2-4, fragmentos procedentes de la digestión de *lac/pJET1.2* con BgIII, de las clonas 2, 6 y 10 respectivamente. **C-** 1, 1 kb “DNA ladder”, 2, fragmento procedente de la amplificación de *lacB* a partir de la clona 10. 102
- Figura VII.31** Análisis electroforético en gel agarosa 1.0 % a 100 V. Carriles: **A-** Carriles M, 1 kb “DNA ladder” y 1-14, material genómico de las clonas positivas (1-9); 11-14, genómico de las clonas positivas (12-19) y 16, control positivo de *A. niger* WT. 103
- Figura VII.32** Análisis electroforético en gel agarosa 1.0 % a 100 V. Carriles: **A** 1, 1 kb “DNA ladder”; 2-5, ADN genómico de *A. niger* (clonas 2, 7, 12 y 13). **B.** 1 kb “DNA ladder”; 2-5, fragmentos amplificados de *A. niger* (clonas 2, 7, 12 y 13). 103

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la producción, purificación y caracterización bioquímica de una lacasa secretada por el hongo Ascomiceto termófilo *Thielavia terrestris* Co3Bag1. El efecto de diferentes fuentes de carbono / nitrógeno y la adición de cobre como inductor durante la fase logarítmica de cultivo (4º día) proporcionaron la principal contribución al aumento de la producción de lacasa en cultivo líquido. La actividad enzimática máxima se logró usando un medio que contiene fructosa (20 gL^{-1}) y nitrato de sodio (5 gL^{-1}) suplementado con $\text{Cu}^{2+} 1 \text{ mM}$ fue de $862,76 \text{ UL}^{-1}$ en el décimo día de cultivo, 34 veces mayor que el obtenido en medio sin cobre ($25,28 \text{ UL}^{-1}$). En estas condiciones, se purificó una lacasa (designada como TtLacA) usando cromatografía de intercambio iónico, con actividad específica de $1,852 \text{ Umg}^{-1}$ y un factor de purificación de 15,6 veces. La lacasa TtLacA presenta una masa molecular de aproximadamente 70 kDa, estimada mediante SDS-PAGE, y su secuencia en aminoácidos mostró una identidad del 100 % con una multicobre oxidasa de *T. terrestris* NRRL8126. La lacasa purificada se inmovilizó por atrapamiento en perlas de alginato- Cu^{2+} . Los resultados de optimización revelaron que al usar ABTS como sustrato de lacasa libre e inmovilizada, la temperatura óptima fue de $65 \text{ }^\circ\text{C}$ y $70 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente, mientras que el pH óptimo fue de pH 3,0 en ambas. El análisis cinético mostró una K_M de 0,26 mM y 0,45 mM y V_{max} de $3,571 \text{ Umg}^{-1}$ y $2,865 \text{ Umg}^{-1}$ para lacasa libre e inmovilizada respectivamente. También se evaluó la susceptibilidad de TtLacA para dos inhibidores putativos y cationes metálicos. La actividad de TtLacA libre e inmovilizada se inhibió ligeramente por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) pero se inhibió fuertemente por la azida sódica (NaN_3), también fue inhibida por varios cationes metálicos, especialmente Hg^{2+} y Ag^{2+} ; sin embargo, la TtLacA inmovilizada mostró ser más estable en presencia de estos compuestos que la TtLacA libre. Además, TtLacA se inmovilizó en perlas de alginato de Cu con ABTS como mediador en condiciones estandarizadas. Los resultados mostraron que en presencia de ABTS, TtLacA también puede oxidar un compuesto no fenólico. El alcohol veratrílico fue oxidado por el sistema TtLacA-ABTS (LMS) para dar veratraldehído. La eficiencia de unión de LMS inmovilizado fue del 80 %. Se observó que LMS conserva más del 50 % de su actividad después de dos ciclos repetidos. El proceso desarrollado puede ser útil para aplicaciones biotecnológicas. Este estudio proporciona una primera base para la comprensión de la producción de lacasa por *T. terrestris* Co3Bag1.

SUMMARY

The production, purification and characterization of a laccase enzyme secreted by the Ascomycete thermophile fungus *T. terrestris* Co3Bag1 were performed. The effect of different carbon/nitrogen sources and the addition of copper as inducer during the logarithmic phase of cultivation (4th day) provided the main contribution to the enhancement of laccase production in submerged fermentation (Smf). Maximum enzyme activity was achieved using a medium containing fructose (20 gL⁻¹) and sodium nitrate (5 gL⁻¹) supplemented with 1 mM Cu²⁺ was 862.76 UL⁻¹ at the 10th day of culture, 34.1 times higher than that obtained in medium without copper (25.28 UL⁻¹). Under these conditions a laccase (designated as TtLacA) was purified using ion-exchange chromatography, with specific activity of 1.852 U mg⁻¹ and 15.6-fold purification. TtLacA was found to be a protein with a molecular mass of about 70 kDa estimated by SDS-PAGE and its amino-acid sequence showed 100% identity to multi-copper from *T. terrestris* NRRL8126. Purified laccase was immobilized by entrapment method to Cu-alginate bead. Optimization results revealed that by using ABTS substrate of the free and Cu-alginate bead immobilized laccase the optimum temperature were 65 °C and 70 °C respectively, while the optimum pH was 3.0 for both enzymes. Kinetic analysis showed K_M of 0.26 mM and 0.45 mM and V_{max} of 3.571 Umg⁻¹ and 2.865 Umg⁻¹ by free and Cu-alginate bead immobilized laccase respectively. The susceptibility of laccase towards two putative inhibitors and metal cations was also assessed. The free and immobilized TtLacA activity was slightly inhibited by ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) but strongly inhibited by sodium azide (NaN₃). Laccase activity was also inhibited by several metal cations, especially Hg²⁺ and Ag²⁺, though, the immobilized TtLacA showed to be more stable in the presence of these compounds than the free TtLacA. Additionally TtLacA was immobilized in Cu-alginate bead with ABTS as a mediator under standardized conditions. Results showed that in the presence of ABTS, TtLacA can also oxidize non-phenolic compound. Veratryl alcohol was oxidized by TtLacA-ABTS system (LMS) to give veratraldehyde. The binding efficiency of immobilized LMS was found to be 80 %. It was observed that LMS retains more than 50 % its activity after two repeated cycling. The developed process can be made useful for on biotechnology application. This study provides a first basis for understanding of laccase production by *T. terrestris* Co3Bag1.

I. ANTECEDENTES

I.1 Lignina

La pared celular vegetal se compone de diferentes polímeros, incluyendo celulosa y hemicelulosa, los cuales están íntimamente asociados con lignina, que comprende de un 20-32 % en peso de biomasa ligninocelulósica (Chen et al., 2011) y es el segundo biopolímero más abundante sobre la tierra, sólo después de la celulosa (Cannatelli y Ragauskas, 2016). El botánico suizo A.P. Candolle (1778-1841) utilizó por primera vez el término "lignina" (derivado del latín *lignum*→madera) y posteriormente Schulze et al. (1865), utilizaron el término para describir la parte disuelta de madera cuando se trata con ácido nítrico.

Lignina es un biopolímero aromático complejo que es sintetizado por el acoplamiento de alcoholes hidroxicinamílicos (Lacayo et al., 2013), también llamados monolignoles, entre los que se encuentran: alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol *p*-cumarílico, y dentro del complejo de lignina los monolignoles correspondientes se denominan: guayacil (G), sinapílico (S) e hidroxifenil (H) (**Fig. I.1**) (Munk et al., 2014; Sen et al., 2015). La composición de lignina varía entre especies de plantas y tejidos, generalmente las ligninas de gimnospermas son especies ricas en unidades de tipo G y contienen bajas cantidades de unidades de tipo H; mientras que las dicotiledóneas se componen por unidades de tipo G y S (Weng y Chapple, 2010).

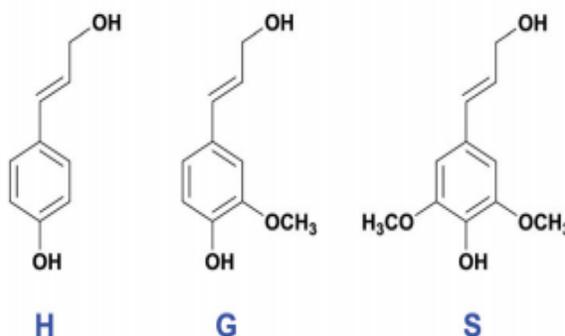


Figura I.1 Estructura química de los tres alcoholes hidroxicinamílicos que polimerizan el complejo lignina (Tomado de: Sen et al., 2015).

I.1.1 Biodegradación de la lignina

La lignina es uno de los polímeros más difícil de degradar, característica ideal para una barrera defensiva contra los patógenos, herbívoros y otras tensiones ambientales; además es componente fundamental en la preservación estructural de la pared celular vegetal que proporciona rigidez y fuerza a las plantas (Wei et al., 2009; Liu et al., 2011; Fang et al., 2018).

La lignina puede ser aislada del material lignocelulósico mediante una variedad de procesos que implican diferentes métodos mecánicos y/o químicos. El primer método incluye métodos en los que se libera la celulosa y hemicelulosa mediante solubilización, dejando la lignina como residuo insoluble; mientras que el segundo método implica la disolución de la lignina, dejando como residuos insolubles la celulosa y la hemicelulosa, seguido de la recuperación de lignina a partir de la fase líquida (Chávez y Domine, 2013). La desventaja de estos métodos es que emplean procesos drásticos y de alto costo (Saritha et al., 2011). Por el contrario, los pre-tratamientos biológicos y/o enzimáticos son mucho más suaves y amigables con el medio ambiente (Pandey, 2009).

Los organismos capaces de degradar biomasa lignocelulósica son principalmente hongos de podredumbre, bacterias de rumiantes y termitas (Asina et al., 2016; Ni y Tokuda 2013); sin embargo, los hongos son más efectivos para la deslignificación debido a su distribución de hifas, que pueden penetrar en la madera (Wong, 2009; Arora y Sharma, 2010).

Dependiendo de su modo de ataque, los hongos se clasifican en tres principales categorías: hongos de la pudrición blanda, hongos de pudrición parda-marrón y hongos de podredumbre blanca (Arora y Sharma, 2010). Los hongos de la pudrición blanda, descomponen la madera y provoca su ablandamiento, además dejan cavidades microscópicas dentro de la pared secundaria, y su sistema ligninolítico no presenta un potencial oxidativo apropiado para atacar grupos guayacilo de lignina. Los hongos de pudrición parda-marrón crecen principalmente en coníferas y representan sólo el 7% de los basidiomicetos (Martínez et al., 2005). A diferencia de los hongos de podredumbre

blanca, los hongos de podredumbre parda-marrón degradan principalmente polisacáridos de celulosa y hemicelulosa de la madera, mientras se modifica parcialmente la lignina y, como resultado de este tipo de desintegración, la madera se contrae y muestra una coloración marrón debido a la lignina oxidada (Ahmed et al., 2013). Finalmente, los hongos de podredumbre blanca degradan la lignina dejando un color blanquecino y textura fibrosa en la madera podrida; estos hongos atacan preferentemente a la lignina que a la hemicelulosa y a la celulosa (Arora y Sharma, 2010).

Cabe destacar que los hongos de podredumbre blanca son los más eficaces para la deslignificación debido a la producción de un complejo de enzimas oxidativas extracelular ligninolíticas, además son capaces de degradar la celulosa que sirve como co-sustrato y fuente de energía para oxidar cadenas laterales y compuestos aromáticos (Luley 2006). Algunos de los hongos de podredumbre blanca más efectivos para la deslignificación son: *Coriolus versicolor*, *Phanerochaetes chrysosporium* y *Trametes versicolor*, los cuales se consideran los hongos más eficientes para la degradación de lignina (Dashtban et al., 2009).

I.1.2 Enzimas ligninolíticas

La degradación de la lignina ocurre con un proceso complejo donde se involucran diferentes clases de enzimas, las cuales han sido clasificadas en la base de datos de familias CAZy (Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes)) (Levasseur et al., 2013). Las enzimas implicadas en la degradación de lignina son principalmente lignina peroxidasa (ligninasa LiP; EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13), peroxidasa versátil (VP; EC 1.11.1.16) y lacasa (EC 1.10.3.2); otras enzimas que actúan de forma cooperativa son: glioxal oxidasa (EC 1.2.3.5), aril alcohol oxidasa (veratril alcohol oxidasa; EC 1.1.3.7), piranososa 2-oxidasa (glucosa 1-oxidasa; EC 1.1.3.4) y celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.5.1) (Wong, 2009; Chen et al., 2011). Aunque la acción protectora de las redes de lignina / hemicelulosa y las estructuras cristalinas de la celulosa incrustada hacen que el material de lignocelulosa sea resistente al ataque enzimático externo, se han llevado a cabo investigaciones en las que se aplican técnicas proteómicas avanzadas y análisis de secretoma (Guo et al., 2018).

La lignina peroxidasa es una hemoproteína inespecífica, ya que oxida sustratos fenólicos aromáticos y también una variedad de compuestos del modelo de lignina no fenólica (Shaheen et al., 2017); así como una gama de compuestos orgánicos con un potencial redox de hasta 1.4 V en presencia de H₂O₂ (Valli et al., 1990). La actividad enzimática de LiP se mide convenientemente por el aumento de la Absorbancia a 310 nm en la oxidación del alcohol veratrílico (VA; alcohol 3,4-dimetioxibencílico) (Wong 2009). La MnP es una hemo-proteína que cataliza la oxidación de Mn²⁺ a Mn³⁺, ion que es capaz de oxidar compuestos fenólicos cuando se encuentra quelado por ácidos orgánicos (Lobos 2009). Algunos autores indican que la MnP actúa sobre los mismos sustratos que LiP, a diferencia de que ocupa el manganeso como mediador redox (Hüttermann y Kharazipour 2001). Estas enzimas con características de LiP y MnP son las peroxidasa versátiles, que actúan en ambos sustratos, fenólicos y no fenólicos, en presencia de iones Mn²⁺ (Wong 2009). La lacasa es una polifenoloxidasas que oxida compuestos fenólicos, pero también tiene la capacidad de oxidar compuestos no fenólicos en presencia de mediadores (Chen et al., 2011).

I.2 Lacasas

Las lacasa han sido objeto de estudio desde finales del siglo pasado. En 1883 la lacasa fue descrita por primera vez por Yoshida cuando la extrajo de la laca de los exudados del árbol Japonés, *Rhus vernicifera* (Yoshida 1883). Algunos de los sinónimos para lacasa son: urishiol o urushiol oxidasa, *p*-difenol oxidasa, *p*-difenol oxidasa:dioxígeno oxidoreductasa, benzenodiol: oxígeno oxidoreductasa (Kües y Rühl, 2011).

Su característica de ser una oxidasa que contiene un metal fue descubierta por Bertrand (1985). Pertenecen al grupo de las oxidasa multicobre, donde también se engloban la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina (Salomon et al., 1996). Del grupo de enzimas catalogado como oxidasa y oxigenasa, tan sólo las oxidasa multicobre y la citocromo C oxidasa, son capaces de llevar a cabo la reducción del oxígeno molecular a dos moléculas de agua como único subproducto en un mecanismo de transferencia de cuatro electrones acoplado a la oxidación de los sustratos correspondientes (Giordana et al., 2010; Rodgers et al., 2010) y sin la formación de intermediarios tóxicos como el

peróxido de hidrógeno, como es la enzima glioxal oxidasa (Whittaker et al., 1996), siendo así un biocatalizador “eco-friendly”, razón por la cual ha sido de gran interés científico para aplicaciones biotecnológicas (Mate et al., 2010).

A continuación se describe las principales características de las lacasas, fijando la atención en lacasas de hongo, clase a la que pertenece la lacasa de *T. terrestris* Co3Bag1 utilizada en la presente tesis.

I.2.1 Organismos productores de lacasa y su función biológica

Las lacasas se encuentran distribuidas principalmente en hongos, plantas e insectos (Cannatelli y Ragauskas, 2017) sin embargo, en recientes años se han detectado en bacterias (Kumar et al., 2018) e incluso algas (Otto et al., 2014) y dependiendo del organismo su función es muy diversa por ejemplo, en plantas las lacasas están implicadas ante la respuesta a una lesión (Davies y Duros, 2001) o en la pigmentación de las semillas mediante polimerización de flavonoides (Pourcel et al., 2005). En insectos las lacasa se relacionan con la formación del exoesqueleto, al catalizar la reacción de entrecruzamiento entre las proteínas estructurales del insecto y derivados del catecol (Kramer et al., 2001). Además se han aislado lacasas de glándulas salivales de *Nephotettix cincticeps* implicadas en la detoxificación de compuestos fenólicos derivados de las plantas que ingieren y en la gelificación de la saliva (Hattori et al., 2010).

Otto et al, (2010) publicó uno de los primeros trabajos de lacasas en algas, donde propone que su función esta implicadas en la renovación de la materia orgánica del suelo. Por último, en los hongos, las lacasas son responsables de la formación de cuerpos fructíferos, la pigmentación, la morfogénesis, la patogenia de las plantas y la virulencia fúngica además de la síntesis de sustancias húmicas en el suelo y en la degradación de la lignina (Cannatelli y Ragauskas, 2017).

I.2.1.1 Hongos productores de lacasas

Las lacasas fúngicas fueron descubiertas por Bertrand (1896), y están presentes principalmente en Basidiomicetos, particularmente hongos de podredumbre blanca

como: *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum* han sido considerado como los mejores productores de lacasas (Shraddha et al., 2011; Bodke et al., 2012).

La producción de lacasa se ha encontrado también en Ascomicetos aunque mucho menos estudiada. *Trichoderma* y *Botryosphaeria* se han reportado como ascomicetos degradadores de madera con actividad de lacasa. *Botryosphaeria* produce una lacasa constitutiva capaz de oxidar 2.6-dimetoxifenol (DMP) como sustrato, considerada como una lacasa verdadera y *Trichoderma* exhibe un bajo nivel de producción de lacasas oxidando siringaldazina como sustrato (Brijwani et al., 2010).

Algunas lacasas de Ascomicetos han sobresalido por ser moderadamente termoestables como: *Monocillium indicum*, *Chaetomium thermophilum*, *Botryosphaeria rhodina*, *Paraconiothyrium variable* y *Xylaria* sp, entre otros (Thakker et al., 1992; Chofeta et al., 1998; Dekker et al., 2007; Forootanfar et al., 2011; Castaño et al., 2015). También ya se ha caracterizado una primera lacasa alcalina a partir de *Trametes* sp. (Daassi et al., 2013) siendo en su mayoría lacasas ácidas (Baldrian, 2006).

Arora y Sharma (2010), reportaron diferentes hongos ligninolíticos productores de lacasa, un ascomiceto (*Neurospora*), hongos imperfectos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*) y hongos de podredumbre parda (*Gleophyllum*). Este último grupo de hongos de podredumbre parda es típico por su incapacidad para descomponer lignina; sin embargo, secuencias de ADN de *Gleophyllum trabeum* conservan una alta similitud con un lacasa con hongos de podredumbre blanca (Baldrian, 2006). Un segundo reporte demuestra la producción de lacasa en *Coniophora puteana*, también un hongo de podredumbre parda con secuencias de ADN similares a lacasas de hongos de podredumbre blanca (Dashtban et al., 2010).

La producción de lacasa no se ha reportado en hongos inferiores, es decir, Zigomicetos y Chitridiomicetos. Sin embargo, estos grupos aún no se han estudiado en detalle (Arora y Sharma 2010).

I.2.2 Estructura molecular

Las lacasas presentan cuatro átomos de cobre que forman los centros T1, T2 y T3 típicos de las oxidasas multicobre (**Fig. I.2**). Según Salomón et al. (1996), los centros del cobre pueden ser clasificados en función de sus características espectrofotométricas y paramagnéticas.

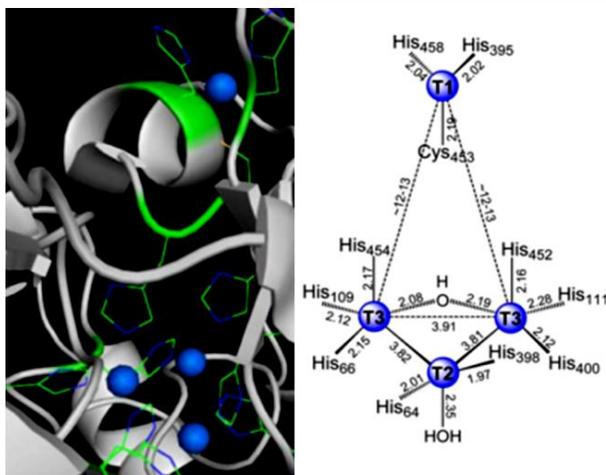


Figura I.2 Representación 3D del sitio activo lacasa. Imagen creada con PyMol de código abierto a partir de la estructura cristalina de una lacasa de *Trametes versicolor* (archivo PDB 1GYC) (izquierda). Representación esquemática del sitio activo de la misma lacasa que muestra la coordinación de residuos (derecha). Imagen tomada de Cannatelli y Ragauskas (2016)

El T1 presenta una banda de transferencia de carga intensa alrededor de 610 nm detectado por resonancia paramagnética electrónica (EPR, *electronic paramagnetic resonance*), responsable del color azul de la enzima (Mot y Dumitrescu, 2012). El cobre T1 de las lacasas está coordinado con el átomo de azufre de una cisteína y con dos nitrógenos procedentes de dos histidinas, otras oxidasas multicobre presentan un cuarto ligando, generalmente una metionina (Sitarz et al., 2014). La falta de este cuarto ligando es considerado un factor determinante en los altos potenciales de oxidorreducción encontrados en algunas lacasas en comparación con otras multicobre oxidasas (Gray et al., 2000), ya que la mayoría de lacasas fúngicas tienen en esta posición otro aminoácido, habitualmente leucina o fenilalanina que no actúa como ligando del cobre.

Esta hipótesis está apoyada por experimentos de mutagénesis sobre este ligando axial, como por ejemplo en el caso de la lacasa de *Trametes villosa* (Xu et al., 1999), donde la sustitución de una fenilalanina no coordinante por una metionina provocó una pérdida de 100 mV en su potencial redox (Sitarz et al., 2014).

El cobre Tipo 2 o T2 no confiere color, sólo presenta una débil absorción en la región visible aunque puede ser detectado por EPR y muestra así mismo afinidad por aniones como F^- , N_3^- y CN^- , que actúan como inhibidores de la enzima (Yaropolov et al., 1994). El cobre Tipo 3 o T3 está formado por dos átomos de cobre y presentan una ligera absorción a 330 nm y un carácter diamagnético debido al acoplamiento antiferromagnético de los dos átomos de cobre, mediado por un hidroxilo (Palmer et al., 2001; Claus, 2004).

Se han descrito lacasas denominadas lacasas amarillas, ya que carecen del espectro típico de absorción para el cobre T1. Estas lacasas han sido purificadas a partir del ascomiceto *Gaeumannomyces graminis* (Edens et al., 1999) o de varias especies de basidiomicetos como son: *Phlebia radiata* (Leontievsky et al., 1997), *Phellinus ribis* (Min et al., 2001) o *Pleurotus ostreatus* D1 (Pozdnyakova et al., 2004). También se han reportado lacasas blancas como POXA1w de *Pleurotus ostreatus* que contiene un solo átomo de cobre junto a dos átomos de zinc y uno de hierro (Palmieri et al., 1997).

La mayoría de las lacasas comparten una organización general basada en tres dominios de tipo cupredoxina (Nakamura y Go, 2005). El T1 se localiza en el dominio 3, mientras que el *cluster* trinuclear (CTN) formado por los átomos de cobre T2 y T3 se encuentra embebido entre los dominios 1 y 3, a una distancia de 13 Å desde el sitio T1 (Lyashenko et al., 2006). Cada uno de estos dominios presenta un tamaño similar y una estructura de barril con topología tipo clave griega (Giardina et al., 2010).

Por otra parte, estudios de cristalografía han señalado a las lacasas como glicoproteínas (N-glicosiladas) monoméricas, diméricas y tetraméricas (Maestre et al., 2015). Su glicosilación juega un papel importante en la retención de cobre, estabilidad térmica, susceptibilidad a degradación proteolítica y secreción, los sitios de glicosilación varían tanto en posiciones como en el contenido de carbohidratos, dependiendo del organismo productor (Shraddha et al., 2011). Para *Trametes versicolor* se reportan cinco sitios distintos de N-glicosilaciones (Piontek et al., 2002), para *Lentinus tigrinus*, se reportan tres sitios (Ferraroni et al., 2007), por mencionar algunos ejemplos.

La manosa es el carbohidrato que se presentan con mayor frecuencia unido a lacasa (Garavaglia et al., 2004). En análisis electroforéticos en geles de poliacrilamida-SDS, las lacasas muestran pesos moleculares de 60-100 kDa, donde el 10-50 % podría ser atribuido a su glicosilación (Madhavi y Lele, 2009). Hasta ahora, el contenido de azúcares más alto reportado en una lacasa fue encontrada en *Botrytis cinnerea*, con un contenido del 49% (Slomczynski et al., 1995). Por otro lado, se reportó que la lacasa I y II de *Pleurotus eryngii* presentan un contenido del 7% y 1% de carbohidratos en su estructura, respectivamente (Muñoz et al., 1997).

I.2.3 Mecanismo catalítico y especificidad de sustrato

Las lacasas (bencenodiol: oxígeno oxido reductasas, EC 1.10.3.2) son multicobre oxidasa que catalizan la oxidación de una amplia gama de sustratos que incluyen fenoles, metoxifenoles y aminas aromáticas, con la reducción del oxígeno molecular a agua como producto (Thurston, 1994).

El primer paso de reacción tiene lugar a través de cuatro oxidaciones monoelectrónicas del sustrato catalizadas en el centro de cobre T1, donde queda la enzima en un estado completamente reducido. En ese estado, reacciona con el oxígeno suministrándole dos electrones y dando lugar al intermediario peróxido, en el que los dos átomos de cobre T3 y el cobre T2 están unidos a través de un grupo peróxido donde tiene lugar la unión y reducción del oxígeno molecular a agua (Davies y Duros, 2001).

En una segunda transferencia de dos electrones el intermediario peróxido es reducido, dando lugar al intermediario nativo. El intermediario nativo, que puede estar en forma oxo o hidroxil, implicaría la ruptura del enlace O-O de la molécula de dioxígeno a través de la transferencia de 2 electrones (Palmeri et al., 2001). Así, la reducción del oxígeno con 4 electrones tendría lugar a través de dos pasos de reducción con 2 electrones cada uno. Por último, el intermediario nativo se relajaría lentamente dando lugar a la enzima en estado de reposo (Solomon et al., 2001).

Los potenciales redox (E^o)^a de las lacasas juegan un papel primordial en la energía y cinética global de la transferencia de electrones durante la oxidación del sustrato por el T1. Análisis cinéticos muestran que la diferencia en E^o entre el T1 y el sustrato determina la velocidad de transferencia de electrones, y que esta reacción es el paso limitante de la velocidad de todo el ciclo catalítico. (Xu et al., 1996).

Los potenciales redox de la lacasa fúngica varían de una fuente a otra. El centro T1 tiene un potencial que varía entre 0.420 y 0.790 V frente al electrodo normal de hidrógeno (NHE) (Christenson et al., 2004). En este sentido, las lacasas son clasificadas en función de dicho valor como lacasas de alto potencial redox (E^o superior a 0.710 V), medio potencial redox (entre 0.470 y 0.710 V) o bajo potencial redox (inferior a 0.470 V), en general el potencial redox de lacasa fúngicas son considerablemente más altos que las lacasas de origen vegetal y bacteriano (Cannatelli y Ragauskas, 2016).

Para que un compuesto sea susceptible de ser oxidado por una lacasa está determinado tanto por su estructura como por su potencial redox (Mot y Dumitrescu, 2012). En el caso de los compuestos fenólicos, si la molécula está sustituida en posición *orto*- o *para*-, puede ser fácilmente oxidable por la enzima. Mientras que la sustitución en posición *meta*- hace un mal sustrato, la posición *orto*- es la más favorable (Lahtinen et al., 2009). La oxidación del sustrato también se ve favorecida con los grupos $-OH$ y $-NH_2$ como sustituyentes (Peisach y Levine, 1965; Kirk et al., 1968).

Los inhibidores de lacasa son moléculas pequeñas que son capaces de unirse a los iones de Cu del CTN, interrumpiendo así el proceso interno de transferencia de electrones. Los inhibidores incluyen: azida sódica, haluros pequeños, metales pesados grupos $-Cl$ y $-NO_2$, secuestradores de electrones y EDTA, por nombrar algunos (Cannatelli y Ragauskas, 2016).

^aPotencial redox. (E^o). También conocido como potencial de reducción, es una medida de la tendencia a ganar electrones de una especie química. Su unidad es en Volts (V) (Santhanam et al., 2011).

Los compuestos orgánicos voluminosos, tales como medicarpina, también han demostrado inhibir la actividad de lacasa. El efecto inhibitor se debe a que medicarpina bloquea tanto el canal de disolvente donde entra el oxígeno, así como el sitio de unión del sustrato (Martínez et al., 2015). Recientemente, se ha sugerido que los monocarboxilatos, como el propionato y el butirato, pueden reducir sustancialmente la actividad de algunas lacasas fúngicas (Ters et al., 2009).

I.2.4 Producción de lacasa

La producción de lacasa es relativamente baja en condiciones naturales y para su mejora se han diseñado estrategias alternativas para alcanzar niveles de producción más elevados mediante la modificación de las condiciones nutricionales y fisiológicas durante el cultivo de hongos prometedores, y esto ha sido un requisito previo para su utilización óptima a escala industrial (Dhakar y Pandey, 2013).

Las lacasas pueden ser enzimas constitutivas o inducibles y su producción ocurre durante el metabolismo secundario sujeta a una regulación compleja por nutrientes (Afreen et al., 2016), fuente y concentración de carbono y nitrógeno (Hailei et al., 2015; Dhakar y Pandey, 2013; Ding et al., 2012; Manimozhi y Kaviyarasan, 2012), la presencia de inductores como compuestos aromáticos e iones metálicos (Hernández et al., 2017; Yang et al., 2016; Zhuo, et al., 2016; Cambria et al., 2011; Revankar y Lele, 2009) y aunque las lacasas son suministradas por varias compañías para diversas aplicaciones, aún con lo anterior no satisface la actual creciente demanda del mercado.

En los últimos años las lacasas de alto potencial redox se ha puesto interés en su expresión heteróloga en diferentes microorganismos huéspedes (Piscitelli et al., 2010). La versatilidad y las posibilidades de ampliación de producción de enzimas recombinantes además de la disponibilidad de sistemas de expresión ha dado la posibilidad diseñar lacasas con características personalizadas a través de la ingeniería de proteínas (Mate y Alcalde, 2016; Pezzella et al., 2017; Yadav et al., 2018; Zaho et al., 2018).

I.2.4.1 Condiciones de cultivo

Los mecanismos para la expresión de los genes de lacasas fúngicas están regulados por una serie de factores entre los que cabe destacar los niveles de nutrientes. Se ha reportado que concentraciones altas de carbono, como glucosa y sacarosa, reducen la actividad de lacasa no siendo así para celulosa (Lee et al., 2004). El extracto de levadura, peptona, urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NaNO_3 son las fuentes de nitrógeno comúnmente utilizadas. Los primeros reportes describen la producción de lacasas por el agotamiento del nitrógeno (Keyser et al., 1978); sin embargo, para algunas cepas el nitrógeno no afecta la actividad enzimática (Leatham y Kirk 1983). Otros estudios muestran que la elevada actividad de lacasa se logró mediante el uso de baja relación de carbono/nitrógeno, mientras que otros muestran lo contrario (Stajic et al., 2006; Jiang et al., 2013; Dhakar y Pandey, 2013; Castaño et al., 2015).

El modo de cultivo, ya sea en sólido o líquido, también se ha reportado para la producción de lacasas. La fermentación sumergida implica el cultivo líquido con los nutrientes apropiados y alto contenido de oxígeno, cuando se opera en condiciones aeróbicas (Shraddha et al., 2011). Las ventajas de cultivar al hongo en medio líquido es mayor biomasa en menos tiempo, favorece la dispersión del hongo y facilita la manipulación de la enzima para su caracterización; mientras la desventaja de cultivar en líquido es precisamente la viscosidad, cuando crece la célula fúngica, se forma micelio que dificulta la acción del impulsor causando bloqueos que resultan limitaciones en oxígeno y transferencia de masa (Brijwani et al., 2010). Se ha reportado que la producción de lacasas se reduce considerablemente en reactores de tanques agitados (Hess et al., 2002; Pan-ZH et al., 2015). Aunque también se ha reportado que la agitación no desempeña un papel importante en la producción de lacasa de *Trametes versicolor* (Tavares et al., 2006). Al contrario de Galhaup et al, (2002) que reportó un incremento en la producción de lacasa de *Trametes pubescens* operando en un reactor de lote alimentado.

Generalmente, cuando se cultivan hongos para la producción de lacasas en medio sólido, se utilizan materiales de residuos agrícolas que imitan las condiciones en las que los

hongos crecen de forma natural. La presencia de lignina, celulosa y hemicelulosas, que son ricas en azúcar, promueven el crecimiento fúngico en el fermentador y hacen que el proceso sea más económico (Shraddha et al., 2011; Díaz et al., 2016; Chicatto et al., 2018). La principal desventaja de los cultivos sólidos es la falta de cualquier diseño de biorreactor establecido. Couto et al., (2003) probó tres biorreactores: configuración de inmersión, cama expandida y bandeja para la producción de lacasa de *Trametes versicolor*, utilizando nylon y salvado de cebada. Descubrieron que la configuración de bandeja condujo a la mejor producción de lacasa. Gupta y Jane (2018) reportaron la producción de lacasa de *Gonoderma lucidum* en medio líquido, semisólido y sólido dando como resultado mayor crecimiento y producción en medio sólido, 3.5 veces más que en semisólido y 2.5 veces más que en medio líquido.

Otros de los factores no menos importantes son la temperatura y pH durante del cultivo, aunque la información sobre su efecto es escasa. La temperatura óptima de la lacasa es muy diversa entre una cepa y otra, incluso si está presente o no la luz. Se ha reportado la producción de lacasa en oscuridad cuya temperatura óptima es más alta que cuando está expuesta a la luz (Thurston, 1994). La mayoría de las lacasas son producidas entre un rango de 25 a 35 °C, incluyendo basidiomicetos y ascomicetos (Palonen et al., 2003; Ling et al., 2015; Castaño et al., 2015; Othman et al., 2018). En cuanto al pH, la mayoría de los reportes indican un pH inicial entre 4.5 y 6.0 es adecuado para la producción de la enzima (Brijwani et al., 2010).

I.2.4.2 Inducción de la producción de la lacasa

Uno de las estrategias más efectivas para mejorar la producción de lacasa es la complementación del medio de cultivo con un inductor apropiado. La adición de compuestos xenobióticos relacionados con lignina o derivados de lignina, tales como xilidina, ácido ferúlico o *p*-anisidina y el alcohol de veratrílico inducen la actividad de lacasa (Barbosa et al., 1996; Souza et al., 2004).

Valle y col, (2015) reportaron la inducción de lacasa de *Agaricus blazei* U2-4 a diferentes concentraciones de etanol, guayacol y vainillina. En todos los casos se

incrementó la producción de lacasa, pero se observaron diferencias en la expresión de la proteína. Por otra parte, se mostró que alcohol veratrílico, ácido tánico, xileno, fenol o vainillina no lograron mejorar la producción de lacasa HYB07 de *Cerrena* sp. (Yang et al., 2016).

Otra de las estrategias para inducir lacasas, es la incorporación de una mezcla de residuos agrícolas con compuestos fenólicos sintéticos o iones metálicos en el medio de cultivo. Esta estrategia fue altamente eficaz para producir lacasas de *Trametes versicolor*, cultivada en residuos de maíz y ácido veratrílico y el ácido ferúlico, dicha mezcla mejoró la producción de lacasa hasta 91.8% mayor que el control (Wang et al., 2014). Se ha reportado la inducción de la actividad de lacasa utilizando agua contaminada con extracto de trigo en cultivos de *Pleurotus ostreatus* (Parenti et al., 2013).

Kuhara y Papinutti (2014), reportaron la inducción de lacasa con diferentes compuestos fenólicos y con iones metálicos, y encontraron que el ácido ferúlico y el cobre fueron los mejores inductores de la lacasa entre los agentes evaluados. La producción de lacasa en *Abortiporus biennis* fue inducida por etanol y cobre cuyo incremento fue de 2.5 veces más que el control. (Lian-Ying et al., 2017). De manera sinérgica el cobre y la rodamina B, en concentración de 2.0 mM y 35.0 μ M, respectivamente, incrementaron 80 veces más la actividad lacasa comparada con aquella observada cuando estos inductores se utilizan de forma individual (Du et al., 2012). Además del cobre, los iones Cd^{2+} y Ag^+ han sido descritos como fuertes inductores de actividad lacasa (Manubens et al., 2007).

I.2.4.2.1 Inducción por cobre

Las enzimas MCO están implicadas en la homeostasis del cobre, dichas enzimas usan múltiples átomos de cobre como cofactores y los acoplan a la oxidación para la reducción de agua a oxígeno (Salomón et al., 1996). Lacasa siendo una MCO, es de esperarse que también reaccione ante la presencia de iones cobre en el medio. Ya hemos citado algunos inductores, sin embargo, el efecto del cobre es considerado como el más eficiente para inducir la producción de lacasa (Palmieri et al., 2000).

Este metal, es un elemento traza esencial para eucariotas como para procariotas, y sus funciones biológicas están estrechamente relacionadas con sus propiedades como metal de transición principalmente: la transferencia de electrones y transporte de dióxígeno (Puig y Thiele, 2002). Aunque el cobre es esencial también puede ser tóxico incluso a bajas concentraciones. Los organismos tienen mecanismos para controlar las concentraciones intracelulares de cobre con el propósito de evitar la toxicidad mediada por este metal, y a la par manteniendo el suministro de este a las enzimas que lo necesitan (Mattie y Freedman, 2001). Los reguladores transcripcionales que detectan cobre específicamente, responden a niveles por encima o por debajo del valor umbral dando una respuesta fisiológica cuando este metal está presente (Osman y Cavet, 2008).

Se ha demostrado convincentemente que la expresión de genes lacasa está fuertemente regulada por iones de cobre para regular la transcripción de genes en *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* y *Trametes pubescens*, así lo ha demostrado Pezzella et al, (2013). Muchos estudios han marcado diferencias en la respuesta transcripcional a los iones de cobre que exhiben diferentes genes lacasa en una sola especie o familias de genes (Litvintseva et al., 2002; Karp et al., 2012; Nakade et al., 2013; Park et al., 2015; Garrido et al., 2016; Othman et al., 2018).

I.2.4.3 Producción de lacasas recombinantes

Los sistemas de expresión heterólogos se basan en la suposición de que la expresión y función de la proteína son similares entre un organismo u otro, las secuencias de la mayoría de las proteínas eucariotas están bien conservadas además de que comparten muchos principios de compartimento celular, de transporte intracelular y la regulación, así como el tráfico vesicular a lo largo de la vía secretora y la transducción de señales entre otros. Sin embargo, un organismo puede poseer ventajas sobre otro de su misma especie, tales como la sobreproducción de enzimas, llamadas enzimas recombinantes quienes son expresadas en otro organismo no nativos (Frommer y Ninnemann, 1995).

En general, los sistemas de expresión heteróloga se pueden clasificar en dos tipos: sistemas de expresión procariotas y sistemas de expresión eucariotas. Para la elección del sistema a utilizar se deben considerar factores como: la tasa de crecimiento y cultivo de células huésped, el nivel de expresión y el procesamiento postraduccional de la proteína sintetizada, si lo requiere (Piscitelli et al., 2010).

La mayoría de las lacasas que están en el mercado, provienen de hongos nativos con rendimientos altos considerando una optimización de su producción sin embargo, hongos ligninolíticos a menudo producen varias isoformas de lacasa con propiedades fisicoquímicas similares y las enzimas individuales son difíciles de purificar (Colao et al., 2006). La producción de lacasas recombinantes supera este obstáculo además, la producción de lacasa recombinante se puede optimizar mediante el uso de un adecuado promotor y secuencia de señal, simplificando así su purificación y reduciendo costos, también si se desea aumentar significativamente los rendimientos se optimiza las condiciones de cultivo otra opción sería ingeniería de proteínas, como el uso de mutagénesis dirigida o evolución dirigida (Antosova y Sychrova, 2015).

Las lacasas han sido expresadas no sólo en hongos sino también en levaduras, plantas y bacterias (Piscitelli et al., 2010; Chauhan et al., 2017). Los hongos son excelentes productores naturales de enzimas extracelulares y por lo tanto, son candidatos atractivos para la producción de proteínas recombinantes, pero también presentan algunas desventajas. Se observó que los niveles de producción de la mayoría de las proteínas recombinantes no fúngicas (mamíferos, bacterias, plantas, etc.) en hongos filamentosos son generalmente más bajos en comparación con las de las proteínas homólogas y con posibles limitaciones a nivel postraduccional (es decir, la translocación ineficiente y mal plegamiento) (Broekhuijsen et al, 1993; Ward, 2012).

Se ha utilizado un número limitado de hongos filamentosos para producción de proteínas heterólogas, principalmente debido a la falta de herramientas apropiadas para su ingeniería genética. Hasta ahora, las lacasas se han producido en varias especies de

Aspergillus, por ejemplo, *A. niger* (Benghazi et al., 2014; Tamayo-Ramos et al., 2013); *A. oryzae* (Larrondo et al., 2013);

Algunas plantas que han sido utilizadas como hospedero para lacasas de origen fúngico son: *Oryzasativa* (de Wild et al., 2008); *Zea mays*, (Bailey et al., 2004) y *Nicotiana tabacum*, (Chiaiese et al., 2011).

En cuanto al uso de levaduras *Pichia pastoris* ha sido la más utilizada con alta eficiencia. Diferentes trabajos reportan la clonación y expresión de una lacasa en *Pichia pastoris*, con el objetivo de incrementar la productividad de esta enzima. Se han obtenido niveles altos de lacasa de *Ganoderma lucidum* (Sun et al., 2012); *Cyathus bulleri* (Garg et al., 2012); *Botrytis aclada* (Ktill et al., 2011); *Trametes* sp. 420 (Hong et al., 2007; Li et al., 2007) y *Pleurotus sajor-caju* (Solden et al., 2002); *Laccaria bicolor* (Bo-Wang et al., 2016). En contraste, Nishibori y col (2012), evaluaron la expresión heteróloga de dos lacasa de *Trametes versicolor* y *Gaeumannomyces graminis* en dos sistemas de expresión: *Pichia pastoris* y *Cryptococcus* sp. S-2, y se encontró que este segundo hospedero tuvo los mayores niveles de expresión de ambos genes de lacasa.

Trabajos recientes se han enfocado sobre el estudio de glicosilación de la lacasa expresada en levaduras (Rodgers et al., 2010). Se demostró que el estado de glicosilación específica de la levadura de la lacasa producida puede influir, a veces incluso negativamente, en las propiedades enzimáticas y la actividad (Sigoillot et al., 2005).

Un diseño exitoso de la producción heteróloga específica y optimización de las condiciones de cultivo resulta ser la estrategia más prometedora para satisfacer las demandas industriales de producción a gran escala.

I.3 Sistema Lacasa-Mediador

Las lacasas catalizan la oxidación directa de *o*-y *p*-difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas y aril diaminas, así como algunos iones inorgánicos como se mencionó

anteriormente sin embargo, algunos sustratos no pueden oxidarse debido a su impedimento estérico o al alto potencial redox pero pueden ser oxidados por pequeños mediadores empleando un sistema lacasa-mediador (SLM) (Jin-Su et al., 2017).

Un mediador actúa como un "transportador de electrones" entre la lacasa y el sustrato, y se convierte en un radical estable después de la oxidación enzimática (**Fig. I.3**). Un mediador redox ideal debería tener un alto poder de oxidación, ser de estructura pequeña, producir un radical estable que no inactive a la enzima, reciclable sin degeneración, estar disponible a bajo costo y ser ambientalmente seguro (Giardiana et al., 2010; Cañas y Camarero, 2010; Forootanfar y Faramarzy, 2015).

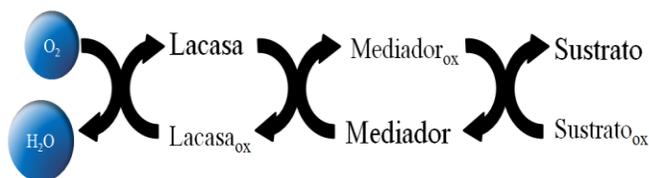


Figura I.3 Representación esquemática del sistema lacasa-mediador
(Tomada de Barreca et al., 2003).

El primer informe de un SLM fue descrito por Bourbonnais y Paice en 1990, establecieron que un sistema que contiene tanto una lacasa de *Trametes versicolor* como el sustrato de común 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) podía oxidar compuestos del modelo de lignina no fenólica, como el alcohol veratrílico.

La mayoría de los compuestos descritos como mediadores de lacasa no son estrictamente mediadores redox, ya que sus intermedios oxidados son electroquímicamente inestables (Morozova et al., 2007). Además, un potencial redox de un mediador parece jugar un papel insignificante en la eficacia catalítica de la oxidación de la lignina. Es probable que su eficacia dependa de la reactividad química del radical formado después de su paso de oxidación inicial (González et al. 2009).

I.3.1 Mediadores sintéticos

Los primeros compuestos descritos capaces de mediar de manera eficiente la oxidación por la lacasa de compuestos no fenólicos fueron sustratos artificiales de la enzima. El primero de este tipo en ser utilizado fue el 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (Bourbonnais y Paice, 1990) otros mediadores sintéticos también utilizados son el 1-hidroxibenzotriazol (HBT), el ácido violúrico, la N-hidroxitfalimida (Galli y Gentili, 2004) las fenilpirazolonas y el radical de tipo nitroxilo TEMPO (2,2', 6, 6'-tetrametil-piperidina-N-oxil) (Fabbrini *et al.*, 2002).

Estos mediadores se han utilizado de manera eficiente en procesos tales como el bioblanqueo de pasta de papel (García *et al.*, 2003) o la decoloración de colorantes textiles (Couto y Sanromán, 2007; Claus *et al.*, 2002) aunque la mayoría de los reportes han sido para la degradación de la lignina (Munk *et al.*, 2015).

De los trabajos recientes la despolimerización de la lignina por *Trametes versicolor* en presencia de un mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT), mostraron un 10 % de corte en un compuestos con β -O-4-1-(4-etoxi-3-metoxi-anillo-[14C]fenil)-2-(2-metoxifenoxi)-propano-1,3-diol, y un modelo β -1-ligado a 1,2-bis-(3-metoxi-4-[14C] metoxifenil)-propano-1,3-diol, que representa subestructuras no fenólicas en la lignina (Srebotnik y Hammel, 2018). Hilgers *et al.*, (2018) estudiaron las oxidaciones de un dímero fenólicos de lignina (GBG), por una lacasa de *Trametes versicolor*, solo o en combinación con los mediadores HBT y ABTS. El rol de HBT fue insignificante, ya que su oxidación por lacasa se produjo lentamente por el contrario, lacasa-ABTS GBG fue oxidado tanto directamente por lacasa como por radical ABTS.

La desventaja de un mediador sintético es el elevado costo y toxicidad (Johannes y Majcherczyk, 2000), los esfuerzos se han centrado últimamente en la búsqueda y selección de compuestos fenólicos derivados de la despolimerización de la lignina, que pueden ser considerados como mediadores naturales.

I.3.2 Mediadores naturales

Los mediadores naturales son precisamente derivados del complejo lignina, como siringaldehído (SA) y vainillina, con estructuras similares sólo diferenciados por la metoxilación del anillo aromático, el siringaldehído tiene dos grupos metoxi en posición orto con respecto al grupo de fenol, mientras que la vainillina tiene solamente un grupo metoxi y por lo tanto un grupo fenólico estéricamente más accesible (Khlifi-Slama et al., 2012). Un sistema de lacasa-vainillina fue aplicado para la biorremediación de cultivos contaminados con pesticidas (Huifang et al., 2013).

El rojo fenol, también de naturaleza fenólica, puede actuar como mediador, donde éste se convierte en un radical fenoxi estabilizado por resonancia. Cabe destacar que el sistema lacasa-rojo fenol es 10 veces más eficiente que el sistema lacasa-3-hidroxiantranilato, reportado también como mediador fenólico natural de lacasa en la oxidación de alcohol 4-metoxibencilo (d'Acunzo et al., 2003). El ácido ferúlico y el ácido *p*-cumárico son otros de los compuestos naturales utilizados para un sistema lacasa-mediador (Sitarz et al., 2014).

Hay pocos ejemplos de oxidación de compuestos fenólicos con ayuda de mediadores naturales utilizados en aplicaciones industriales sin embargo, poseen una mayor ventaja sobre los mediadores sintéticos como: los bajos costos, debido a que se encuentran en materiales de residuos de frutas, semillas, gabazos, madera, que han actuado como mediadores habituales (Cañas y Camarero, 2010).

I.4 Inmovilización de enzimas

Katchalski y Katzir (1993) hacen referencia al término de enzimas inmovilizadas como: *“enzimas confinadas o localizadas en una región física determinada de espacio definida con la retención de sus actividades catalíticas, y que pueden ser usado repetidamente y de forma continua”*.

La introducción de enzimas inmovilizados presenta para la mayoría de los casos mejora de las propiedades catalíticas. Por ejemplo, aumenta la estabilidad de la enzima, la

solución procesada no queda contaminada con la enzima, incrementa su termoestabilidad, se puede detener la reacción cambiando alguna de las condiciones del medio, ya sea pH o concentración de sales no favorables para la catálisis; además es posible su reutilización y por lo tanto los costos del proceso son menores son más económicas, respetuosas con el medio ambiente y mucho más fáciles de usar que las tecnologías equivalentes (Mohamad et al., 2015; Sirisha et al., 2016). Las desventajas son principalmente la pérdida de actividad de la enzima por alteración de la conformación estructural, con respecto a la enzima nativa (Mohamad et al., 2015).

Los principales componentes para inmovilizar a una enzima inmovilizada son: la matriz y el modo de vinculación. Los métodos de inmovilización toman el hecho de que las proteínas tienen aminoácidos con diferentes características, mediante el cual los grupos funcionales en las cadenas laterales de estos aminoácidos pueden participar en la vinculación al soporte a través de varios tipos de enlaces e interacciones (Liese et al., 2013). Las enzimas pueden ser unidas por las interacciones que van desde físico reversible, adsorción, enlaces iónicos y afinidad de unión, a lo irreversible por enlaces covalentes estables que están presentes a través de enlaces de éter, tioéter o amida (Brena et al., 200).

I.4.1 Soporte y métodos de inmovilización

Una enzima inmovilizada está sometida a cambios en las propiedades químicas y físicas, dependiendo de la elección del método de inmovilización. La superficie sobre la que se inmoviliza la enzima tiene varios roles fundamentales como mantener la estructura terciaria de la enzima por formación de electrones complejos de transición, formando hidrógeno o enlaces covalentes con la matriz (Goel, 2014). Por ello la consideración clave para inmovilizar una enzima en una superficie es la adecuada selección de un método de unión entre el reactivo en la superficie de la matriz y los residuos fuera de la unión al sustrato o sitio activo de la enzima (Tischer et al., 2009).

Los soportes se pueden clasificar en orgánicos e inorgánicos de acuerdo con su composición química, o bien en polímeros naturales y sintéticos. Los soportes más

comúnmente utilizados son carboximetilcelulosa, almidón, colágeno, sefarosa modificada, intercambio iónico resinas, carbón activo, sílice, arcilla, aluminio, agarosa, entre otros (Mohamad et al., 2015).

Los métodos de inmovilización se clasifican en dos grandes grupos: retención física y retención química (Arroyo, 1998). Por otra parte, Brena y Batista (2002), los clasificaron en inmovilización de enzimas reversible e irreversible. Otra clasificación es: atrapamiento, entrecruzamiento (reticulación) y enlace a un transportador, sea adsorción física, enlace iónico o covalente (Sheldon y Pelt, 2013).

Atrapamiento: es la retención física irreversible de enzimas en una matriz sólida porosa, como poliacrilamida, colágeno, alginato o gelatina. La enzima es suspendida en la solución del monómero, y en un proceso de polimerización posterior mantiene la enzima atrapada, previniendo contacto directo con el medio ambiente. El atrapamiento es el método de inmovilización más fácil sin alteración estructural de la enzima. Sin embargo, esta metodología se caracteriza por limitaciones de transferencia de masa y baja carga de enzima (Arroyo, 1998; Brady y Jordan, 2009).

Encapsulación: la encapsulación de lacasas es similar en comparación con el método de atrapamiento, porque la enzima está protegida del medio ambiente y la transferencia de masa representa una seria limitación en ambos de estos métodos de inmovilización. Una alternativa de este método de inmovilización es la microencapsulación, en la que un agente bioactivo está confinado en el núcleo de esferas del tamaño de micras hechas de un material semipermeable. Un micro encapsulado de lacasas están rodeados por membranas semipermeables como polímeros (por ejemplo, polietilenimina) o materiales inorgánicos (por ejemplo, SiO₂) (Rochefort et al., 2008).

Adsorción física: el método de adsorción física se puede definir como otro de los métodos sencillos de inmovilización reversible que involucran a la enzima que se adsorbe físicamente o unido al material de soporte. La adsorción puede ocurrir a través de fuerzas débiles no específicas, como fuerzas de van der Waals, interacciones

hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno (Kumar et al., 2009). Las enzimas inmovilizadas reversiblemente pueden ser retiradas del soporte en condiciones suaves, método altamente atractivo como cuando la actividad enzimática se ha descompuesto, el soporte se puede regenerar y volver a cargar con enzima fresca (Mohamad et al., 2015).

Unión covalente: es uno de los métodos más utilizados para la inmovilización enzimática irreversible. El soporte para la inmovilización debe contener brazos espaciadores cortos y una alta densidad de grupos reactivos y el grupo funcional que participa en la unión de la enzima generalmente implica la unión a través de las cadenas laterales de lisina (el grupo amino), cisteína (grupo tiol) y ácidos aspártico/glutámico (grupo carboxílico), imidazol y fenólico, grupos que no son esenciales para la actividad catalítica de la enzima (Obzturk et al., 2001).

Reticulado (“cross-linking” en inglés): se puede llevar a cabo por dos procedimientos diferentes basados en este principio: reticulado de cristales de enzima (CLEC) y reticulados con agregados enzimáticos (CLEAs). En el reticulado de cristales de enzima (CLEC), se tiene como ventaja el incremento de actividad enzimática y la estabilidad operacional, pero su principal inconveniente es la alta pureza necesaria para la cristalización de la enzima. En el método por formación de reticulados con agregados enzimáticos (CLEAs) ocurren interacciones intermoleculares irreversibles entre enzimas provocados por reactivos bifuncionales, tales como aldehídos, isocianatos, iminoésteres o di-aminas activadas con carbo, di-imida (Arroyo, 1998; Fernández et al., 2012), o polímeros de glutaraldehído resultante de condensaciones intramoleculares (Sheldon, 2011).

I.4.2 Lacasas inmovilizadas

La inmovilización de las lacasas puede superar algunas limitaciones al mejorar algunas de las propiedades de la enzima (Kunamneni et al., 2008). Las principales ventajas de la inmovilización de lacasa son el aumento en la termoestabilidad de la enzima y su resistencia a condiciones extremas y reactivos químicos, además las lacasas inmovilizadas se pueden separar fácilmente de los productos de reacción permitiendo

que las enzimas sean empleadas en operaciones en continuo de biorreactor (Arica et al., 2009; Arroyo, 1998; Georgieva et al., 2008).

Las lacasas han sido inmovilizadas siguiendo los métodos ya descritos sin embargo, la metodología más común para la inmovilización de la lacasa ha sido por adsorción. Varios estudios de adsorción se han centrado en la inmovilización de la lacasa en soportes de sílica, modificados previamente por reactivos bifuncionales como: glutaraldehído (GLU) y etilenglicol-N-hidroxisuccinimida (NHS) o monofuncionales, como el anhídrido citracónico (Fernández et al., 2012). La lacasa inmovilizada de *Myceliophthora thermophila* presentó excelentes resultados en sílica con GLU (Forde et al., 2010). Se han inmovilizado lacasas en resinas de intercambio iónico (Mazur et al., 2007).

La inmovilización de la lacasa en nanopartículas magnéticas-Cu²⁺, además de mejorar la estabilidad aumentó su actividad catalítica (Szamocki et al., 2009). Se ha reportado que una lacasa de *Pycnoporus sanguineus* recupera 65% de su actividad en este soporte en presencia de iones Cu²⁺ y mantiene el 87 % de la actividad de la lacasa después de diez ciclos de operación (Wang et al., 2008). También se ha reportado la inmovilización de la lacasa de *Trametes versicolor* en sílica gel por microencapsulación (Mohidem y Mat, 2009). La inmovilización de la lacasa de *Neurospora crassa* por unión covalente, provocó una reducción del 25 % en rendimiento y un aumento de K_M , probablemente causada por un impedimento estérico a la difusión del sustrato (Duran et al., 2002).

Bello et al. (2018), inmovilizaron una multicobre peroxidasa en perlas de polihidroxibutirato (PHB) para biorremediación de aguas, la eficiencia de decoloración del sistema aumentó la actividad catalítica hasta 40 veces con respecto a la enzima soluble, alcanzando eficiencias de decoloración de 45-90 %.

Recientemente, los sistemas biocatalíticos inspirados en la nanotecnología han atraído el diseño de soportes nanoscópicos para la inmovilización de enzimas que pueden mejorar los factores determinantes de la eficiencia, mejorando el área de superficie y la capacidad de carga y reduciendo la resistencia de transferencia de masa. La lacasa cruda

se inmovilizó covalentemente sobre nanobiochar funcionalizado usando un método de dos etapas de amidación activada con di-imida, los resultados mostraron una mayor estabilidad de lacasa inmovilizada frente a la temperatura y la variación del pH en comparación con la lacasa libre. Además, la lacasa inmovilizada mantuvo su rendimiento catalítico hasta siete ciclos de utilización y mostró más del 50 % de la actividad inicial después de dos meses de almacenamiento a temperatura ambiente (Naghdi et al., 2018).

Una alternativa aún más atractiva es el uso de lacasas inmovilizadas junto con un mediador. Tal es el caso de reportes de Chao et al., (2018) y Sondhi et al., (2018), ambos reportan la inmovilización de una lacasa en perlas de poli alcohol vinílico y alginato Cu^{2+} respectivamente, utilizando ABTS como mediador.

Con mayor detalle, la lacasa inmovilizada en perlas de poli alcohol vinílico, que contienen nanotubos de haloisita (PVA/HNT) para mejorar la estabilidad y reutilización de la enzima. La estructura porosa de las perlas de PVA/HNT facilita el atrapamiento de la enzima, y también evita la lixiviación de la lacasa inmovilizada. Los nanotubos de haloisita actúan como puente para conectar los poros adyacentes, facilitando la transferencia de electrones y mejorando las propiedades mecánicas. Este método tiene un rendimiento de recuperación de actividad 79.15 %, lo que indica que se puede usar como soporte potencial para la inmovilización de lacasa. En comparación con la lacasa libre, la lacasa inmovilizada en perlas híbridas exhibe tolerancia mejorada al pH (incluso a pH 8.0), buena estabilidad térmica (57.5 % de la actividad inicial se puede mantener a 75 °C) y excelente estabilidad de almacenamiento (81.17 % de la enzima la actividad puede retenerse después del almacenamiento a 4 °C durante 5 semanas en comparación con la enzima libre del 60 %). Además, la eficacia de eliminación del azul reactivo puede alcanzar hasta el 93.41 % en presencia del mediador redox 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato), en el que la adsorción y la degradación existen simultáneamente (Chao et al., 2018).

La inmovilización de las lacasas es potencialmente ventajosa, en comparación con la enzima libre (Champagne y Ramsay, 2007), ya que adquiere estabilidad en un alto porcentaje y permite la reutilización de la misma, características deseables para implementar un proceso industrial, en cualquiera de sus aéreas.

I.5 Lacasas en la Industria Biotecnológica

Las lacasas se han propuesto para ser aplicadas en distintos procesos industriales, sobre todo por la característica de reacción que poseen, siendo eficientes, sostenibles y amigables con el medio ambiente. A continuación se resume en breve algunas de las aplicaciones sobresalientes que tiene la lacasa.

La industria textil consume grandes volúmenes de agua, mismos que son contaminados con productos químicos durante el procesamiento de los textiles. La mayoría de los procesos existentes para el tratamiento de aguas residuales de tintura son ineficaces y no económicos. El uso de las lacasas parece una solución atractiva debido a su acción oxidante para la degradación de tintes con estructura química diversa, incluyendo los colorantes sintéticos empleados en la industria (Khelifi-Slama et al., 2012; Afreen et al. 2016; Zhu et al. 2016; Wang et al. 2017; Almeida et al., 2018).

Adicionalmente, se ha señalado que los mediadores tienen una participación importante en la decoloración de tintes (Claus et al., 2002). Por ejemplo, en aguas contaminadas con azul de remazol brillante sólo se observó decoloración en presencia de mediadores. Bajo las condiciones específicas de este estudio, el ácido violúrico (VLA) fue el mediador más eficaz, ya que la decoloración fue casi completa en 20 min, en contraste con HBT que decolora a una tasa dos veces más lenta que el VLA (Soares et al., 2001).

Otra fuente importante de contaminación es la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en el suelo y agua, distintos trabajos reportan lacasas capaces de mediar en el acoplamiento la reducción de 2,4,6-trinitrotolueno (Rodríguez y Toca, 2006; Majeau et al., 2010; Teerachat et al., 2018).

En la industria alimentaria, la lacasa ha mostrado su capacidad para mejorar los productos y procesos alimentarios. En los vinos, se ha aplicado en la oxidación de polifenoles, como una manera de estabilizar los vinos (Minussi et al., 2002; Gassara et al., 2013; Lettera et al., 2016; Yin et al. 2017), ya que los polifenoles causan efectos no deseados y sus características organolépticas se ven deficientes. En el caso de la industria panadera, la lacasa participa de manera sinérgica con xilanasas y lipasas para conferir estabilidad y mejorar el tiempo de fermentación para una mayor retención de gas en la masa, donde se obtuvieron resultados óptimos cuando se utiliza xilanasas, lipasas y lacasa, en contraste con la combinación de xilanasas-lipasas (Vega y col., 2010).

La lacasa también es utilizada para la síntesis de actinomicina, compuesto anticancerígeno que funciona mediante el bloqueo de la transcripción de ADN a partir de células tumorales (Muhammad et al., 2012). Además, las lacasas han sido empleadas en la síntesis de derivados de porina mediado por HBT (generador de dímeros u oligómeros por el acoplamiento de los intermedios radicales reactivos) y en la síntesis de vindulina, utilizada en el tratamiento para leucemia (Kunamneni et al., 2008; Muhammad et al., 2012). En la industria cosmética, la lacasa ha sustituido al H_2O_2 actuando como agente oxidante en la formulación de colorantes para cabello, un proceso para el que existe una patente europea desde 1997 (Rodríguez y Toca, 2006).

En la industria papelera, la lacasa es utilizada como paso previo a la etapa de blanqueo convencional, principalmente a través de los sistemas lacasa-mediador. Concretamente, se ha visto que estos sistemas en comparación con otras enzimas empleadas en el blanqueo, como las xilanasas (Beg et al., 2001; Bajpai et al., 2006), presentan una mayor especificidad sobre las fracciones fenólicas y no fenólicas de la lignina, disminuyendo así las pérdidas de rendimiento (Cadena, 2008). La efectividad del sistema lacasa-mediador, de naturaleza sintética o natural, para disminuir el número kappa (indicativo de la cantidad de lignina en una pasta de papel), ha sido demostrado en varios estudios (Sigoillot et al., 2005; Moldes et al., 2008; Fillat y Roncero, 2010; Saleem et al., 2018).

La nanobiotecnología ha recibido un interés creciente durante los últimos años y la lacasa no es ajena a esta área. Un ejemplo de esta tecnología en el que se ven involucradas las lacasas, es en el desarrollo de biosensores y células de biocombustible. Se han desarrollado biosensores para detectar O₂, glucosa, aminas aromáticas, compuestos fenólicos (Mazlan et al. 2017; Silva and Cruz 2016; Chawla et al. 2011) e incluso morfina y codeína (Bauer et al., 1999).

Las lacasas pueden ser también inmovilizadas en el cátodo de células de biocombustible (Chen et al., 2001; Calabrese et al., 2002; Beneyton et al., 2011), para proporcionar energía a sistemas de transmisión de pequeño tamaño, muy interesantes desde el punto de vista medioambiental, puesto que proporcionan una fuente de energía limpia (Rodríguez y Toca, 2006; Chaijak et al., 2018; Kim et al., 2018).

I.6 Antecedentes directos

Cervantes en el 2011, aisló la cepa Co3Bag1 a partir de composta de bagazo de caña. Esta cepa se seleccionó a partir de un conjunto de 29 cepas de hongos termófilos, por su capacidad para producir enzimas con actividad ligninolítica, utilizando bagazo de caña como fuente de carbono. Posteriormente, López-Olguín (2011) identificó a la cepa Co3Bag1 como *Corynascus sepedonium* por análisis taxonómico de rDNA 28S e ITS. Un segundo análisis filogenético (árbol filogenético) relacionan a la cepa Co3Bag1 con el género de *Chaetomium* y *Chaetomidium* de diferentes especies. A partir de estos resultados se ubicó *Corynascus sepedonium* género y especie, de la familia Chaetomimiaceae del orden de Sordoriales (Ericksson, 2002). Sin embargo, bajo la actualización en Base de datos la cepa Co3Bag1 fue identificada como *Thielavia terrestris* por Charles River Laboratories International, Inc. (USA).

I.6.1 *Thielavia terrestris*

Thielavia terrestris (sinónimo, *Allescheria terrestris*; amorfo, *Acremonium alabamense*), es un ascomiceto termófilo transportado por el suelo que puede crecer a un pH relativamente bajo (pH 4.5) y temperatura elevada (40-45 °C) (Rey et al., 2003), es

capaz de descomponer biomasa lignocelulósica además de ser una fuente de enzimas termoestables (Langston et al., 2012).

La secuencia del genoma de *T. terrestris* NRRL 8126 fue reportado y comparado con el genoma de *Myceliophthora thermophila*. Ambos hongos fueron cultivados en paja de alfalfa, paja de cebada o glucosa como únicas fuentes carbono, los niveles de identidad y expresión de enzimas secretadas fueron reportados para cada sustrato (Berka et al., 2011). Se ha informado recientemente de una β -1, 4-xilanasasa TtXynA de *T. terrestris* Co3Bag1 (Garcia-Huante et al., 2016).

1.6.2 Lacasa de *Thielavia terrestris* Co3Bag1

En trabajos previos a este proyecto, Cervantes (2011) reportó que *Thielavia terrestris* cepa Co3Bag1 presentó actividad de lacasa utilizando ABTS como sustrato. Posteriormente, en el grupo de trabajo, López-Olguín (2011) purificó una lacasa de 97 kDa (Lac97) a partir del sobrenadante de cultivo, por cromatografía de intercambio aniónico. Lac97 presentó un pH y temperatura óptimos de 3.0 y 60 °C, respectivamente. La actividad de Lac97 se incrementó un 25 % de su actividad en presencia de iones Cu^{2+} y fue inhibida por los iones Fe^{3+} y Hg^{2+} .

La característica más sobresaliente fue su termoestabilidad, ya que la vida media ($t_{1/2}$) de la enzima fue de 3.5, 21 y 60 h a 70, 60 y 50 °C, respectivamente. La termoestabilidad de Lac97 es superior a la reportada para lacasas de otros hongos Ascomicetos de su misma familia. Por ejemplo, la vida media ($t_{1/2}$) de una lacasa de *Chaetomium thermophilum* es estable por 1, 12 y 24 h a 70, 50 y 40 °C, respectivamente (Chefetz et al., 1998); mientras que una lacasa de *Myceliophthora thermophila* es estable 30 min a 70 °C (Hilden et al., 2009). Hasta el momento, las dos lacasas con la mayor termoestabilidad reportada son: una lacasa de *Corioplosis gallica* estable por 8 días a 60 °C (Calvo et al., 1998), otra lacasa de la misma especie *Corioplosis gallica* UAMH 8260 produce una lacasa con una termoestabilidad de 24 h a 60 °C (Vandertol et al., 2002).

De forma paralela, López-Olguín (2011) amplificó dos fragmentos de DNA de 1.0 y 1.1 kb por ensayo de RT-PCR, utilizando iniciadores diseñados a partir de secuencias conservadas de lacasas fúngicas reportadas en las bases de datos. En este mismo estudio, se secuenció el fragmento de 1 kb y se logró obtener una secuencia de DNA de 447 pb con secuencias codificantes para una lacasa. La secuencia deducida de aminoácidos (149 aa) de la lacasa de *Thielavia terrestris* cepa Co3Bag1 presentó altos porcentajes de identidad con lacasas de *Chaetomium globosa* (85 %), *Verticillium albo-atrum* (71%) y *Colletotrichum graminícola* (71%). Además, dentro de las 447 pb, se encontraron secuencias codificantes para regiones conservadas en lacasas fúngicas, que corresponden a los sitios de unión a cobre T1 y T3.

II. JUSTIFICACIÓN

El hongo termofílico *Thielavia terrestris* Co3Bag1 produce una lacasa termofílica y termoestable de 97 kDa, por lo cual se considera candidato para su potencial aplicación biotecnológica; sin embargo la producción de lacasa por *T. terrestris* Co3Bag1 es relativamente baja. Por lo que resulta interesante incrementar la actividad de lacasa producida por *T. terrestris* Co3Bag1, modificando las fuentes de carbono y nitrógeno, además de evaluar el efecto del ion cobre en la producción de esta enzima.

Por otra parte, dado que de manera general, las lacasas poseen un bajo potencial redox, y esta característica les imposibilita oxidar sustratos no-fenólicos, disminuyendo ampliamente su rango de acción sobre diversos sustratos. Por lo anterior, resulta de mayor importancia implementar un sistema lacasa-mediador que confiera a la enzima la capacidad de actuar sobre sustratos fenólicos y no-fenólicos.

III. HIPÓTESIS

HI. La actividad de lacasa producida por el hongo termofílico *T. terrestris* Co3Bag1 se verá afectada por la modificación de las fuentes de carbono y nitrógeno del medio de cultivo, y por la presencia de ion Cu^{2+} como inductor.

III. La implementación de un sistema lacasa-mediador ampliará la actividad catalítica de la lacasa de *T. terrestris* Co3Bag1 hacia sustratos no-fenólicos, en comparación con la lacasa sin mediador.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Purificar y caracterizar bioquímicamente una lacasa del hongo termófilo *T. terrestris* Co3Bag1, y evaluar la actividad de la enzima inmovilizada en un sistema lacasa-mediador.

IV.2 Objetivos específicos

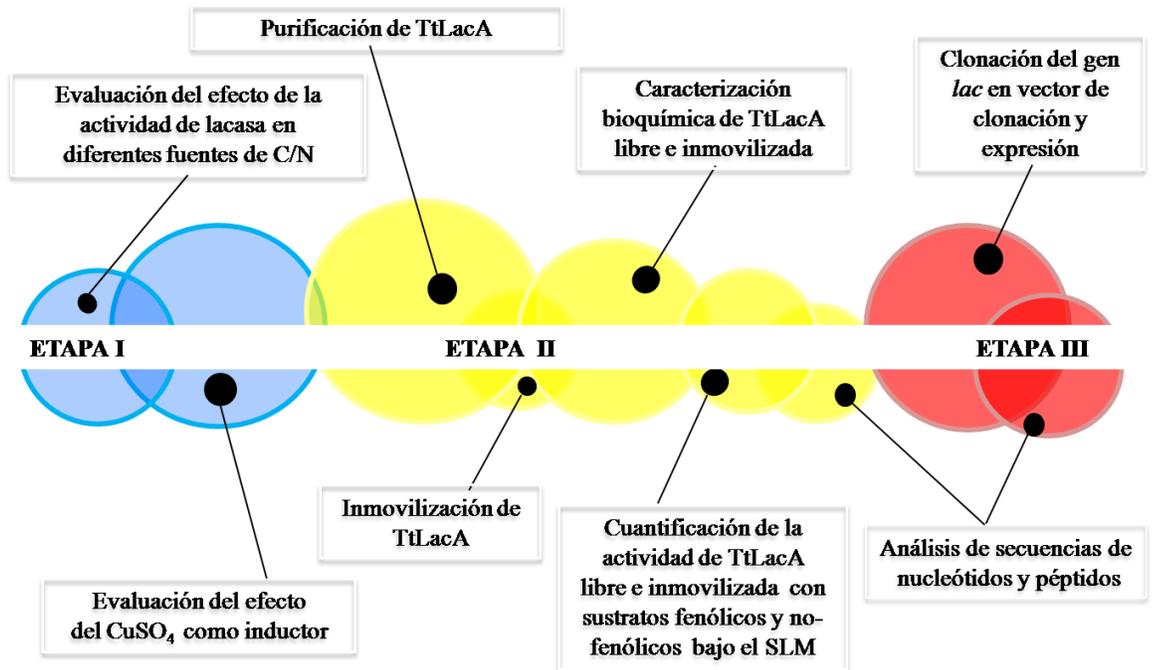
IV.2.1 Evaluar la actividad de lacasa del hongo termófilo *T. terrestris* Co3Bag1 en medio líquido con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, así como en presencia de iones Cu^{2+} como inductor.

IV.2.2 Purificar y caracterizar bioquímicamente la lacasa libre e inmovilizada.

IV.2.3 Implementar un sistema lacasa-mediador y evaluar la actividad catalítica de la enzima inmovilizada sobre sustrato fenólico y no fenólico.

IV.2.4 Clonar y secuenciar el gen codificante para una lacasa del hongo *T. terrestris* Co3Bag1.

V. METODOLOGÍA



VI. MATERIALES Y METODOS

VI.1 Microorganismos y vectores

El hongo filamentoso termofílico *T.terrestris* Co3Bag1 se aisló de composta de gabazo de caña por el grupo del Dr. Sergio Rubén Trejo Estrada, Investigador Titular del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico, Tlaxcala, México. El hongo fue identificado en género y especie por Charles River Laboratories International, Inc. (USA), además por métodos moleculares basados en la secuenciación del rDNA 28S (García-Huante, 2017). Posteriormente, *T. terrestris* Co3Bag1 fue depositada en la Colección de Cultivos CDBB del CINVESTAV-Zacatenco bajo el número de acceso CDBB-H-1938, de donde se obtuvo para realizar este trabajo.

Para la propagación y manipulación del DNA plasmídico empleado en este trabajo se utilizaron células competentes de la cepa *Escherichia coli* DH5 α . La cepa *Aspergillus niger* se utilizó como sistema de expresión heteróloga proporcionada por el grupo de investigación del Dr. Miguel Ángel Gómez Lim del Laboratorio de Biotecnología de Plantas y Microorganismos, Departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV-Irapuato.

VII.1.1 Vector de clonación pJET1.2

El vector de clonación pJET1.2 se utilizó para la clonación del ORF del gen *lacB* de *T. terrestris* Co3Bag1. El vector pJET1.2 (ThermoScientific) tiene un gen letal que es interrumpido por la ligación de un inserto de DNA en el sitio de clonación. Como resultado, sólo las células con el plásmido recombinante se propagaron en el medio de selección. El vector pJET1.2 contiene un sitio múltiple de clonación, así como un promotor T7 para la transcripción in vitro y un gen que confiere resistencia a ampicilina (Fig. VII.1-A).

VII.1.2 Vector de expresión p210/HYG

El vector de expresión p210/HYG fue diseñado por el grupo de investigación del Dr. Gómez Lim del Laboratorio de Biotecnología de Plantas y Microorganismos del CINVESTAV-Irapuato. Este vector de expresión p210/HYG (**Fig. VII.1-B**) tiene una longitud de 10, 386 pb, posee un péptido señal de una α -amilasa, carece de un sitio múltiple de clonación, pues sólo contiene un sitio de inserción con extremos de corte SpeI y PacI. Para la selección de células transformantes, contiene un gen de resistencia a ampicilina e higromicina.

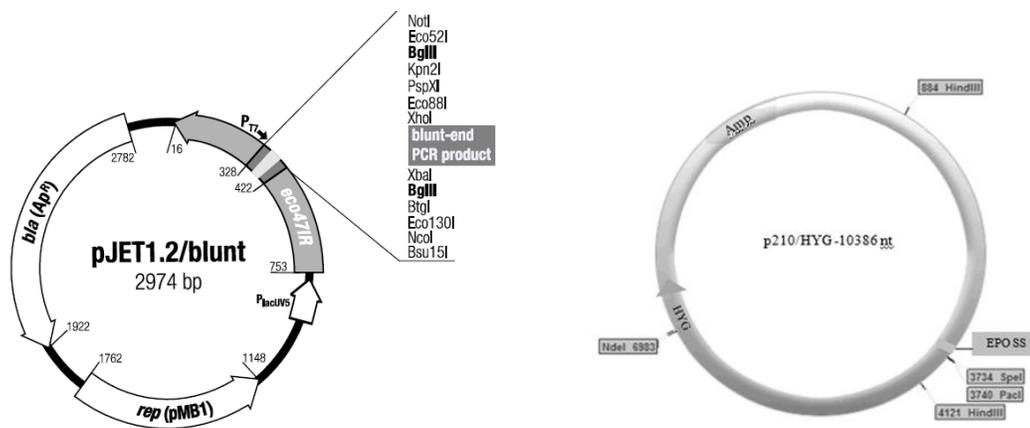


Figura VI.1 A-Vector de clonación pJET1.2 (izquierdo); B-Vector de expresión p210/HYG (derecho).

VI.2 Medios de cultivo

VI.2.1 Medios de cultivo de la cepa *T. terrestris* Co3Bag1

El medio de cultivo sólido para la generación de esporas de *T. terrestris* Co3Bag1 se describió previamente por Tien-Kirk (Tien y Kirk 1988). Las esporas fueron obtenidas cultivando al hongo en matraces de 250 mL, con 30 mL de medio a 45 °C durante 12 días. Su composición por litro es la siguiente:

Glucosa	10 g
Peptona	2 g
Extracto de malta	10 g
Extracto de levadura	2 g

Asparagina	1 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
Agar	20 g

Para la producción de lacasa, el hongo *T. terrestris* Co3Bag1 se cultivó en el medio líquido *T. terrestris* Co3Bag1, previamente descrito por Zouari-Mechichi (Zouari-Mechichi et al., 2006). Su composición por litro es la siguiente:

Glucosa	10 g
Peptona	5 g
Tartrato de amonio	2 g
Extracto de levadura	1 g
KCl	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
Solución de elementos traza	1 mL

Ajustar a pH final de 5.5 con HCl 1.0 M

Solución de elementos traza para Medio Zouari-Mechichi (por litro).

B ₄ O ₇ Na ₂ 10H ₂ O	0.1 g
MnSO ₄ 7H ₂ O	0.01 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.05 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.07 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.01g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0.01g

El medio de cultivo se esterilizó a 121 °C y 15 psi durante 15 min. La solución de elementos traza se esterilizó por filtración, utilizando membranas de 0.20 µm. Como inóculo se utilizaron esporas homogenizadas en agua destilada estéril obtenido de cultivos sólidos de medio Tien-Kirk (1988), previamente incubados a 45 °C por 12 días. El cultivo líquido se incubó en matraces de 250 mL con 50 mL de medio a 45 °C a 120 rpm monitoreando la actividad máxima de lacasa de acuerdo a ensayos realizados.

VI.2.2 Medio de cultivo para la cepa *A. niger*

Para la extracción de ADN genómico de *A. niger*, se cultivó en medio extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPD) sólido cuya composición por litro es la siguiente:

Peptona	10 g
Extracto de levadura	20 g
Dextrosa	20 g
agar	15 g

VI.2.3 Medio de cultivo de la cepa *E. coli*

Para la extracción de DNA plasmídico, las células competentes de *E. coli* DH5α se cultivaron en medio Luria Bertani (LB), cuya composición es la siguiente:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

El cultivo se suplementó con el antibiótico ampicilina (50 mgmL⁻¹) y se cultivó a 37 °C por 16 h a 150 rpm.

VI.3 Evaluación de la actividad de lacasa con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno así como en presencia de iones Cu^{2+}

VI.3.1 Cinética de crecimiento y actividad de lacasa

Para llevar a cabo la cinética de crecimiento y determinar la producción de actividad de lacasa, se partió de esporas que se obtuvieron cultivando el hongo *T. terrestris* Co3Bag1 a 45 °C en medio sólido descrito por Tien-Kirk (Tian y Kirk 1988). Posteriormente, un inóculo de 1×10^6 esporas de *T. terrestris* Co3Bag1 se cultivó en matraces de 250 mL con 50 mL de medio a 45 °C a 120 rpm durante 20 días previamente descrito por Zouari-Mechichi (Zouari-Mechichi et al., 2006).

Cabe señalar que en este trabajo el hongo *T. terrestris* Co3Bag1 se cultivó utilizando la formulación original del medio Zouari-Mechichi (Zouari-Mechichi et al., 2006), pero también se utilizó medio Zouari-Mechichi modificado, donde se excluyó la peptona, el extracto de levadura y el CuSO_4 de la solución de elementos traza. La composición del medio de cultivo líquido se especifica claramente para cada experimento. Cada 24 h se sacrificó un matraz para determinar la biomasa (peso seco) y la actividad de lacasa, durante 20 días. La biomasa fúngica se midió como peso seco. Con este fin, el cultivo del hongo *T. terrestris* Co3Bag1 se filtró a través de un papel de filtro Whatman No1 pesado previamente y se secó a 80 °C hasta llegar a un peso constante. La diferencia de peso se consideró como el peso seco y se estimó en gramos por litro (g L^{-1}). La actividad de lacasa, y la concentración de proteína se determinaron como se describe a continuación.

VI.3.1.1 Cuantificación de la actividad de lacasa

La actividad de lacasa se determinó midiendo la oxidación de ABTS como un sustrato de lacasa. La mezcla de reacción (1 mL) consistió en: 100 μL de enzima, 800 μL de amortiguador de glicina-HCl 100 mM, pH 3.0 y 100 μL de ABTS 5 mM. Las mezclas se incubaron a 50 °C durante 5 min. El cambio en la Absorbancia de la mezcla de reacción con ABTS se monitoreó a 420 nm usando un espectrofotómetro UV/vis. La actividad de la lacasa se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de ABTS ($\epsilon = 36,000 \text{ M}^{-1}$

$^1\text{cm}^{-1}$) (Bourbonnais et al., 1998). Una unidad de actividad de lacasa (U) se definió como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto.

VI.3.1.2 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se cuantificó por el método de Lowry et al, (1951) utilizando BSA como estándar (Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU.) (**XII. Anexo A.1**). Los resultados se reportan como miligramo de proteína por mililitro (mg mL^{-1}).

VI.3.2 Fuentes de carbono y nitrógeno

Para estudiar el efecto de la fuente de carbono y nitrógeno en la producción de lacasa por el hongo *T. terrestris* Co3Bag1 cultivado en medio líquido, las fuentes de carbono y nitrógeno fueron sustituidos de la siguiente manera. Primeramente, la glucosa, como fuente de carbono original en el medio Zouari-Mechichi, fue sustituida por fructosa, maltosa y almidón a la misma concentración (10.0 gL^{-1}).

Una vez que se eligió la mejor fuente de carbono para la producción de actividad lacasa, se estudió el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de actividad de lacasa. Con esta finalidad, el tartrato de amonio, como fuente de nitrógeno original en el medio Zouari-Mechichi, fue reemplazado por extracto de levadura, peptona, sulfato de amonio y nitrato de sodio a la misma concentración (2.0 gL^{-1}).

Después de que se seleccionaron las mejores fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de actividad lacasa, se estudió el efecto de cuatro medios con diferentes proporciones de fuente de carbono/nitrógeno. El medio HCLN, (alto contenido de carbono y bajo contenido de nitrógeno); LCLN (bajo contenido de carbono y bajo contenido de nitrógeno); HCHN, (alto contenido de carbono y alto contenido de nitrógeno) y LCHN (bajo contenido de carbono y alto contenido de nitrógeno). La toma de muestra para cada cultivo fue al día 12, que corresponde al día máximo de actividad de lacasa.

Tabla VI.1 Medios de cultivo con diferentes proporciones de fructosa y nitrato de sodio

Medio	Fuente de carbono (fructosa gL ⁻¹)	Fuente de nitrógeno (nitrato de sodio, gL ⁻¹)
HCLN	20.0	2.0
LCLN	5.0	2.0
HCHN	20.0	5.0
LCHN	5.0	5.0

VI.3.3 Inducción por cobre

Para estudiar el efecto del ion Cu²⁺ en la producción de actividad de lacasa por el hongo *T. terrestris* Co3Bag1, una solución de CuSO₄ se añadió al medio de cultivo modificado seleccionado (HCHN), en los días 0, 4 y 8 de la cinética de crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1 a concentraciones finales de 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 y 2.5 mM. Las actividades de lacasa se midieron desde el día siguiente a la adición del ion Cu²⁺, y hasta 11 días de cultivo posteriores a la adición de este ion metálico.

Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados representados son los promedios de las repeticiones y las barras de error indican las desviaciones estándar.

VI.4 Purificación de TtLacA del hongo *T. terrestris* Co3Bag1.

VI.4.1 Ultrafiltración y diálisis

Para iniciar con la purificación de una lacasa, los cultivos del hongo *T. terrestris* Co3Bag1 descritos anteriormente se cosecharon y agruparon después de 10 días de incubación. Los micelios se eliminaron mediante filtración al vacío y el sobrenadante del cultivo se concentró a 10 ml mediante ultrafiltración a 4 °C usando una membrana de poliétersulfona de 50 kDa (PALL, NY, EE. UU.). El ultrafiltrado se dializó en buffer A (KCl 25 mM, Histidina 50 mM pH 6.0, y glicerol al 5% (v/v)) durante 12 h.

VI.4.2 Purificación de la lacasa por cromatografía de intercambio iónico

El dializado se inyectó a una columna UNOsphere™ Q (19.5x1.6 cm, Bio-Rad) con un volumen de empaque de 8.5 mL, que se equilibró previamente con amortiguador A. Las proteínas unidas a la columna se eluyeron aplicando un gradiente lineal de KCl (0.025-1 M) en buffer A con un flujo constante de 2.0 mLmin⁻¹. A cada una de las fracciones se les determinó cantidad de proteína y actividad de lacasa. Las fracciones con la actividad de lacasa se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% y se conservaron a 4 °C para estudios posteriores.

VI.4.2.1 SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizó siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970) para geles bifásicos de acrilamida-bisacrilamida, empleando el sistema Mini Protean (Bio Rad) (**XII. Anexo A.2**). Para la detección de proteínas en los geles de poliacrilamida se utilizó el método de tinción con Azul de Coomassie R-250. Los geles se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y luego el gel se destiñó usando una mezcla de ácido acético, etanol y agua (10:30:60). El peso molecular de la proteína (PM) se estimó usando estándares de proteína de peso molecular de amplio rango como referencia (Bio-Rad). Los geles se visualizaron y analizaron utilizando un sistema de documentación en gel (DigiDoc-ItImagingSystem, UVP).

VI.4.2.2 Zimograma

La actividad de lacasa fue visualizado de acuerdo al protocolo descrito por Moin et al, (2012) con algunas modificaciones hechas en este trabajo de la siguiente manera: las muestras de proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10 %. Las alícuotas fueron muestras del día de actividad máxima en el medio de cultivo HCHN a diferentes concentraciones de CuSO₄ (ver sección **VI.4.4**) y de muestras purificadas. El zimograma se llevó a cabo en condiciones no desnaturizantes. Esto es, las muestras no fueron sometidas a una desnaturización térmica; además, el amortiguador de carga no contenía 2-mercaptoetanol ni SDS. El SDS tampoco estuvo presente en el amortiguador

de corrida para la electroforesis. Las muestras sólo se incubaron a 37 °C durante 30 min con amortiguador de carga (**XII. Anexo A.2**).

Después de la electroforesis, el gel se incubó a 50°C durante 10 min en buffer de glicina-HCl 100 mM pH 3.0, que contenía ABTS 5 mM como sustrato. En el caso de revelar la actividad enzimática con DMP, se siguió el mismo procedimiento a excepción de la temperatura de incubación que fue de 60°C. Las bandas de proteínas con actividad lacasa se visualizaron mediante el desarrollo de una banda de color verde y naranja para ABTS y DMP, respectivamente.

VI.4.3 Secuenciación de proteínas y modelo 3D

La enzima TtLacA purificada se secuenció parcialmente por espectrometría de masas en tándem (MS/MS), en el Laboratorio Universitario de Proteómica (IBT/UNAM). Se realizó la búsqueda manual de los espectros de MS/MS y se analizó la similitud de la secuencias de aminoácidos de los péptidos utilizando las herramientas disponibles en Proteome Discoverer 1.4 ThermoScientific (<https://www.thermofisher.com/order/>).

La proteína multicobre de *T. terrestris* NRRL 8126 (UniProtKB número de acceso G2R0D5) se utilizó como referencia en el programa ESPript (<http://espript.ibcp.fr/ESPrift/ESPrift/>)(Robert y Gouet 2014) para determinar los elementos estructurales secundarios de TtLacA con otras lacasas.

El modelo de estructura 3D de la proteína multicobre oxidasa de *T. terrestris* NRRL 8126 (número de acceso UniProtKB (G2R0D5)) se generó por medio del servidor I-TASSER (Yang et al. 2015).

VI.5. Caracterización bioquímica de TtLacA

VI.5.1 pH óptimo y estabilidad

El pH óptimo de la lacasa TtLacA se determinó midiendo la actividad de la enzima a diferentes valores de pH (2.2 a 7.0), usando ABTS como sustrato. Para este ensayo se utilizó un amortiguador de glicina-HCl 100 mM para el rango de pH de 2.2 a 3.6; y un

amortiguador de citrato-fosfato 100 mM para el rango de pH de 2.6 a 7. Las muestras de reacción se incubaron a 50 °C por 5 min. Para la estabilidad de pH, las muestras de enzima purificada se incubaron en el amortiguador citrato-fosfato 50 mM a diferentes valores de pH, en un rango de 2.6 a 7.0, a una temperatura de 25 °C durante 50 min. Posteriormente, la actividad de lacasa residual se midió en condiciones estándar y se comparó con la actividad enzimática no incubada a diferentes valores de pH.

VI.5.2 Temperatura óptima y termoestabilidad

Para determinar la temperatura óptima de la lacasa TtLacA se evaluó la actividad de la enzima en amortiguador de glicina-HCl 100 mM a pH 3.0, utilizando ABTS como sustrato, a diferentes temperaturas, en un rango de 25-90 °C, por 5 min. Con el fin de evaluar la termoestabilidad de la lacasa TtLacA, la enzima se incubó a 10 °C \pm de su temperatura óptima a, 55, 65 y 75 °C, en amortiguador de glicina-HCl 100 mM a pH 3.0, en ausencia de sustrato. Para la determinación de la vida media ($t_{1/2}$) de la enzima, se tomaron alícuotas de la muestra en diferentes intervalos de tiempo, y se midió la actividad enzimática residual en condiciones óptimas de pH y temperatura.

VI.5.3 Parámetros cinéticos (K_M y V_{max})

Para la determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la velocidad máxima ($V_{máx}$) de reacción de la lacasa TtLacA, se siguió el método gráfico de Lineweaver-Burk (1934). Se graficó $1/V$ frente a $1/S$, siendo S la concentración de sustrato ensayada y V la velocidad inicial de reacción enzimática. Los parámetros cinéticos de TtLacA se determinaron en condiciones óptimas (65 °C, pH 3.0 por 5 min) para la actividad de la enzima, utilizando ABTS como sustrato, a diferentes concentraciones (0.05-5 mM).

VI.5.4 Efecto de iones metálicos e inhibidores

El efecto de los iones metálicos (Na^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+}) y otros compuestos (EDTA y NaN_3) se evaluaron de forma independiente, incubando la lacasa TtLacA con cada uno de los iones metálicos y los compuestos químicos compuestos a concentraciones finales de 1 y 10 mM. El ensayo se llevó a cabo en condiciones óptimas de actividad en amortiguador de glicina-HCl 100 mM, a 65 °C,

pH 3.0 por 5 min, utilizando ABTS como sustrato. La actividad de lacasa se expresó como la diferencia de porcentaje de la actividad observada en ausencia de los compuestos evaluados.

VI.6. Inmovilización de la actividad de lacasa

El hongo *T. terrestris* Co3Bag1 se cultivó a 45 °C en medio líquido como se describió anteriormente (ver sección **VI.3.1**). Los cultivos de cada matraz se cosecharon y se reunieron después de 10 días de incubación. Los micelios se eliminaron mediante filtración al vacío y el sobrenadante del cultivo se dializó en amortiguador de glicina-HCl 25 mM, pH 3.0. El material dializado se utilizó para inmovilizar la actividad de lacasa del hongo *T. terrestris* Co3Bag1 por dos métodos diferentes: 1) Inmovilización por enlace covalente a nylon-6 e 2) Inmovilización por atrapamiento en perlas de alginato de calcio. Estos ensayos fueron hechos en colaboración por el M. en C. Alejandro Santiago del Lab. 51 DBB CINVESTAV-Zacatenco y la Kassandra Huerta Calleja, estudiante de Ingeniería en Biotecnología del Instituto Tecnológico Corregidora de Querétaro (ITCQ), Querétaro, Qro., México.

VI.6.1 Inmovilización de actividad lacasa en nylon-6

La inmovilización del extracto enzimático en nylon-6 se realizó de acuerdo al método descrito por Ortega et al., (1993). El nylon (1 g) se resuspendió en una solución de tetraborato de sodio (*bórax*) 0.2 M, pH de 9.3, a 70 °C en agitación, e incubada por 20 min. Posteriormente, el nylon se filtró y se lavó con abundante agua desionizada. El nylon se resuspendió nuevamente en 5 mL de PEI al 5 % en una solución amortiguadora tetraborato de sodio 0.2 M, pH 9.3. Esta mezcla se incubó por 3 h a temperatura ambiente. Finalmente, el nylon se filtró y se lavó con agua desionizada.

El soporte polimérico se reactivó con 1 % glutaraldehído en amortiguador de glicina-HCl 25 mM, pH 3.0 durante 15 min a temperatura ambiente. Esta mezcla se filtró y se lavó nuevamente con agua desionizada. El nylon-6 se resuspendió en amortiguador de acoplamiento: KCl 0.05 M, MgCl₂ 0.01M, L-cisteína 0.005 M y 5 % de glicerol en

glicina-HCl 25 mM, pH 3.0. Se incubó durante toda la noche para la posterior inmovilización.

VI.6.1.1 Decoloración de tinte sintético azul de bromofenol

La actividad de lacasa en el extracto enzimático inmovilizado en nylon-6, se midió por la decoloración del colorante azul bromofenol 0.02 %, a una Absorbancia de 595 nm. La medida de decoloración fue expresada en %, siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Decoloración} = \frac{A_o - A_t}{A_o} \times 100$$

Donde A_o es la Absorbancia medida, inmediatamente después de añadir el extracto enzimático y A_t , es la medida de Absorbancia después de cada intervalo de tiempo.

VI.6.2 Inmovilización de la actividad de lacasa en perlas de alginato de calcio

El segundo método de inmovilización de la actividad de lacasa fue por atrapamiento en perlas del alginato de Ca^{2+} (Lira et al., 2018). Se preparó una mezcla de alginato de sodio al 4 % y extracto enzimático (1:1), en agitación continua a temperatura ambiente. Esta mezcla se añadió gota a gota en una solución de CaCl 100 mM a 4 °C. Las perlas formadas se dejaron endurecer (curado) durante toda la noche a 4 °C. La actividad de lacasa en las perlas de alginato de Ca^{2+} se midió utilizando ABTS 5 mM como sustrato (ver sección **VI.3.1.1**).

VI.6.3 Inmovilización de TtLacA en perlas de alginato de cobre

La lacasa TtLacA se inmovilizó en perlas de alginato de Cu^{2+} (Sondhi et al., 2018). Se preparó una mezcla de alginato de sodio al 3 % y 100 UL^{-1} de lacasa (1:1) en agitación continua a temperatura ambiente. Esta mezcla se añadió gota a gota en una solución de CuSO_4 300 mM a 4 °C. Las perlas formadas se dejaron endurecer (curado) durante 16 h a 4 °C. Posteriormente, las perlas se lavaron con agua desionizada hasta no detectar proteína en la solución de lavado.

VI.6.3.1 Caracterización bioquímica de TtLacA inmovilizada

La lacasa TtLacA inmovilizada en perlas de alginato de cobre se caracterizó bioquímicamente bajo las mismas condiciones que la lacasa TtLacA libre (ver sección VI.5). Para cada uno de las determinaciones: pH, temperatura óptima y estabilidad, constantes cinéticas y efecto de iones metálicos e inhibidores, se tomaron 10 perlas de forma independiente y se resuspendieron en amortiguador de glicina-HCl 100 mM, pH 3.0.

VI.7. Cuantificación de eficiencia de inmovilización

La eficiencia de la inmovilización se calculó disolviendo el nylon.6 y las perlas de calcio en amortiguador glicina-HCl 25 mM, pH 3.0 y en 100 mM pH 3.0, para la inmovilización en alginato de cobre, utilizando ABTS como sustrato. Se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\% F\varepsilon = \frac{A}{A - B} \times 100$$

Donde A = Actividad total de la enzima libre y B = Actividad enzima no atrapada (Sondhi et al., 2018). La actividad enzimática no inmovilizada se calculó midiendo la actividad de lacasa en la solución de curado y lavados.

VI.8 Reutilización de TtLacA inmovilizada

Para determinar los reusos del extracto enzimático y TtLacA inmovilizadas en perlas de alginato de Ca^{2+} y Cu^{2+} respectivamente, la actividad enzimática se cuantificó en cada ciclo usando una mezcla de 10 perlas. Las perlas inmovilizadas fueron separadas después de cada reacción y se lavaron con amortiguador de glicina-HCl 25 mM y 100 mM repetidamente. La actividad de lacasa del primer ciclo fue considerado como 100 %. Se reportó la actividad residual después de cada ciclo en condiciones óptimas.

VI.9 Inmovilización de TtLacA-mediador

El complejo TtLacA-ABTS se inmovilizaron en perlas de alginato de cobre (Sondhi et al., 2018). Se preparó una mezcla de alginato de sodio al 3 %, 100 UL^{-1} de lacasa y

ABTS 1 mM (1:1:1) en agitación continua a temperatura ambiente, siguiendo el mismo procedimiento de la inmovilización de TtLacA sola. Las perlas formadas se dejaron endurecer (curado) durante 16 h a 4 °C. Posteriormente fueron lavadas con agua desionizada hasta no detectar proteína en la solución de lavado.

VI.10 Evaluación de la actividad catalítica de TtLacA inmovilizada sobre sustrato no fenólico en un sistema: Lacasa-Mediador

Para determinar la actividad de TtLacA-ABTS, se utilizaron 10 perlas disueltas en amortiguador de glicina-HCl 25 mM, pH 3.0, utilizando alcohol veratrílico (AV) como sustrato no fenólico a una concentración de 3 mM (Heap et al., 2014). La mezcla de reacción se incubó por 24 h y se midió el cambio de Absorbancia por la oxidación de AV a veratraldehído, a una longitud de onda de 310 nm, usando un espectrofotómetro UV/vis. La oxidación de este compuesto se evaluó en un sistema de lacasa libre, ABTS, lacasa-mediador y lacasa-mediador inmovilizadas para su comparación, bajo las condiciones óptimas de actividad de la lacasa TtLacA inmovilizada (amortiguador de glicina-HCl 100 mM, pH 3.0, a 70 °C).

VI.11 Reutilización de TtLacA-ABTS inmovilizado

Para determinar los reusos de TtLacA-ABTS inmovilizada, la actividad enzimática se cuantificó en cada ciclo usando 10 perlas de alginato de Cu^{2+} . Las perlas inmovilizadas fueron separadas después de cada reacción y se lavaron con amortiguador de glicina-HCl 100 mM, pH 3.0, repetidamente. La actividad de TtLacA-ABTS del primer ciclo fue considerado como 100 % utilizando como sustrato AV 3 mM. Se reportó la actividad residual después de cada ciclo en condiciones óptimas de TtLacA inmovilizada (amortiguador de glicina-HCl 100 mM, pH 3.0, a 70 °C por 24 h).

VI.12 Clonación de un gen que codifica para una lacasa de *T. terrestris* Co3Bag1

VI.12.1 Extracción de ácidos nucleicos de *T. terrestris* Co3Bag1

Se partió de un cultivo de la cepa *T. terrestris* Co3Bag1 de 30 mL de medio líquido modificado en este trabajo de Zouari-Mechichi (2006), previamente inoculado con una suspensión de esporas e incubado durante 24 h para la extracción de ADN y 216 h para

la extracción de ARN; en ambos casos la temperatura de incubación fue de 45 °C y la agitación de 120 rpm. El micelio se colectó por centrifugación a 4,000 rpm durante 10 min, e inmediatamente se congeló con nitrógeno líquido; posteriormente, el micelio congelado se trituró hasta formar partículas en forma de polvo. Se prepararon alícuotas de ~20 mg y se almacenaron en congelación para su posterior manipulación.

VI.12.1.1 Extracción de ARN total

La extracción del RNA total del hongo se realizó utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen 74104), siguiendo las indicaciones del proveedor. El material obtenido fue visualizado en geles de agarosa (ver sección **VI.11**), para determinar cantidad y calidad del mismo.

VI.12.1.2 Extracción de ADN genómico de *T. terrestris* Co3Bag1

La extracción del ADN genómico se realizó utilizando el DNeasyBlood&Tissue Kit (Qiagen), siguiendo las indicaciones del proveedor. El material obtenido fue visualizado en geles de agarosa (ver sección **VI.11**), para determinar cantidad y calidad del mismo. Para la secuenciación del genoma de *T. terrestris* Co3Bag1, se siguió el mismo procedimiento para obtener material con los parámetros de calidad solicitados por la compañía Otogenetics® (USA).

VI.12.1.3 Extracción de ácidos nucleicos de *A. niger*

Se obtuvo ADN genómico de 4 de las 15 clonas positivas de *A. niger* transformado. A partir de un cultivo de *A. niger* de 5 días en medio YPD-agar en matraces de 250 mL. El micelio se separó del medio sólido, con 10 mL de amortiguador TE (**XII. Anexo A.3**). El micelio se colectó en un tubo de 1.5 mL y fue centrifugado hasta la formación de una pastilla de aproximadamente 1/3 del tubo. Esta pastilla se lavó con amortiguador TE una vez y se volvió a centrifugar por 10 min a 4000 rpm. Se añadieron 400 µl de amortiguador de extracción (**XII. Anexo A.3**) en el micelio para su maceración alternando la agitación en vortex durante 10 min. Se agregaron 4 µl de RNasa y se incubó por 10 min a 65°C con agitación suave, posteriormente se agregaron 150 µl de acetato de sodio 3.0 M, pH 5.2. La mezcla se incubó a 0 °C por 10 min. El lisado se centrifugó a 4000 rpm a 4°C por 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

El ADN se precipito por la adición de 650 μ l isopropanol y se centrifugó por 10 min a 4°C a 4000 rpm. La pastilla obtenida se lavó con etanol frio al 70 %. El material obtenido se resuspendió en 100 μ l de H₂O destilada estéril. El DNA se visualizó en geles de agarosa (ver sección VI.11).

VI.12.2 Síntesis de cDNA y amplificación del gen *lac*

Para la síntesis de cDNA se utilizó RNA total de buena calidad, de acuerdo a previo análisis en gel de agarosa. El cDNA se obtuvo utilizando el PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (TAKARA), siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente, una vez obtenida la cadena de cDNA, se amplificó el gen que codifica para la lacasa, contenidas en el mismo manual del kit.

Las condiciones generales de la PCR fueron: un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 min; 30 ciclos en los que se repitió la siguiente secuencia: desnaturalización a 95 °C durante 45 segundos, alineamiento de los oligonucleótidos a 60 °C por 45 segundos, polimerización a 72 °C de 1.8 min, y por último la reacción se concluyó con una polimerización a 72 °C durante 10 min. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.0 % a 80 V.

Inicialmente se utilizó un par de oligonucleótidos LACD1 y LACR2 (López-Olguín 2011) diseñados a partir de secuencias codificantes para lacasa en regiones altamente conservadas, que corresponden a sitios de unión a Cu²⁺. A partir de la primera secuencia obtenida, en este trabajo se diseñaron nuevos oligonucleótidos para continuar con su secuenciación del ORF del gen *lac* a partir de alineamientos múltiples con otras lacasas de diferentes hongos (Tabla VI.2).

Tabla VI.2 Secuencia de oligonucleótidos para amplificar el ORF del gen *lac*.

Nombre	Oligonucleótidos	Temperatura de fusión (°C)	Longitud (pb)
LACD1	5'-ggcacctYctggtaccactccac-3' (donde Y= c/t)	76/74	24
LAF-Amag	5'-gccgcctgctctggaacacagc-3'	76	23
LAF-Bmag	5'-actggcgtcaccagggagtattgg-3'	76	24

LAF-Cmag	5'-caagttttccattgataatcacaccatg-3'	76	27
LACR2	5'-gttgccgtgcttgatggggg-3'	74	23
LAR-Dmag	5'-atgggaatggtaccagtagtgcc-3'	74	24
LAR-Emag	5'-gccgtagtagacgatgccg-3'	74	23
LAR-Fmag	5'-gatgtggcaatgcatcagccacgc-3'	76	24

Continuación...

Para la clonación del gen *lacB* completo, tanto en el vector de clonación pJET1.2/blunt cloning como en el vector de expresión p210/HYG, se diseñaron un par de oligonucleótidos con sitio de corte específico para las enzimas de restricción SpeI y PacI (**Tabla VI.3**). La reacción de amplificación de fragmento de ADN genómico se llevó a cabo utilizando el *Hot-StarTaqMaster MixKit* (Quiagen), siguiendo las especificaciones del proveedor. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.0 %, a 80 V.

Tabla VI.3 Secuencia de oligonucleótidos con sitios de restricción para SpeI (directo) y PacI (reverso) para amplificar el gen *lacB*.

Nombre	Oligonucleótidos	Temperatura de fusión (°C)	Longitud (pb)
LACSp	5'-A'CTAGTtgcgactccgacgccgaacc-3'	84	27
LACPc	5'-cgtcctcctacataccgtagactAATTAAT' T -3'	86	32

Los fragmentos de interés fueron purificados a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8 % de acuerdo al protocolo de QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen). La unión de fragmentos de ADN a vectores fue llevada a cabo usando la enzima ADN ligasa procedente del bacteriófago T4 (Biolabs). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 20 µl, añadiendo el vector pJET1.2/blunt cloning y el gen *lac* en una proporción 1:2, siguiendo las especificaciones del proveedor (ThermoScientific).

Cada fragmento de ADN fue secuenciado en UBIPRO FES-Iztacala, para el posterior análisis de secuencias, y de esta manera confirmar la obtención de la construcción deseada.

VI.13.Transformación de células *E. coli* DH5- α

Las construcciones *lac/pJET1.2* se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α tratadas con CaCl₂, preparadas de acuerdo a Cohen et al., (1972). El ensayo de transformación se realizó por choque térmico. Las células transformadas se seleccionaron por resistencia a antibiótico en medio sólido, después de incubación a 37 °C durante 16 h a 150 rpm, de acuerdo al protocolo de pJET1.2/blunt cloning. Sólo las clonas crecidas serían las que han sido transformadas, mismas que se sometieron a pruebas de mapeo con enzimas de restricción para corroborar la presencia del inserto.

VI.13.1 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* DH5- α

Las clonas candidatas se cultivaron en medio líquido LB con antibiótico a 30 °C por 12 h. El DNA plasmídico de las clonas positivas fue obtenido siguiendo las especificaciones del proveedor MiniPrep (Quiagen), y se digirieron con enzimas de restricción correspondiente para liberar el fragmento de interés y corroborar las clonas positivas.

VI.13.4 Amplificación del gen *lacB* a partir de ADN genómico de *A. niger*

La amplificación del gen codificante para la lacasa *lacB* se realizó por PCR a partir de ADN genómico de 4 clonas positivas de *A. niger* transformado. Se realizó la PCR utilizando la enzima High Fidelity Taq DNA polimerasa (Qiagen) y la mezcla de reacción (volumen total 100 μ l) se preparó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (**XII. Anexo A.4**). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 min; 35 ciclos en los que se repitió la siguiente secuencia: desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos, alineamiento de los oligonucleótidos a 56.9 °C durante 1 min, polimerización a 72 °C de 1.3 min, y por último la reacción se concluyó con una polimerización a 72 °C durante 10 min. Los productos de amplificación fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.0 % a 80 V

VI.13 Electroforesis en gel agarosa

La separación de fragmentos de ADN, en función de su masa molecular, se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. Este protocolo se realizó para determinar el tamaño de los insertos, visualizar resultados de digestión y corroborar las transformaciones bacterianas. Para ello, se prepararon geles al 1 y 0.8 % (p/v) en buffer TAE 1x (BioRad), y la electroforesis en horizontal se llevó a cabo en el mismo amortiguador. Las muestras se mezclaron en amortiguador de carga 6x (glicerol 30 % p/v y azul de bromofenol 0.25% p/v) y posteriormente se cargaron en el gel. Las muestras se corrieron a 80 V por 1 h. Para la tinción de los geles se empleó una solución de bromuro de etidio ($0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$), que tras 5 min permitió la visualización de las bandas en un transiluminador de luz UV. El tamaño de los fragmentos analizados se comparó con patrones de ADN de masa molecular conocida (1 kb Lambda DNA/Fermentas).

Los fragmentos de interés fueron purificados a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8 % de acuerdo al protocolo de QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) y fueron secuenciados para su análisis informático. Este procedimiento se siguió hasta obtener el gen completo de *lacB*.

VI.14 Análisis de secuencias

Para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizaron servidores informáticos: Para ensamblar las secuencias parciales o los cromatogramas de una misma clona se empleó el programa Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>), que permitió el manejo de los cromatogramas y exportar la secuencia a otros formatos.

El algoritmo FASTA (Pearson y Lipman, 1988) es una aproximación al algoritmo de Smith-Waterman (1981), que divide la secuencia en palabras solapantes, con una longitud de dos letras para proteínas o seis para ácidos nucleicos. Las comparaciones de secuencias usando las diferentes variantes del algoritmo BLAST se llevaron a cabo en la página web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Para los alineamientos realizados en este trabajo se empleó el programa ClustalX y ClustalW (Thompson y col., 1994). Para la búsqueda de marco de lectura abierta (Open Reading Frames, ORFs) sobre las secuencias de ADN, se utilizó Reverse Translate; SignalP (Prediction of signal peptide cleavage sites), para la señalización del péptido señal y finalmente la NetCGly (C-mannosylation sites in mammalian proteins), para ubicar sitios posibles de glicosilación, de acuerdo al programa *Expasy* que forma parte del paquete bioinformático *Bioinformatics Resource Expasy* (<https://www.expasy.org/tools/>).

VII.RESULTADOS

VII.1 Efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la actividad lacasa del hongo termófilo *Thielavia terrestris* Co3Bag1

Con la finalidad de incrementar la producción de la actividad lacasa producida por el hongo *T. terrestris* Co3Bag1, primeramente se evaluó la influencia de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la cinética de crecimiento y la actividad lacasa de *T. terrestris* Co3Bag1. El hongo se cultivó a 45 °C y 120 rpm por 20 días en medio Zouari-Mechichi et al (2006), modificado en este trabajo como se describe en Materiales y Métodos (**sección VI.3.1**). La glucosa, fuente de carbono original, fue sustituida por distintas azúcares como fuentes de carbono: un monosacárido (fructosa), un disacárido (maltosa) y un polisacárido (almidón); mientras que el tartrato de amonio, fuente de nitrógeno original, fue sustituido por distintas fuentes de nitrógeno, dos inorgánicas: nitrato de sodio (NaNO_3) y sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), y dos orgánicas: peptona y extracto de levadura. Para evaluar el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno en la actividad lacasa producida por *T. terrestris* Co3Bag1 se determinó la actividad enzimática en el sobrenadante de cultivo del hongo, el cual fue obtenido como se describe en la sección **VI.4**.

T. terrestris Co3Bag1 produjo actividad lacasa en todas las fuentes de carbono tratadas (**Fig. VII.1-A**). La máxima actividad de lacasa se obtuvo sustituyendo la glucosa por fructosa, con una actividad enzimática de 5.03 UL^{-1} y una biomasa de 0.295 gL^{-1} (día 16); mientras que la actividad disminuyó drásticamente al día 18 para después terminar con una actividad enzimática de 2.24 UL^{-1} en el día 20, al término del cultivo. Con este monosacárido se observó un menor crecimiento y se mantuvo una fase estacionaria hasta el día 10, para después decaer paulatinamente a partir del día 12.

Niveles de actividad de lacasa similares fueron mostrados por las fuentes de carbono maltosa (**Fig. VII.1-C**) (2.76 UL^{-1} , y biomasa de 0.357 gL^{-1} al día 13), y almidón (**Fig. VII.1-D**) (2.48 UL^{-1} , y biomasa de 0.633 gL^{-1} al día 14), respectivamente. En ambos

casos, los niveles de lacasa fueron inferiores en comparación al cultivo control con glucosa como fuente de carbono (**Fig. VII.1-B**), con 3.27 UL^{-1} , y biomasa de 0.53 gL^{-1} al día 13, que corresponde a la fase estacionaria del hongo, donde se observa una fase estacional de cuatro días, para después decaer paulatinamente a partir del día 15.

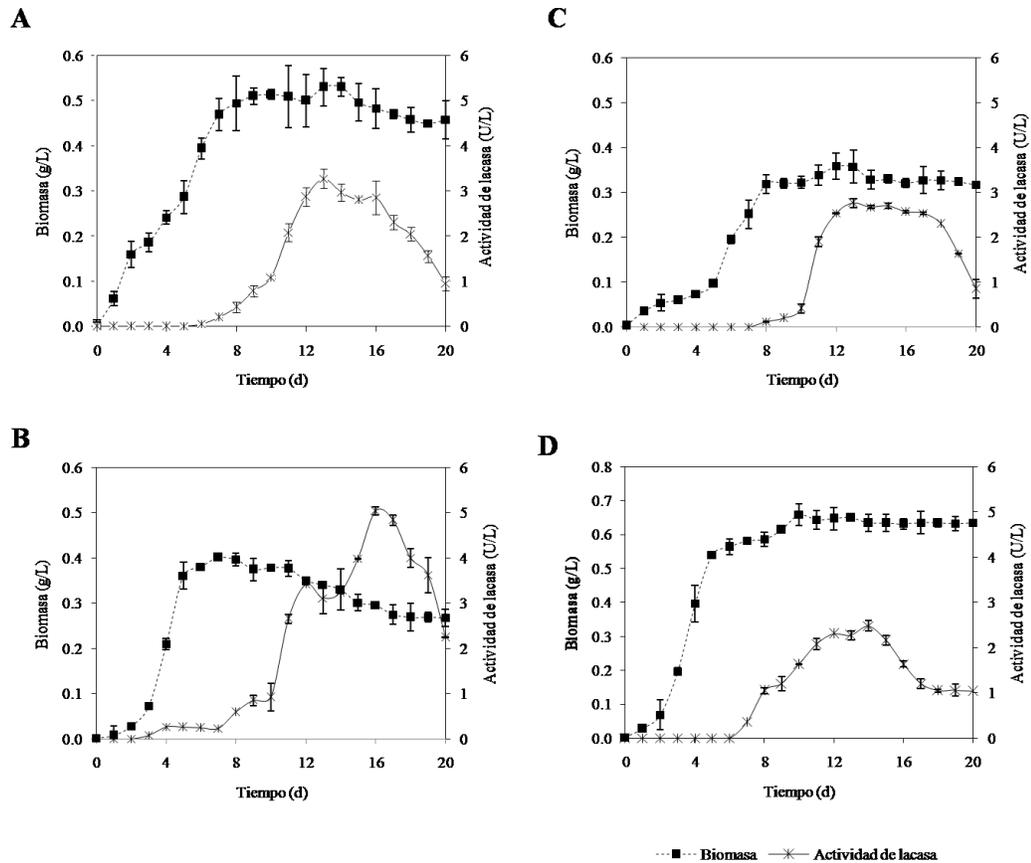


Figura VII.1 Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad de lacasa y cinética de crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1. **A**, glucosa; **B**, fructosa; **C**, maltosa y **D**, almidón.

Posteriormente se determinó el efecto de la adición de diferentes fuentes de nitrógeno (orgánicas e inorgánicas) sobre la actividad de lacasa y el crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1 utilizando fructosa (10 gL^{-1}), como fuente de carbono.

La máxima actividad de lacasa se obtuvo sustituyendo el tartrato de amonio por nitrato de sodio (**Fig. VII.2-A**), condición en la que se observaron dos picos de actividad: 16.02 UL⁻¹, con una biomasa de 0.301 gL⁻¹ al día 12, y un segundo pico de 13.87 UL⁻¹ con una biomasa de 0.25 gL⁻¹ al día 19. Sin embargo, el crecimiento del hongo fue lento comparado con fuentes de nitrógeno orgánicas. En la curva de crecimiento, la fase exponencial terminó el día 8 para iniciar una fase estacionaria por 7 días, para después observar una ligera disminución de biomasa hasta el término del cultivo (día 20).

El sulfato de amonio (**Fig. VII.1-B**), favoreció la actividad de lacasa a 6.47 UL⁻¹ con una biomasa de 0.364 gL⁻¹ (día 18), además se observó un crecimiento lento cuya fase exponencial inició después de tres días y posteriormente una fase estacionaria hasta el día 10. En el día 11 se observó un ligero aumento de biomasa, siguiendo una segunda fase estacionaria durante todo el cultivo.

La presencia de otras fuentes de nitrógeno redujo la actividad de lacasa. Con extracto de levadura (**Fig. VII.1-C**), se observó una actividad máxima de 2.69 UL⁻¹, con biomasa de 0.79 gL⁻¹ al día 18, y el nivel más bajo de actividad lacasa se observó con la peptona (**Fig. VII.1-D**), (0.93 UL⁻¹ con biomasa de 0.81 gL⁻¹ al día 13). Con ambas fuentes de nitrógeno orgánicas se obtuvieron tres veces más biomasa que en fuentes de nitrógeno inorgánicas, un crecimiento inicial exponencial acelerado y una fase estacionaria invariable y de largo periodo.

Finalmente, *T. terrestris* Co3Bag1 se cultivó en un medio preparado con la fuente de carbono (fructosa) y la fuente de nitrógeno (nitrato de sodio), con las cuales, de manera independiente, se observaron los niveles más altos de actividad lacasa. Esta fue la mejor combinación de fuentes de carbono y nitrógeno, ya que se registró una actividad máxima de lacasa de 16.02 UL⁻¹ en el día 12 de cultivo, comparado con el medio con glucosa y tartrato de amonio donde se detectó una actividad máxima de lacasa de 3.27 UL⁻¹ en el día 13 de cultivo

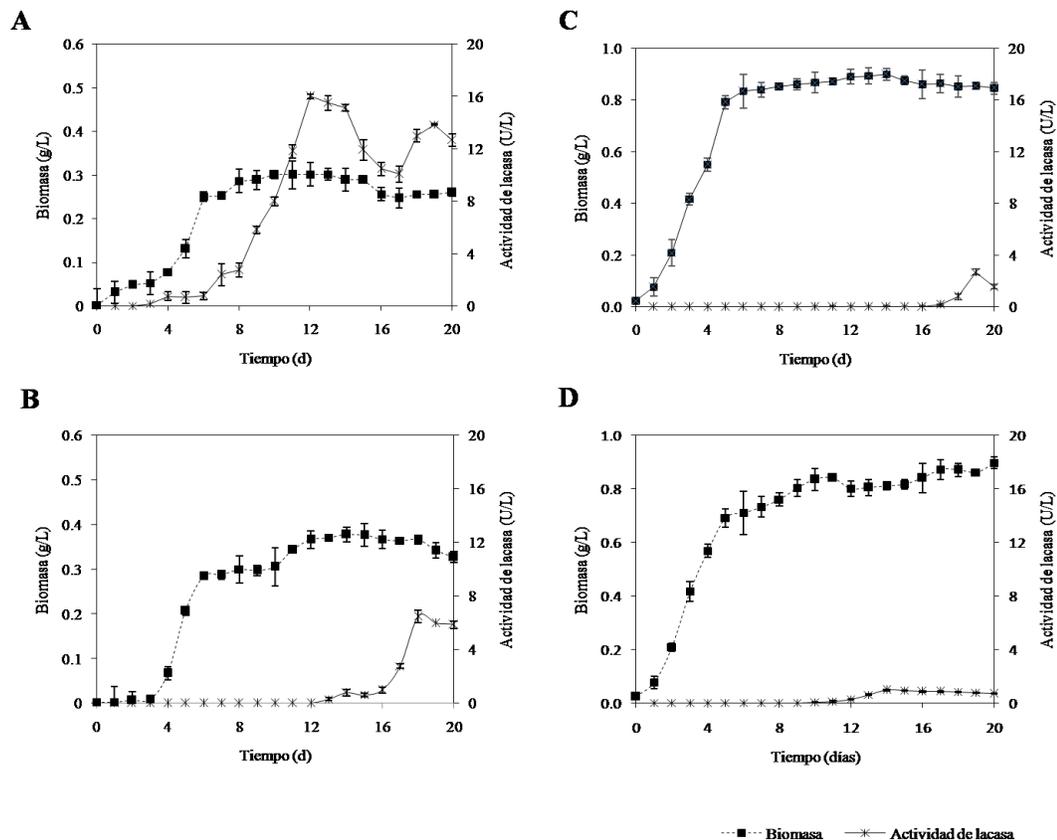


Figura VII.2 Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad de lacasa y cinética de crecimiento *T. terrestris* Co3Bag1. **A**, nitrato de sodio; **B**, sulfato de amonio, **C**, extracto de levadura y **D**, peptona.

VII.1.1 Efecto de la concentración de fuente de carbono y nitrógeno en la actividad de lacasa

Posteriormente se evaluó el efecto de la concentración de fructosa y nitrato de sodio sobre la actividad de lacasa (**Fig. VII.3**), donde se observó que la actividad enzimática se incrementó con el aumento de la concentración de fructosa hasta 20 gL⁻¹. La mayor actividad de lacasa se registró en el medio HCHN (25.73 UL⁻¹), seguido de la actividad lacasa (20.85 UL⁻¹) observada en el medio HCLN. La concentración de nitrato de sodio no mostró influencia significativa en la actividad de lacasa para estas dos combinaciones; sin embargo, cuando la concentración de fructosa fue baja, la actividad de lacasa disminuyó a 4.67 y 5.16 UL⁻¹ en los medios de cultivo LCLN y LCHN, respectivamente.

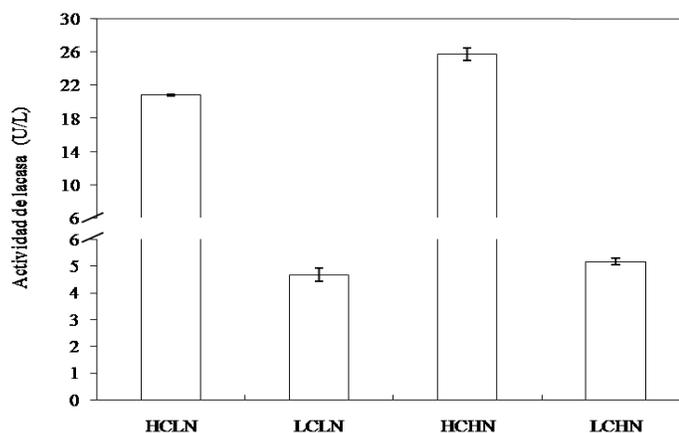


Figura VII.3 Efecto de la concentración de fructosa y nitrato de sodio sobre la actividad de lacasa en *T. terrestris* Co3Bag1 en medio líquido. El medio HCLN, alto contenido de carbono y bajo contenido de nitrógeno; LCLN, bajo contenido de carbono y bajo contenido de nitrógeno; HCHN, alto contenido de carbono y alto contenido de nitrógeno) y LCHN, bajo contenido de carbono y alto contenido de nitrógeno.

Estos resultados sugieren que HCHN fue el mejor medio para obtener la mayor actividad de lacasa de *T. terrestris* Co3Bag1. De hecho, este medio proporciona una actividad de lacasa 7.8 veces mayor que el medio de referencia que utiliza glucosa y tartrato de amonio, por lo que fue seleccionado para estudios posteriores de este trabajo.

VII.2 Efecto de cobre sobre la actividad de lacasa

De acuerdo a los experimentos preliminares del crecimiento del hongo y la actividad de lacasa en el medio de cultivo líquido mejorado HCHN, se añadió cobre en tres fases de crecimiento del hongo: inicio del cultivo, fase logarítmica y fase estacionaria. La adición de cobre en la fase logarítmica fue la mejor estrategia para una mayor producción de lacasa por *T. terrestris* Co3Bag1.

La **Figura VII.4** muestra la actividad de lacasa con Cu^{2+} a diferentes concentraciones añadido al inicio del cultivo. La máxima actividad de lacasa se observó con una concentración de CuSO_4 a 2.0 mM con 345.71 UL^{-1} ; sin embargo, cuando la concentración de CuSO_4 se incrementó a 2.5 mM se observó actividad máxima de lacasa de sólo 251.98 UL^{-1} , ambas actividades enzimáticas decayeron en días posteriores de

cultivo (día 9). En el caso de CuSO_4 a 1.0 mM se observó una máxima actividad de lacasa de 297.53 UL^{-1} , esta actividad enzimática se mantuvo estable durante los siguientes cuatro días de cultivo. Las actividades de lacasa más bajas se obtuvieron con concentraciones de CuSO_4 , 0.2 y 0.5 mM con 50.29 UL^{-1} y 70.94 UL^{-1} respectivamente.

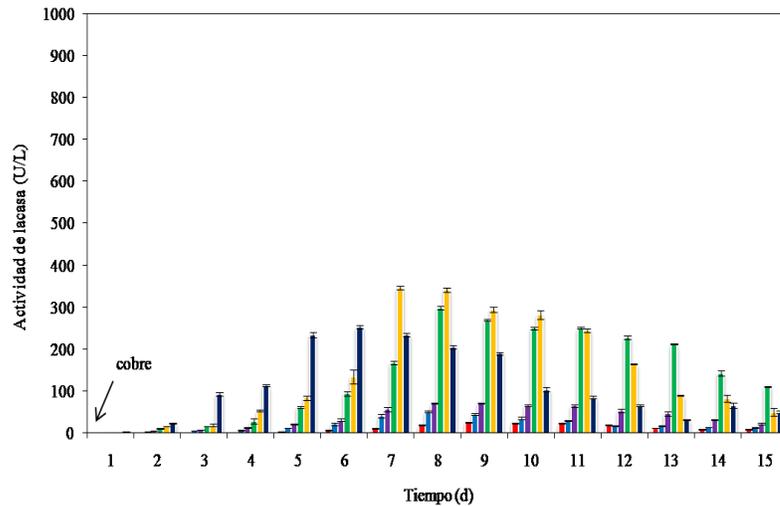


Figura VII.4 Efecto del cobre sobre la actividad de lacasa por *T. terrestris* Co3Bag1 en medio HCHN. Medio suplementado con diferentes concentraciones de CuSO_4 añadido al inicio del cultivo (↓0 día). Control (rojo); 0.20 mM (azul); 0.50 mM (morado); 1.0 mM (verde), 2.0 mM (amarillo); 2.5 mM (azul oscuro).

La **Figura VII.5**, muestra la actividad de lacasa con CuSO_4 a diferentes concentraciones añadido en la fase estacionaria (día 8). La mayores actividades de lacasa se observaron con concentraciones de CuSO_4 , 0.50 mM y 1.0 mM con 143.37 UL^{-1} y 119.62 UL^{-1} , respectivamente. Para una concentración de CuSO_4 de 2.0 mM y 0.2 mM se observó una máxima actividad de lacasa de 76.63 UL^{-1} y 67.42 UL^{-1} , respectivamente. La actividad más baja, 42.6 UL^{-1} , se observó con una concentración de CuSO_4 de 2.5 mM.

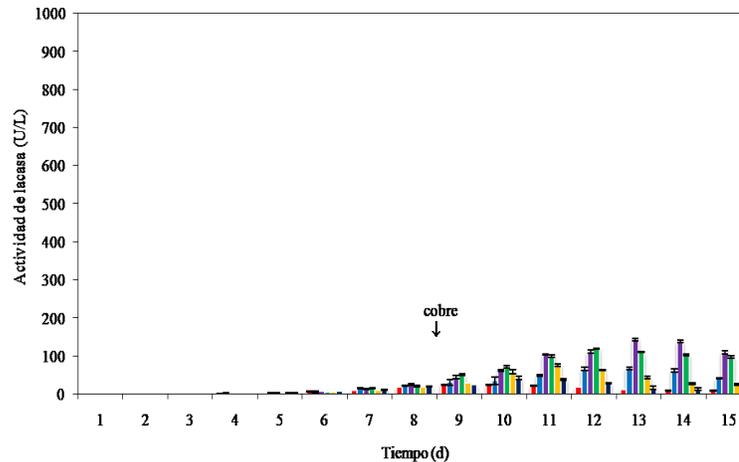


Figura VII.4. Efecto del cobre sobre la actividad de lacasa por *T. terrestris*Co3Bag1 en medio HCHN. Medio suplementado con diferentes concentraciones de CuSO_4 añadido en la fase estacionaria de crecimiento ($\downarrow 8^\circ$ día). Control (rojo); 0.20 mM (azul); 0.50 mM (morado); 1.0 mM (verde), 2.0 mM (amarillo); 2.5 mM (azul oscuro).

Finalmente se muestra en la **Figura VII.6**, la actividad de lacasa inducida con CuSO_4 , a diferentes concentraciones, añadido el día 4 del cultivo, y que corresponde a la mitad de la fase logarítmica del crecimiento del hongo. Se observó un incremento de actividad de lacasa en todos los conjuntos. La actividad de lacasa más alta fue de 862.76 UL^{-1} , 34.1 veces mayor que en el cultivo control (sin cobre 25.27 UL^{-1}), y fue obtenida en presencia de CuSO_4 1.0 mM en el décimo día de cultivo. Cuando se adicionó CuSO_4 a 2.0 mM, la máxima actividad de lacasa (661.19 UL^{-1}) se registró después de 13 días de cultivo; y aunque la actividad enzimática fue inferior a la observada con CuSO_4 1.0 mM, la actividad lacasa fue más estable, ya que mantuvo el mismo nivel de actividad enzimática durante 6 días.

Un efecto similar se registró con CuSO_4 a 2.5 mM, donde la máxima actividad de lacasa fue de 458.0 UL^{-1} después de 8 días de cultivo y se mantuvo a un mismo nivel durante 4 días. Cuando la concentración de CuSO_4 fue de 0.5 mM, la máxima actividad de lacasa fue de 581.29 UL^{-1} al día 9 del cultivo. Finalmente, a una concentración de 0.2 mM de CuSO_4 , se observó una máxima actividad de lacasa de 237.58 UL^{-1} también al día 10, notablemente menor que los observados en concentraciones de cobre anteriores, pero considerable más alto que el control (9.4 veces mayor).

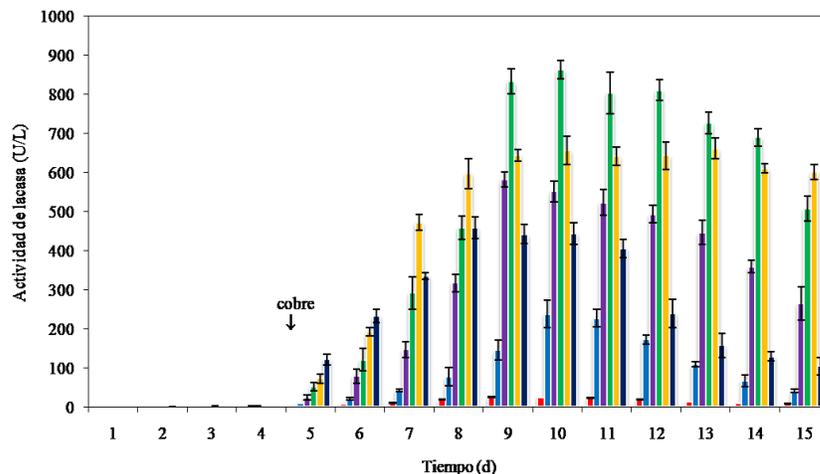


Figura VII.6 Efecto del cobre sobre la actividad de lacasa por *T. terrestris*Co3Bag1 en medio HCHN. Medio suplementado con diferentes concentraciones de CuSO₄ añadido en la fase logarítmica de crecimiento (↓4º día). Control (rojo); 0.20 mM (azul); 0.50 mM (morado); 1.0 mM (verde), 2.0 mM (amarillo); 2.5 mM (azul oscuro).

Se realizó un análisis de la actividad de lacasa en Zimograma para cada una de las máximas actividades enzimáticas de este último ensayo. La actividad enzimática se reveló con ABTS a 5 mM como sustrato, que muestra la actividad máxima obtenida a diferentes concentraciones de CuSO₄ en diferentes días (número en paréntesis).

En el Zimograma de la **Fig. VII.7** se observa un incremento en la intensidad de coloración verde con la misma migración, que revela la actividad de lacasa con CuSO₄ de 0.2 a 1.0 mM. Las bandas de concentraciones de CuSO₄ más altas de 2.0 y 2.5 mM, también revelan actividad de lacasa sin embargo, se observa más de una banda con actividad de lacasa para ambos casos, pero la banda de actividad presentó mayor migración.

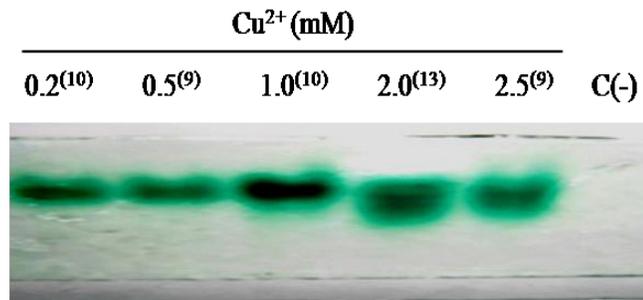


Figura VII.7 Zimograma de actividad de lacasa. Muestras tomadas del día máximo de actividad de lacasa (día entre paréntesis), en medio modificado HCHN suplementado con diferentes concentraciones de CuSO₄.

En último lugar se realizó una cinética de crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1 en medio modificado HCHN, suplementado con CuSO₄ a 1 mM (**Fig. VII.8**), y como control se hizo un cultivo con medio sin cobre. Ambas determinaciones mostraron ser las curvas de crecimiento logarítmicas típicas con una producción de biomasa máxima en el octavo día de 0.350 y 0.364 gL⁻¹ en presencia y ausencia de cobre, respectivamente. Para el medio de cultivo inducido por cobre al 4º día, 24 h después disminuyó ligeramente el crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1 hasta el final del cultivo, no siendo así para el medio de cultivo control, que permaneció constante durante 36 h más.

Esto demostró que a una concentración de CuSO₄ a 1 mM, agregado al cultivo durante la fase logarítmica, disminuye ligeramente la producción de biomasa del hongo *T. terrestris* Co3Bag1. En la misma **Figura VII.8**, podemos visualizar de nuevo, el incremento de la actividad de lacasa para cada uno de los puntos comparada con el control (medio HCHN sin cobre). La actividad enzimática está representada en barras y la biomasa por líneas.

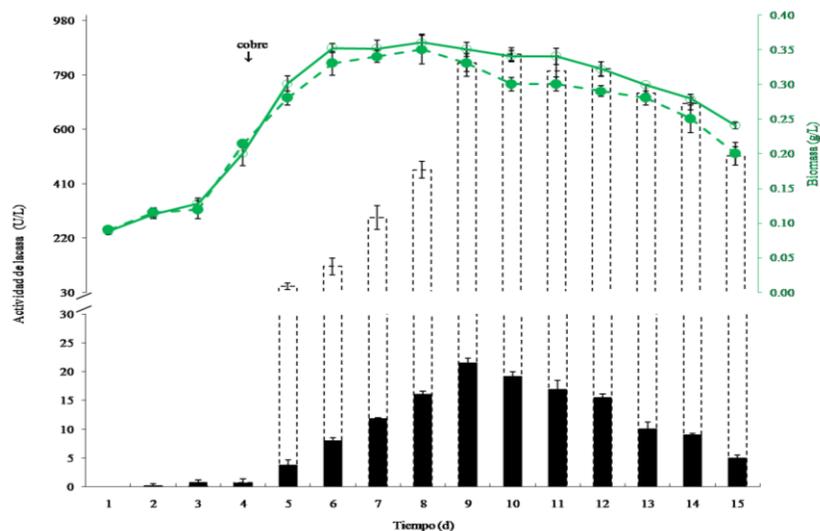


Figura VII.8 Efecto del cobre añadido en la fase logarítmica de crecimiento (\downarrow 4º día) sobre la actividad de lacasa y crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1 en medio HCHN. Actividad de lacasa ($U L^{-1}$), representado en barras: $CuSO_4$ a 1 mM, (----) y sin cobre (—). Biomasa ($g L^{-1}$) representado en líneas: $CuSO_4$ a 1 mM (----) y sin cobre (—)

VII.3 Purificación de TtLacA del hongo *T. terrestris* Co3Bag1

Una lacasa extracelular fue purificada a partir del sobrenadante de cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1 mediante cromatografía de intercambio aniónico. Todos los pasos de purificación se encuentran resumidos en la **Tabla VII.1**. La lacasa se purificó a homogeneidad con 15.6 veces factor de purificación y un rendimiento de 32.5 % con una actividad específica de $1.852 U mg^{-1}$.

Tabla VII.1 Etapas de purificación de la lacasa TtLacA

Etapa de Purificación	Proteína ($mg mL^{-1}$)	Actividad Total ($U mL^{-1}$)	Actividad específica ($U mg^{-1}$)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto Crudo	8.014	1.195	0.148	100	1.0
Ultrafiltración (50 kDa)	0.692	0.857	1.238	71.7	10.4
Cromatografía de intercambio aniónico	0.21	0.389	1.852	32.5	15.6

El análisis por SDS-PAGE de fracciones con actividad de lacasa permitió observar una banda principal con un PM estimado de aproximadamente 70 kDa (**Fig. VII.9-A**), y otros componentes menores. El análisis de zimograma reveló la actividad de lacasa, utilizando como sustratos ABTS y DMP. Se detectó una banda con escasa migración, quedando la proteína retenida en la zona superior del gel de poliacrilamida para ambos sustratos (**Fig. VII.9-B**). La enzima purificada fue nombrada TtLacA.

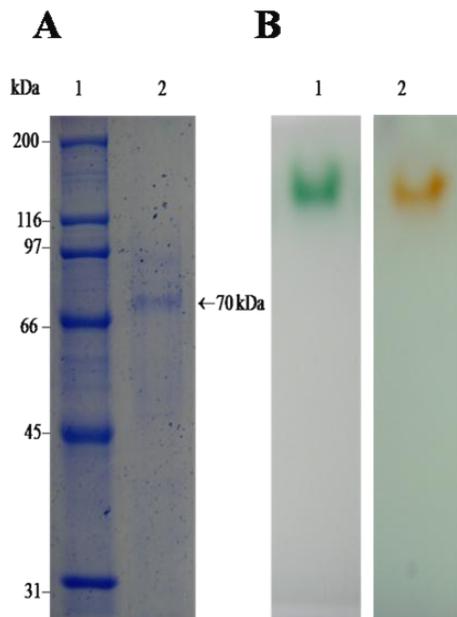


Figura VII.9 A. Purificación de TtLacA del sobrenadante de cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1. Carriles: 1, marcador de PM conocido; 2, lacasa purificada. B. Análisis zimográfico, 1, ABTS como sustrato y 2, DMP, como sustrato.

VII.3.1 Secuenciación de TtLacA

Con la finalidad de confirmar la identidad de la lacasa TtLacA, la banda de 70 kDa se envió al servicio de secuenciación parcial de aminoácidos por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). El análisis bioinformático de los péptidos obtenidos de la secuenciación parcial permitió identificar cinco péptidos cuya identidad fue del 100 % con una enzima multicobre oxidasa de *T. terrestris* NRRL8126 (UniProtKB acceso número G2R0D5) (**Fig. VII.10**).

```

MGLLRGLLESVSETLELFYTATATLTQESTNGLSLLGTLLARVLPFLTNNPLPDGFPWG
SLSDTNTNPYVDYPRTGVVRYDFTVSRGI IAPDGYQRDVLVNGAYPGPLIEANWGD I
VVTVHNNISNPEDGTTIHWHGFLQRETPWADGAPGISQCP IPPGSSYTYEFVASLFGTSW
YHAHYSAYAGGVVGP I VVYGP THAK YDVDLGPIMLSDWYHREYFDIVKELLSPNASPRV
LSDNNLIDGKMNFDCSTVAPGDNTPC TDRAGISKFKFQTGKTHRLR LINSGADGVQRF S I
DQHTLTVIAEDFVPVKPYNTTVVTLGVGQRTDVLVTANAGPPDLSLFWMRSNLTTCS PAR Q
PNALAAVYYDKADTSATPSSRPWDVDPDGT C ANDPLDISEPLYPIPLPKPAITQTMDIEL
FKNASNVTLWKFNQVSMRTDYN SPVILLANQGNFSYPPEWNVVNYQQTTAIRI I INKGP
GPHMHLHGHNFY I LHGEGEWDGT I VRPSNPMRRDVELVRGNHGLVI QFDGAPGVWAFH
CHIAWHSSGGFLASLLVQPHKVQOMHLP GDVEQNCRAWDLWTKHNVDQIDSGT

```

Figura VII.10 Secuencia de aminoácidos de multicobre oxidasa de *T. terrestris* NRRL 8126. Los 5 péptidos de TtLacA son resaltados con texto en color azul.

Siguiendo con el análisis, el péptido YDVDLGPIMLSDWYHR mostró un 93.3 % de identidad con una lacasa de *Trichoderma* sp. (UniProtKB número de acceso C5H3G0). Los péptidos VLSDNNLIDGK y LINSGADGVQR mostraron el 90.9 % de identidad con aminoácidos que corresponden a el dominio de unión a cobre de una lacasa de *Myceliophthora thermophila* (número de acceso UniProtKB G2Q560). Finalmente el péptido QPNALAAVYYDK mostró 91.7 % de identidad con lacasa de *Rhynchosporium commun* (UniProtKB número de acceso A0A1E1KUV9).

Se realizó un alineamiento múltiple tomando como referencia la secuencia de aminoácidos de la proteína multicobre de *T. terrestris* NRRL 8126 (XP_003651936.1), con secuencias en aminoácidos de las cuatro coincidencias principales por análisis de identidad utilizando el Programa BLAST. En la **Figura VII.11** se muestra el alineamiento múltiple de la lacasa de *T. terrestris* NRRL 8126 (número de acceso G2R0D5) con una lacasa del ascomiceto *Melanocarpus albomyces* LAC1_MELAO (Q70KY3), que se ha purificado y cristalizado su sitio de cobre trinuclear intacto (PDB 3QPK). El alineamiento múltiple tiene además de la secuencia de una oxidoreductasa de *Beauveria bassiana* ARSEF 2860 (J5JH35, OPS5-BEAB2) y dos lacasas de *Botrytis cinerea* (Q12570, LAC1_BOTFU; Q96WM9, LAC2_BOTFU). Este análisis permitió identificar, en la secuencia de aminoácidos de la proteína multicobre de *T. terrestris* NRRL 8126 (XP_003651936.1), 6 α -hélices, 32 lámina β y 5 giros. En la **Tabla VII.4**, se enlistan los sitios de unión a metales, además de probables sitios de glicosilación, y posibles enlaces disulfuro que se observan en la **Figura VII.11**.

Tabla VII.2 Posición en la secuencia de aminoácidos de los sitios de unión a cobre, glicosilación y enlaces disulfuro.

Función	Posición	Descripción	Función	Posición (es)	Descripción
Unión a metales	143	Cobre 1	Enlaces disulfuro	51↔62	N-Glicosilación (asparagina)
	145	Cobre 2		164↔590	
	188	Cobre 2		348↔382	
	190	Cobre 3	Glicosilación	89	
	481	Cobre 4		138	
	484	Cobre 1		251	
	486	Cobre 3		266	
	552	Cobre 4		294	
	554	Cobre 2		339	
	558	Cobre 4		426	
			446		

Conforme al alineamiento múltiple, las diez posiciones, de los cuatro sitios de unión a cobre ubicados en la enzima, son conservados para todas las secuencias analizadas **HWHG**, **HSHF**, **HPMHLHG** y **HCHIAWH**. Por otra parte, no todos los posibles enlaces disulfuro son conservados para todas las secuencias analizadas. Por ejemplo, sólo la posición 164↔590 fue conservada para todas las secuencias analizadas; la posición 51↔62, fue conservada para todas las secuencias analizadas, excepto para la multicobre oxidasa de *T. terrestris* NRLL 8126; la posición 348↔382 sólo fue conservada para la oxidoreductasa de *Beauveria bassiana* ARSEF 2860. Para los sitios de N-glicosilación es variado, la multicobre oxidasa de *T. terrestris* NRLL 8126 sólo conserva uno de los ocho posible sitios de glicosilación, en la posición 426.

De manera simultánea, se realizó un análisis de la secuencia de TtLacA de *T. terrestris* Co3Bag1, a partir del genoma de *T. terrestris* Co3Bag1, esta cuenta con una secuencia 2, 373 nucleótidos con 5 exones. La proteína madura tiene una secuencia de 1782 pb y 594 aminoácidos (**XII. Anexo B.1**) con un peso molecular teórico de 65.3 kDa. La secuencia deducida de aminoácidos presenta un péptido señal de 20 aminoácidos y cuatro sitios probables N-glicosilación, esto de acuerdo al servidor NetNGlyc (*Expasy*).

VII.3.2 Predicción del modelo 3D de la multicobre-oxidasa

El servidor I-TASSER generó un modelo estructural 3D de la multicobre oxidasa de *T. terrestris* NRRL 8126, (modelo 5) con el mejor valor de C-score de -2.85 cuyo número refleja un alto grado de plegamiento (C-score > -1.5) (**Fig. VII.12**). El modelo 3D es estructuralmente el más cercano a la lacasa del ascomiceto *Botrytis aclada* (PDB ID: 3sqrA) con una puntuación de modelo de plantilla (TM-score) de 0.885 y una cobertura de alineamiento de 0.894. Se puede visualizar en el modelo 3D para lacasa de *B. aclada*, es rica en contenido de β -lámina, y en menor cantidad de α -hélice.

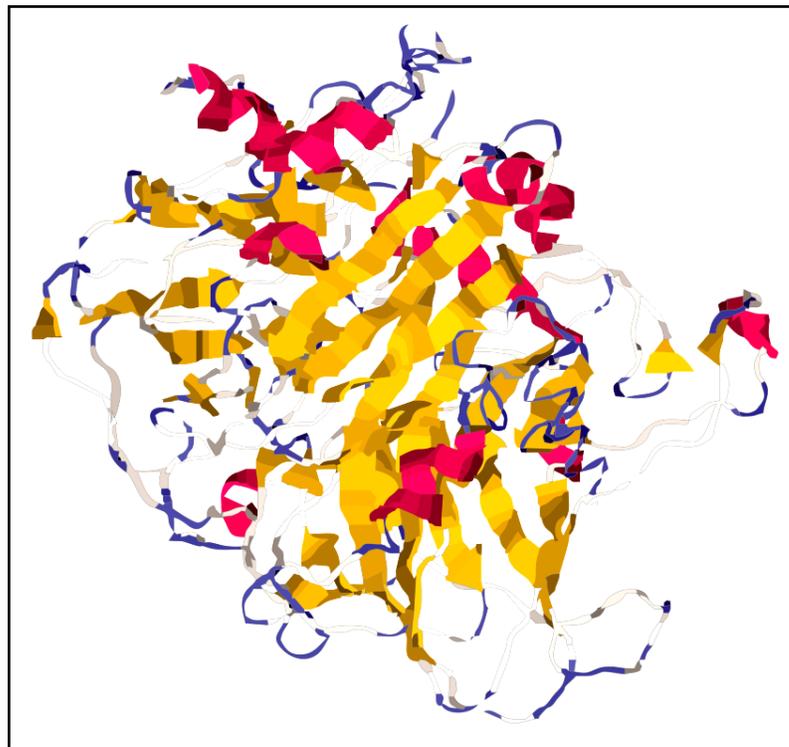


Figura VII.12 Predicción del modelo de lacasa de *T. terrestris* NRRL 8126, obtenido por el servidor I-TASSER. Las α -hélice están indicadas en color *rosa* y las β -lámina en color *amarillo*.

VII.4 Caracterización bioquímica de TtLacA

Con base a los resultados antes descritos, una vez que se confirmó que la proteína purificada corresponde a una multicobre oxidasa, se procedió a la determinación de las propiedades catalíticas de TtLacA. De acuerdo a los resultados obtenidos, se evaluará la posibilidad de integrar esta enzima en aplicaciones biotecnológicas.

VII.4.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de TtLacA y su estabilidad

La influencia del pH sobre la actividad de TtLacA se determinó a valores de pH en un rango de 2.2 a 7.0, utilizando ABTS como sustrato a 50 °C por 5 min. TtLacA mostró una actividad máxima a pH 3.0 en amortiguador glicina-HCl 100 mM, y exhibió aproximadamente el 50 % de su actividad máxima a diferentes valores de pH, en un rango de 2.2 a 4.0 (**Fig. VII.13-A**). Con respecto a la estabilidad a pH, la lacasa TtLacA retiene más del 70 % de su actividad a diferentes valores de pH en un rango de 2.6 a 5.0, y más del 50 % a pH 5.6, después de 50 min de incubación a 25 °C (**Fig. VII.13-B**).

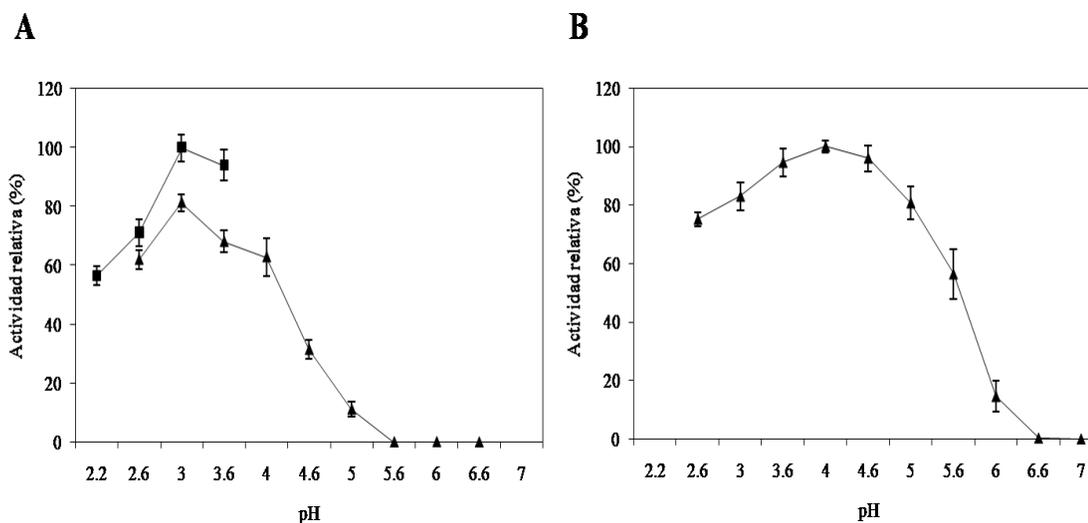


Figura VII.13 Efecto del pH sobre la actividad de TtLacA (**A**) y su estabilidad (**B**). El pH óptimo fue determinado a 50 °C utilizando dos amortiguadores a 100 mM: glicina-HCl (■) y citratos fosfatos (▲). La actividad residual fue calculada incubando la enzima 50 min a 25 °C.

VII.4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de TtLacA y su termoestabilidad

TtLacA mostró una actividad óptima a 65 °C (**Fig. VII.14-A**). Sin embargo la enzima mostro más del 50 % de su actividad original en un amplio rango de temperaturas de 30 a 75 °C. Para evaluar la termoestabilidad de TtLacA, la enzima purificada se incubó a 55, 65 y 75 °C en amortiguador glicina-HCl a 100 mM, pH 3.0 utilizando ABTS 5 mM como sustrato. La vida media ($t_{1/2}$) de TtLacA fue de 50 min a su temperatura óptima (65 °C); mientras que a 55 y 75 °C, la vida media de la enzima fue de 163 y 8 min, respectivamente (**Fig. VII.14-B**).

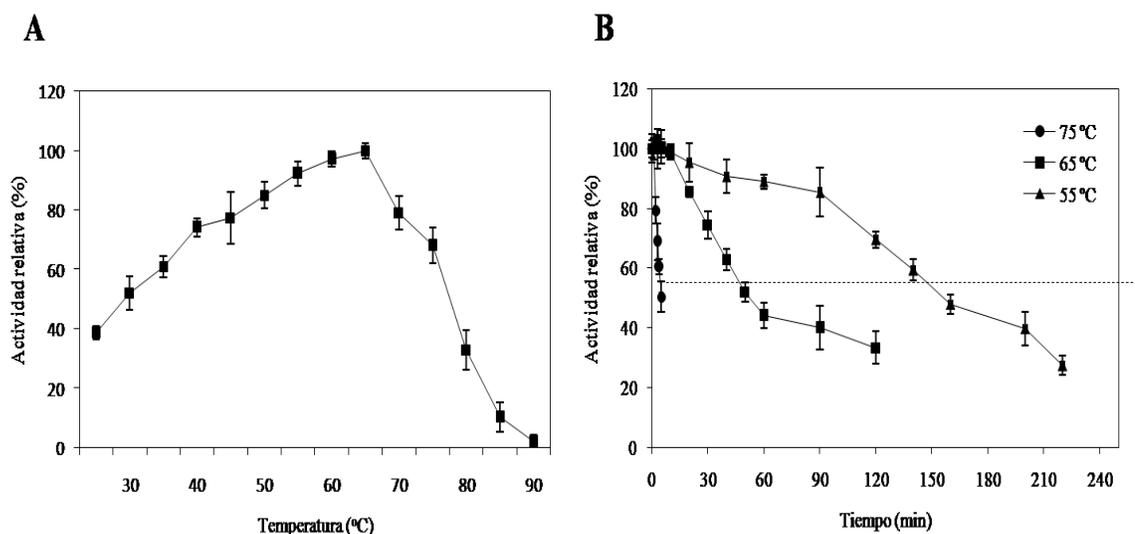


Figura VII.14 Efecto de la temperatura sobre la actividad de TtLacA (**A**) y su termoestabilidad (**B**). La temperatura óptima fue determinada utilizando el amortiguador de glicina-HCl a 100 mM pH 3.0. La vida media se determinó a diferentes tiempos incubación a 55, 65 y 75°C.

VII.4.3 Parámetros cinéticos (K_M y V_{max}) de TtLacA

Los parámetros cinéticos de TtLacA se analizaron en condiciones óptimas de pH y temperatura utilizando como sustrato ABTS, en un rango de 0.05 a 5 mM (**Fig.VII.15**). El valor de K_M fue de 0.26 mM y la V_{max} fue de 3.571 Umg^{-1} .

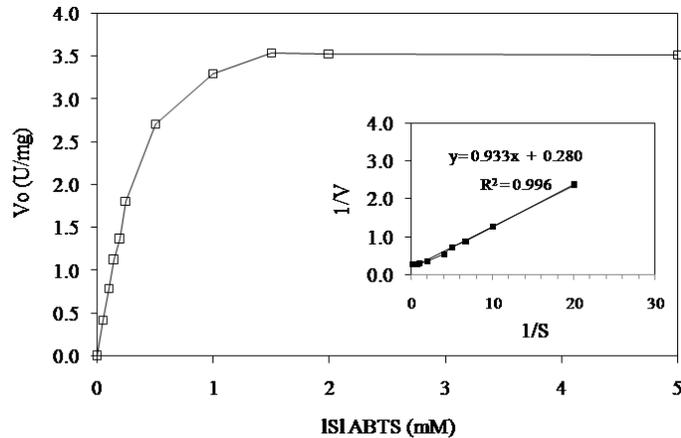


Figura VII.15 Análisis por Michaelis-Menten y por Lineweaver-Burk para el cálculo de K_M y V_{max} para el ABTS en amortiguador de glicina-HCl 100 mM, pH 3.0.

VII.4.4 Efecto de iones metálicos, EDTA y NaN_3 sobre la actividad de TtLacA

El efecto de los iones metálicos, EDTA y azida de sodio sobre la actividad de TtLacA se determinó, de manera independiente, a concentraciones finales de 1 y 10 mM, para cada uno (**Fig. VII.16**). Los iones Li^{2+} , Na^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} (1 mM) no tuvieron efecto sobre la actividad de la enzima, mientras que la presencia de Ni^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} (1 mM) redujeron la actividad de lacasa a 77.01, 74.21 y 54.7 % respectivamente. Los iones Fe^{2+} y Ag^{2+} , mostraron una fuerte inhibición sobre la actividad de la enzima con 10.4 y 6.1 %, de actividad relativa respectivamente.

Los iones Mn^{2+} y Cu^{2+} tuvieron el mayor efecto positivo, con 106.0 % y 128.0 %, respectivamente de actividad relativa. La actividad se vio reducida para todos los iones metálicos a una concentración de 10 mM, excepto para los iones Cu^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} . La enzima fue completamente inactivada por el ion Hg^{2+} en ambas concentraciones analizadas, (1 y 10 mM). El EDTA y NaN_3 (1 mM), disminuyeron la actividad lacasa a sólo 67.0 y 13.8 % de actividad relativa original de TtLacA; mientras que TtLacA fue completamente inactiva en presencia de EDTA o NaN_3 10 mM.

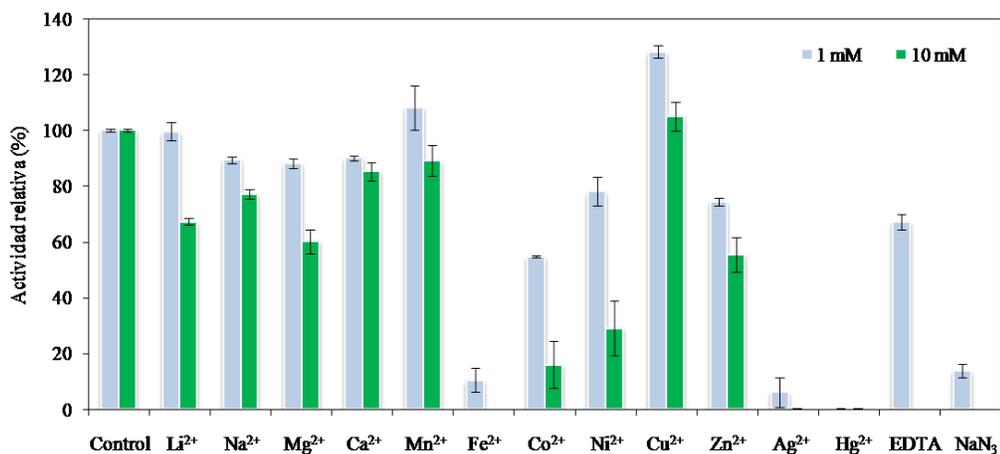


Figura VII.16 Efecto de los iones metálicos, EDTA y azida de sodio sobre la actividad de TtLacA en dos concentraciones diferentes 1 y 10 mM. El ensayo de actividad se llevó a cabo en amortiguador glicina-HCl 100 mM, pH 3.0 durante 5 min a 65 °C.

VII. 5 Inmovilización de la actividad lacasa y de TtLacA

VII. 5.1 Inmovilización de la actividad de lacasa en nylon-6

La actividad lacasa de *T. terrestris* Co3Bag1 se inmovilizó, a partir de sobrenadante de cultivo del hongo, por enlace covalente en nylon-6. La eficiencia de inmovilización fue del 46.20 %. Para determinar la actividad de lacasa en el extracto enzimático inmovilizado, se evaluó la degradación de colorante azul de bromofenol al 0.02 %. Se observó un 98.58 % de degradación del colorante azul bromofenol en 24 h.

VII.5.2 Inmovilización la actividad de lacasa en perlas de alginato de calcio

La actividad de lacasa de *T. terrestris* Co3Bag1 también se inmovilizó por atrapamiento en perlas de alginato de calcio. La eficiencia de atrapamiento fue del 100 %. En cuanto al número de reúsos, se observó que el extracto enzimático conservó su actividad durante 5 ciclos (**Fig.VII.17**); sin embargo, la actividad relativa no es constante. La actividad enzimática disminuyó al segundo ciclo con 33.3 % de actividad relativa, para el 4to ciclo aumentó a un 68 % y finalmente de nuevo disminuyó en el 5to ciclo a 33.3 % de actividad relativa.

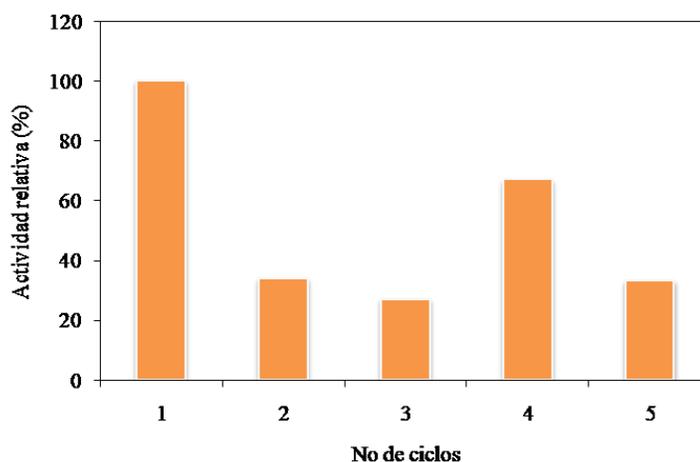


Figura VII.17 Número de reúsos de las perlas de alginato de Ca^{2+} con el extracto enzimático

VII.5.3 Inmovilización de TtLacA

La lacasa TtLacA de *T. terrestris* Co3Bag1 se inmovilizó en perlas de alginato de cobre de aproximadamente 1.0 mm de diámetro (**XII. Anexo B.2**). La eficiencia de atrapamiento fue 73.8 %, quedando sólo el 26.2 % de enzima con sólo dos lavados de la solución de TtLacA inmovilizada.

VII.6 Caracterización bioquímica de TtLacA inmovilizada

Se evaluaron las propiedades catalíticas de TtLacA inmovilizada para comparar sus valores con la enzima TtLacA libre, además de integrar a posibles aplicaciones biotecnológicas de acuerdo a sus características bioquímicas.

VII.6.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de TtLacA inmovilizada y su estabilidad

La influencia del pH sobre la actividad de TtLacA inmovilizada se determinó a valores de pH en un rango de 2.2 a 7.0, utilizando ABTS como sustrato a 50 °C por 5 min. TtLacA mostró una actividad máxima a pH 3.0 en amortiguador glicina-HCl a 100 mM y exhibió más del 50 % de su actividad máxima a diferentes valores de pH, en un rango de 2.2 a 4.6 (**Fig. VII.18-A**). En los ensayos de estabilidad a pH, TtLacA retuvo más del

80 % de su actividad a diferentes valores de pH en un rango de 2.6 a 5.6 y más del 50 % a pH 6.0, después de 50 min de incubación a 25 °C (**Fig. VII.18-B**).

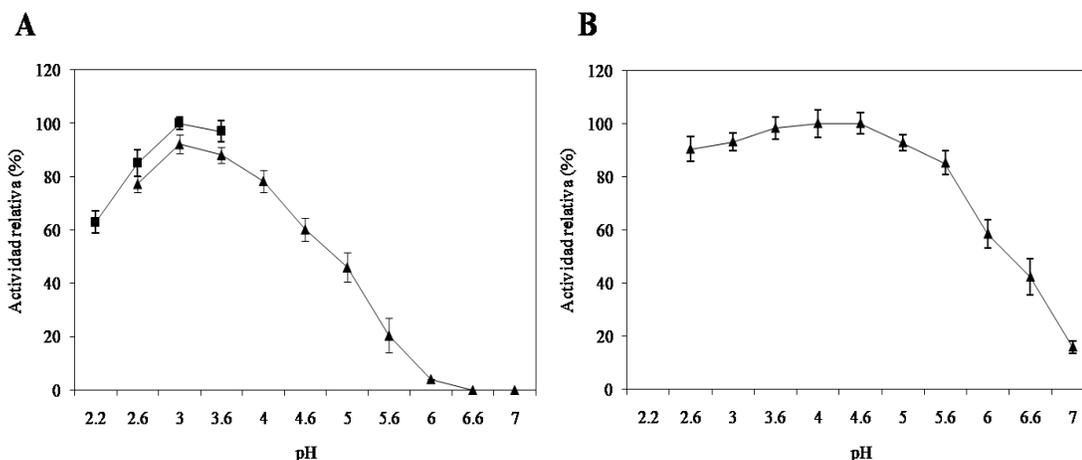


Figura VII.18 Efecto del pH sobre la actividad de TtLacA inmovilizada (**A**) y su estabilidad (**B**). El pH óptimo fue determinado a 50 °C utilizando dos amortiguadores a 100 mM: glicina-HCl (—■—) y citratos fosfatos (—▲—). La actividad residual fue calculada incubando la enzima a 25 °C por 50 min.

VII.6.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de TtLacA inmovilizada y su termoestabilidad

TtLacA mostró una actividad óptima a 70 °C (**Fig. VII.19-A**), solo 5 °C más que la lacasa libre. Además mostró ser más estable a temperaturas más altas que TtLacA libre, pues tuvo más del 80 % de su actividad original en un amplio rango de temperatura de 40 a 80 °C. Para evaluar la termoestabilidad de la enzima TtLacA inmovilizada se incubó a 60, 70 y 80 °C en amortiguador glicina-HCl a 100 mM, pH 3.0 utilizando ABTS 5 mM como sustrato.

La vida media ($t_{1/2}$) de TtLacA a su temperatura óptima (70 °C) fue de 107 minutos; mientras que se registró una vida media de 210 y 19 min a 60 y 80 °C, respectivamente (**Fig. VII.19-B**).

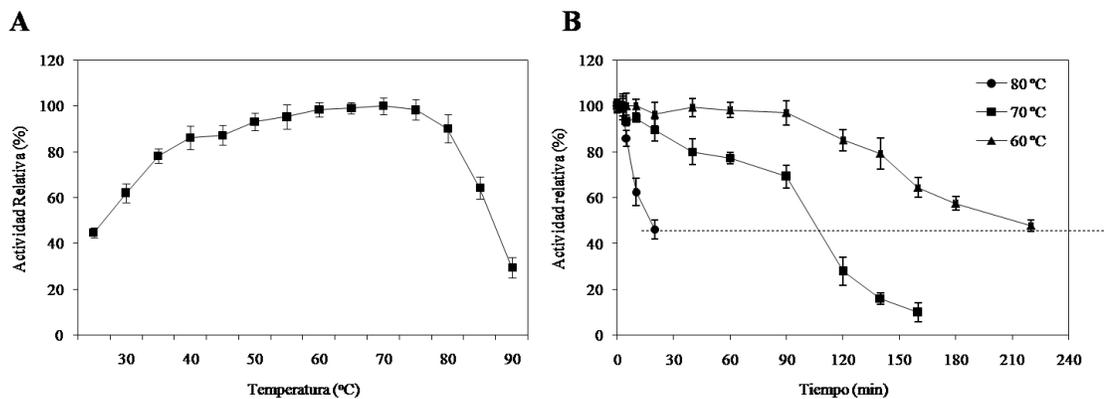


Figura VII.19 Efecto de la temperatura sobre la actividad de TtLacA inmovilizada (A) y su termoestabilidad (B). La temperatura óptima fue determinada utilizando el amortiguador de glicina-HCl a 100 mM pH 3.0. La vida media se determinó a diferentes tiempos incubación a 60, 70 y 80 °C.

VII.6.3 Parámetros cinéticos (K_M y V_{max}) de TtLacA inmovilizada

Los parámetros cinéticos de TtLacA inmovilizada se analizaron en condiciones óptimas de pH y temperatura, utilizando como sustrato ABTS en un rango de 0.05 a 5 mM, (Fig.VII.20). El valor de K_M fue de 0.45 mM y su V_{max} fue de 2.865 Umg^{-1} .

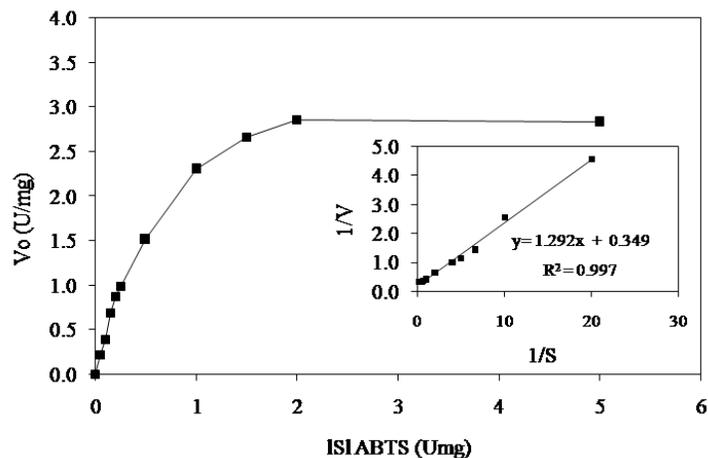


Figura VII.20 Análisis por Michaelis-Menten y por Lineweaver-Burk para el cálculo de K_M y V_{max} para el ABTS en amortiguador de glicina-HCl 100 mM, pH 3.0 a 70 °C.

VII.6.4 Efecto de iones metálicos, EDTA y NaN_3 sobre la actividad de TtLacA inmovilizada

El efecto de los iones metálicos, EDTA y azida de sodio fue determinado a dos concentraciones diferentes: 1 y 10 mM para cada uno sobre la actividad de TtLacA inmovilizada (**Fig. VII.21**). La gran parte de los iones metálicos a una concentración de 1 mM no tuvieron efecto sobre la actividad de la enzima inmovilizada, ya que se observó más del 80 % de su actividad relativa, excepto para los iones que presentaron el 50 % o menos de su actividad original. La actividad se vio reducida en presencia de los iones Na^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} y Ag^{2+} (10 mM) a una actividad relativa de 63.1, 10.2, 56.0 y 7.8, respectivamente. Cabe señalar que sólo el ion Hg^{2+} inactivó completamente a la enzima TtLacA inmovilizada a la misma concentración (10 mM) que a la enzima lacasa TtLacA libre.

El EDTA disminuyó la actividad de la TtLacA inmovilizada a 79.4 % y 30.2 % de su actividad original a concentraciones de 1 y 10 mM, respectivamente. Para el caso de NaN_3 , 1 mM y 10 mM, tuvo un efecto negativo, pues disminuyó su actividad relativa a 5.6 y 0.09 % respectivamente. Si bien estos resultados muestran que TtLacA inmovilizada es mucho más estable a todos los iones metálicos y compuestos evaluados en este trabajo.

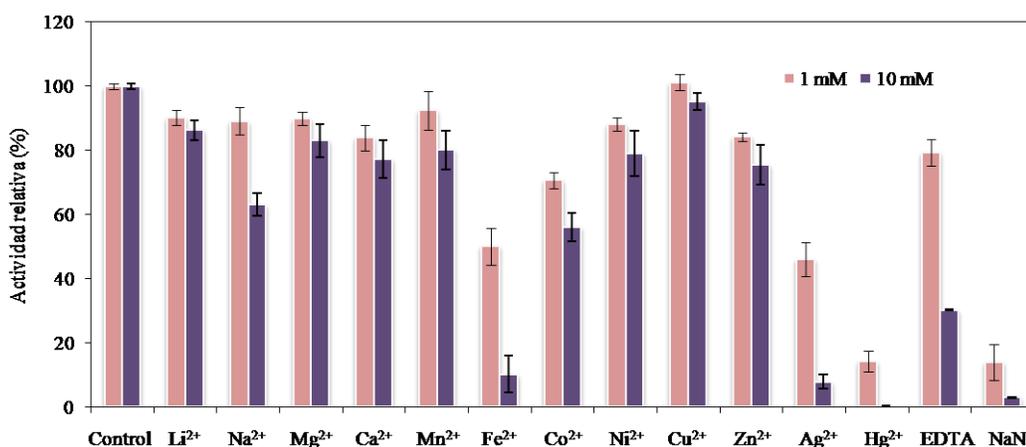


Figura VII.21 Efecto de los iones metálicos, EDTA y azida de sodio sobre la actividad de TtLacA inmovilizada en dos concentraciones diferentes 1 y 10 mM. La enzima se incubó en amortiguador glicina-HCl 100 mM, pH 3.0 que contenía cada uno de los componentes durante 5 min a 70 °C.

VII.7 Reutilización de TtLacA inmovilizada

Se evaluó la reutilización de la lacasa TtLacA inmovilizada en perlas de alginato de Cu^{2+} . Se observó que la enzima conserva su actividad después de 6 ciclos repetidos (**Fig. VII.22**). Para el 7mo ciclo se observa una disminución a 70.3 % de actividad relativa y para el 8vo ciclo tuvo tan sólo el 46.57 % de actividad relativa.

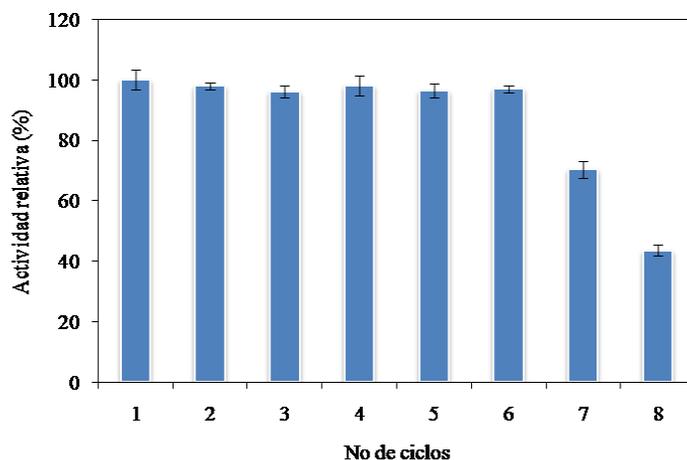


Figura VII.22 Número de reusos de las perlas de alginato de Cu^{2+} con TtLacA

VII.8 Inmovilización de TtLacA-mediador

El complejo TtLacA-ABTS se inmovilizó en perlas de alginato de cobre. La eficiencia de atrapamiento fue de 80 %, con 6.2 % más que sólo la TtLacA inmovilizada.

VII.9 Evaluación de la actividad catalítica de TtLacA-mediador

Se determinó la oxidación de AV a veratraldehído en TtLacA libre, ABTS, TtLacA-ABTS y TtLacA-ABTS inmovilizado en perlas de alginato de cobre (**Fig. VII.23**). Los resultados muestran que: TtLacA y ABTS no fueron capaces de oxidar a AV durante el tiempo determinado (24 h), no siendo así para SLM. Se cuantificó una concentración de veratraldehído de 0.79 mM y 0.53 mM en TtLacA-ABTS y TtLacA-ABTS inmovilizado respectivamente de acuerdo a la curva estándar de concentración (mM) de veratraldehído contra Absorbancia (**XII. Anexo B.3**)

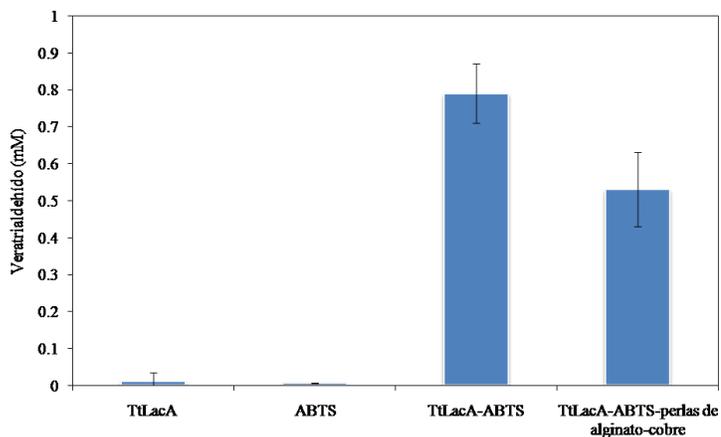


Figura VII.23 Efectos de TtLacA ABTS, TtLacA-ABTS y TtLacA-ABTS inmovilizado en perlas de alginato de cobre sobre la oxidación de alcohol veratrílico a veratraldehído

VII.10 Reutilización de TtLacA-ABTS inmovilizado

Se evaluó los reúsos de TtLacA-ABTS inmovilizada en perlas de alginato de Cu^{2+} . Se observó que la enzima conserva su actividad después de 2 ciclos repetidos (**Fig. VII.24**). En el 3er ciclo se observa un disminución a 75.3 % de actividad relativa y para el 3er ciclo solo tuvo el 22.5 % de actividad relativa.

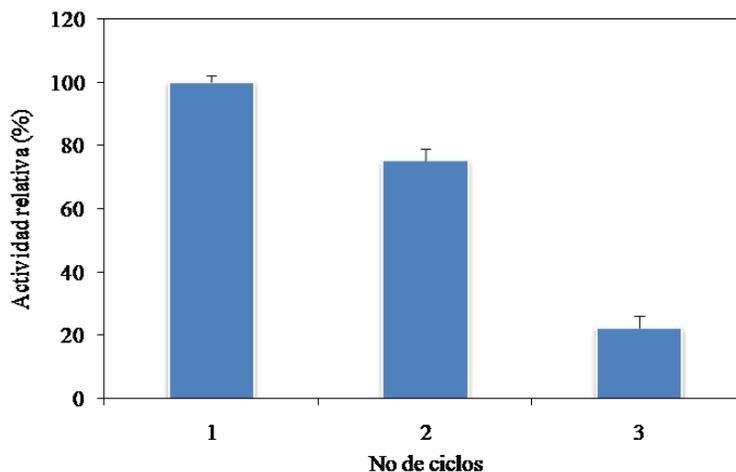


Figura VII.24 Número de reúsos de las perlas de alginato de Cu^{2+} con TtLacA-ABTS

VII.11 Clonación de un gen que codifica para una lacasa de *T. terrestris* Co3Bag1

VII.11.1 Síntesis de cDNA y amplificación del gen *lacB*

El ARN total de la cepa *T. terrestris* Co3Bag1 (**Fig. VII.25**) se aisló siguiendo el protocolo establecido por el fabricante RNeasy Mini Kit (QIAGEN).



Figura VII.25 Análisis electroforético en gel agarosa 0.8 % a 100 V. Carriles 1-3 RNA total de *T. terrestris* Co3Bag1

A partir del material obtenido de ARN total, se sintetizó el cADN utilizando el PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (TAKARA), siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente, una vez obtenida la cadena de cDNA, se amplificó el gen que codifica para la lacasa de 1.1 pb (**Fig. VII.26**), de acuerdo a las condiciones de PCR previamente descritas en la sección VI.10.2.

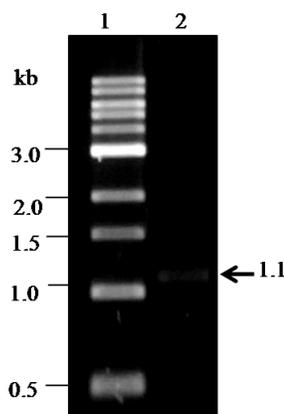


Figura VII.26 Análisis electroforético en gel agarosa 0.8 % a100 V. Carriles 1, marcador 1 kb “DNA ladder”; 2, producto de RT-PCR purificado.

Este primer amplificado se secuenció, y a partir de esta secuencia de 892 nt, se realizaron análisis de identidad con el Programa Blast, y análisis por alineamientos múltiples utilizando el Programa ClustalX, para el diseño de nuevos oligonucleótidos (**XII. Anexo B.4**) y así continuar con su secuencia del ORF del gen *lacB*.

Con los amplificados consecuentes se obtuvo una secuencia de 1568 nt, cuya similitud fue del 98 % de la secuencia de un gen que codifica para una multicobre oxidasa de *T. terrestris* (No. de acceso G2QTJ8).

VII.11.2 Secuenciación del genoma de *T. terrestris* Co3Bag1

De manera simultánea, el grupo de trabajo del Lab. 51 Ingeniería de Proteínas solicitó la secuenciación del genoma de *T. terrestris* Co3Bag1. Para ello la compañía Otogenetics, solicitó ADN genómico con características específicas de calidad para su secuenciación. La **figura VII.27** muestra el material genómico el cual fue enviado a dicha compañía.

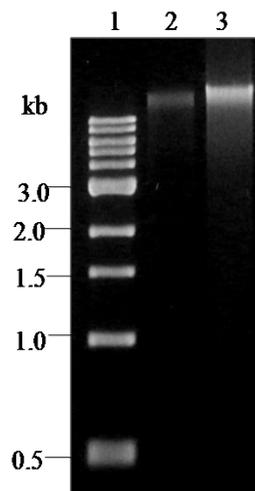


Figura VII.27 Análisis electroforético en gel agarosa 1.0 % a 100 V. Carriles: 1, 1 kb “DNA ladder”; 2-3, ADN genómico.

A partir de la secuenciación del genoma, se completó la secuencia del gen *lacB*. Se recibieron 13,066 *scaffold* de los cuales el 531, 1103 y 351 se alinearon con la secuencia parcial del gen *lacB* de *T. terrestris* Co3Bag1, de 1568 nucleótidos previamente obtenida bajo ensayos de RT-PCR y PCR.

VII.11.3 Análisis de la secuencia del gen *lacB* que codifica para una lacasa

La secuencia completa en nucleótidos del gen *lacB* contiene 1786 pb interrumpida por un intron de 70 pb y la secuencia del ORF del gen *lacB* contiene 1716 pb que codifica para una proteína de 571 residuos de aminoácidos de los cuales 20 de ellos pertenecen a su péptido señal, además de identificaron las cuatro regiones de unión a cobre H-X-H y los posibles sitios de glicosilación (Fig.VII.28).

```
atGgccaaaggctcgtgtctcttggtagggttgctggctgccaccatgcgagggcgctctcct
M A K A R V L V G L L A A T I A R A S P
ttcgactccgacgcccgtcaacctgcacccacgcccgcctgctctggtaacacagctacg
F D S D A V N L H P R A A C S G N T A T
accgctctgagtggtgactatgacatctcgacggactactacaatgatggcccgaca
T R S E W C D Y D I S T D Y Y N D G G P T
actggcgtcaccaggagattgggtgggaaatcaccgagttcactgctgcccagatgga
T G V T R E Y W W E I T E F T A A P D G
gttgagcgatccgcatggccatcaggcagcatcccaggccctaccctcttcgcagac
V E R S V M A I N G S I P G P T L F A D
tggggagataaccgttgcttcacgtcactaaactctgttcccggtgggacgagcatc
W G D T V V V H V T N S V P G N G T S I
tttccggcatccgcaaaactacaccaacccgaacgacggagtccagcagcatcacg
H F H G I R Q N Y T N P N D G V S S I T
cagtgccagttccccctgggatcgtccatcaggtacacctggaaagccaccaatcggc
Q C F V P P G S S I T Y T W K A T Q Y G
actacctggtagcttccatcagccctgcaggtgtacaacgggtgctcttggcggcatc
T T W Y H S H Y G L Q V Y N G V F G G I
gtgatcaacggcctcttggccaattacgacgaagacctcggcgtgctcttcagc
V I N G P A S A N Y D E D L G V L F L S
gactggaccatgagctctgaggacaacctgttcaactgaagcccagctgacagggccacca
D W T H E S A D N L F T E A O L T G F P
actcaggataatggcctgatcaacggcagcaacatctacgttgacggcgacacgaccgtg
T Q D N G L I N G T N I Y V D G D T V
ggctctcgtttcaggttgcttcccgggggacatcgtaccgctgcccctcacaac
G S R F T L S F T A G T S Y R L R L I N
ggtgccatggatacttctcaagtttccattgatacacaccatggaagtcattgcg
G A M D T F F K F S I D N H T M E V I A
aacgacttggttcccatccagcgtttaaaccgaccgtctcagcattggcattggccag
N D L V P I Q P F N T T V L S I G I G Q
aggtatgatgttatcaccggcagaccaggccgacgtcgcagacaacttctggatgccc
R Y D V I I R A D Q A D V A D N F W M R
gcccgtcccccaagcctcctcctccaccaacactatggaggatgatcccgccatc
A V P Q T S C S S T N T M E D D I R G I
gtctactacggcaccagcccgtcgcagcctgacaccacgggctacaacccgaccgacg
V Y Y G T S P S T P D T T G Y N P T D S
tgcgacgacatgtccagcaccgatctggtcccctacgtgtccaagacgggtggcatcgacc
C D D M S S T D L V P Y V S K T V A S T
gcccgtggaccgaggacgagccggtagcagatcggcgcggcgccgaccaacgccaactac
A A W T E D E P V T I G A A P T N A N Y
ctgtggtggtacgtgaacggcagcagctggacatgtcgtggtcgaaacccgacgctgctg
L W W Y V N G S T L D M S W S N P T L L
caggtgtacgacaacgtgaccgcttcaactcgtcgcccaacgtggtgctcgtgcccag
Q V Y D N V T A F N S S A N V V L V P E
gcccagagtggtgtacgtcgtcatcagcaacccgctcggcgtcgcccacccgatccac
A D E W V Y V V I S T A L G V A H P I H
ctgcccggccagactctctcgtgctcgcgcagggcaccgggcaacctcgacagcagcagc
H G H D F F V L A Q G T G T F D S S S
gtgtcttcaactcgacaaccccgctccgcccgcagctggccatgctggctgctcagggg
V A L N L D N P V R R D V A M L A A Q G
tacctggtgatcgcgttccagacggacaatccgggcccgtggtgctgattggccatc
Y L V I A F Q T D N P G A W L M H C H I
ggatggcacacggacaggggctggccatccagtttgtcgagagggcagagcgaggcgagg
G W H T D E G L A I Q F V E R Q S E A R
gagctgatcgacttccagaccttgagcgagacgtgtgctgctcgtgggagacgtggcagggc
E L I D F Q T L S E T C A A W E T W Q A
agttctggcctgaagcaggaggatgatggcatctga
S S G L K Q E D D G I -
```

Figura VII.28 Secuencia del ORF del gen *lacB* (1716 pb) codifica para una proteína de 572 aa (PM 63 kDa). Péptido señal 20 aa (rojo). Cuatro regiones de unión a cobre (HXH, sombreado gris-azul). Sitios potenciales de N-glicosilación (8) recuadro en amarillo: Asn-X-Ser-Thr (subrayado).

VII.11.4 Clonación del gen *lacB* en vector de clonación y transformación de *E. coli* DH5 α y *A. niger*

Conocida la secuencia completa del gen *lacB*, se amplificó por PCR a partir de ADN genómico un fragmento de ~1.7 pb (**Fig. VII.29**), con sitio de corte específico para las enzimas de restricción SpeI y PacI para su posterior clonación en el vector de clonación pJET1.2/blunt cloning, así como en el vector de expresión p210/HYG compatible con *A. niger*.

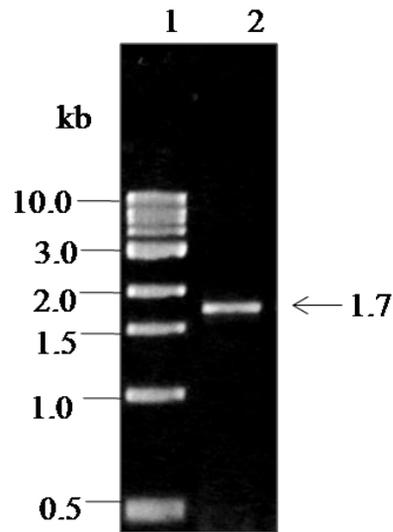


Figura VII.29 Análisis electroforético en gel agarosa 1.0 % a 100 V. Carriles: 1, 1 kb “DNA ladder”; 2, Producto de PCR gen completo *lacB*

La construcción *lacB*/pJET1.2 se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron 12 clones (**Fig. VII.30-A**), que dieron positivo al gen de resistencia a ampicilina. Se realizó extracción de plásmido para cada clona siguiendo las especificaciones del proveedor MiniPrep (Quiagen). Para corroborar la presencia de la construcción *lacB*/pJET1.2 se realizaron ensayos de restricción con la enzima de digestión BgIII de las clonas 2, 6 y 10 (**Fig. VII.30-B**) y sólo de la clona 10 se obtuvo un amplificado del tamaño deseado (1.7 pb) (**Fig. VII.30-C**).

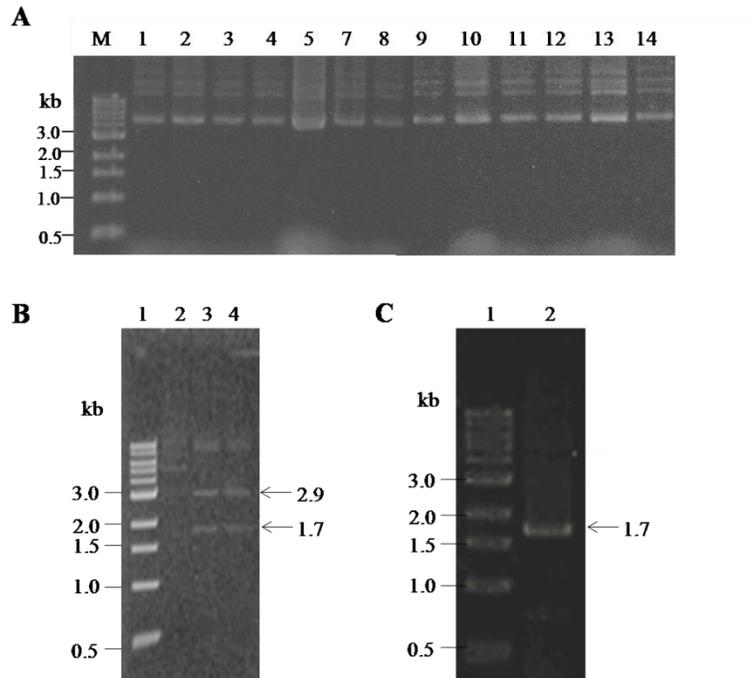


Figura VII.30 Análisis electroforético en gel agarosa 1.0 % a100 V. Carriles: **A-** Carriles M, 1 kb “DNA ladder” y 1-14, material plasmídico de las clonas positivas. **B-** 1, 1 kb “DNA ladder”; 2-4, fragmentos procedentes de la digestión de *lacB*/pJET1.2 con BglIII, de las clonas 2, 6 y 10 respectivamente. **C-** 1, 1 kb “DNA ladder”, 2, fragmento procedente de la amplificación de *lacB* a partir de la clona 10.

La clona positiva y confirmado la presencia del gen *lacB*, para ambos ensayos (clona 10) fue propagada en medio LB (ver sección VI.3.2). Este material fue manipulado para la clonación del gen *lacB* en el vector de expresión p210/HYG (Fig.VII.31). La transformación por protoplastos de *Aspergillus niger*, asistida por polietilenglicol, siguiendo el protocolo de Blumhoff et al., (2013), con algunas modificaciones, fue realizado por el personal del Laboratorio de Biotecnología de Plantas y Microorganismos del CINVESTAV-Irapuato.

Se obtuvieron 15 clonas de las cuales inicialmente se amplificó parte del gen de Higromicina (500 pb), que se encuentra en la construcción p210/HYG/LaccT (Fig.VII.32) para corroborar la transformación de las clonas de *A. niger*

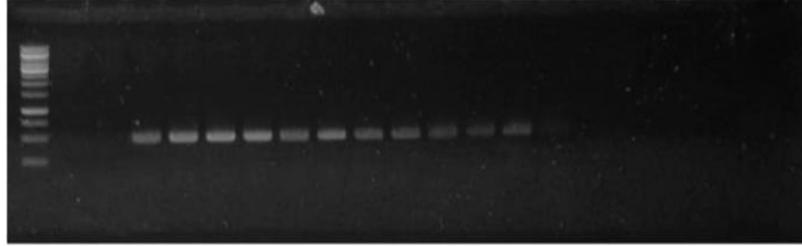


Figura VII.32 Análisis electroforético en gel agarosa 1.0 % a100 V. Carriles: A- Carriles M, 1 kb “DNA ladder” y 1-14, material genómico de las clonas positivas (1-9); 11-14, genómico de las clonas positivas (12-19) y 16, control positivo de *A. niger* WT

Posteriormente, ya en el Lab 51 de Ingeniería de Proteínas, DBB CINVESTAV-Zacatenco en colaboración con Alejandro Santiago del Lab. 51 del mismo laboratorio y Kassandra Huerta Calleja, estudiante de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Tecnológica Corregidora, UTC; se realizó la extracción de ADN genómico de 4 clonas (5, 7, 12, 13), de *A. niger* (**Fig. VII.34-A**), a partir de este material genómico, se amplificó un fragmento de tamaño esperado que forma parte del vector y el gen completo de *lacB* (**Fig. VII.34-B**). Actualmente estas clonas son evaluadas para determinar actividad de lacasa en diferentes medios de cultivo que favorezca la expresión de esta enzima en forma activa.

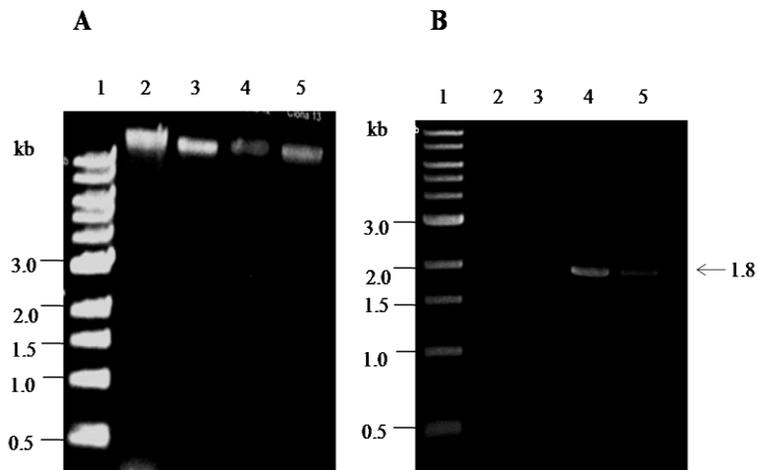


Figura VII.34 Análisis electroforético en gel agarosa 1.0 % a 100 V. Carriles:A 1, 1 kb “DNA ladder”; 2-5, ADN genómico de *A.niger* (clonas 2, 7, 12 y13). **B.** 1 kb “DNA ladder”; 2-5, fragmentos amplificados de *A.niger* (clonas 2, 7, 12 y13)

VIII. DISCUSIÓN

En los últimos años, se ha enfocado especial atención en la producción de lacasas, debido a que estas enzimas muestran especificidad de sustrato de amplio rango, y una excelente eficacia catalítica, cuyo requisito simple para llevar a cabo su reacción catalítica es la presencia del sustrato y oxígeno para generar como producto agua (Upadhyay et al., 2016), característica que le confiere ser una enzima amigable con el medio ambiente, y por supuesto un candidata atractiva para las diferentes industrias biotecnológicas.

En este trabajo nos centramos en la producción de lacasa del hongo ascomiceto termófilo *T. terrestris* Co3Bag1. Primero, evaluamos diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo líquido. Logramos incrementar su actividad con fructosa (20 gL⁻¹) y nitrato de sodio (5gL⁻¹), con una actividad máxima de lacasa de 16.02 UL⁻¹ en el día 12 de cultivo, comparado con el medio con glucosa y tartrato de amonio donde se detectó una actividad máxima de lacasa de 3.27 UL⁻¹ en el día 13 de cultivo. Mansuret al. (1997) sustituyó también fructosa (10 gL⁻¹) en lugar de glucosa como fuente de carbono y aumentó 10 veces más la concentración de tartrato de amonio (10 mM), con resultados favorables, pues aumentó 100 veces más en la actividad específica de lacasa de un basidiomiceto de podredumbre blanca I-62 CECT 20197. *Trametes hirsuta* (MTCC 11397), también incremento la actividad de lacasa de 248 UL⁻¹ a 260 UL⁻¹, al sustituir fructosa por glucosa (1 %) con sulfato de amonio 0.2 % de concentración (Dhakar et al., 2013). *Agaricus* sp. incrementó la producción de lacasa con fructosa como fuente de carbono (Manimozhi y Kaviyarasan, 2012).

En contraste al utilizar como fuente de carbono un polisacárido a un monosacárido., Kumar et al., (2016) reportó un incremento de 1.6 veces más la producción de lacasa sustituyendo glucosa y almidón-extracto de levadura por celulosa y peptona, como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. *Pycnoporus sanguineus* también reportó un incremento 2.6 veces más de producción de lacasa al utilizar sacarosa como fuente de

carbono y asparagina como fuente de nitrógeno no obstante, el incremento también se vio favorecido para aumentar 5 veces más la concentración de asparagina en el medio de cultivo (Eugenio et al., 2009).

Resultados similares en cuanto a la fuente de nitrógeno fue reportada por Afreen et al., (2016), demostró que utilizando nitrato de sodio (10 mM) la actividad de lacasa incrementó 3.6 veces más que el medio de cultivo control de *Arthrospira maxima* (SAE-25780). *Pleurotus sanguineus* y un cocultivo de *Dichomitus squalens* y *Ceriporiopsis subvermispora* también mostraron una mayor actividad lacasa con nitrato de sodio (Lee et al., 2006; Kannaiyan et al., 2015). *Carioplois gallica* 142, incrementó la actividad de lacasa 4570 UL⁻¹ a 16 110 UL⁻¹ cuando la concentración de peptona se aumentó hasta 4 gL⁻¹ (Elisashvili et al., 2017). Todos estos trabajos citados reportan que la actividad de lacasa se ve favorecida con un medio no limitado de nitrógeno (Kaalet al., 1995) sin embargo, el efecto de las fuentes de nitrógeno en la producción de lacasa por diferentes organismos parece ser muy controversial ya que, las condiciones de un medio limitado o no de nitrógeno no parecen ser un patrón para la producción de estas enzimas (Collins y Dobson, 1997). Buswell et al., (1992) reportó una lacasa de *Phanerochaete chrysosporium* limitada por fuentes de nitrógeno.

Si bien, la producción de lacasa es afectada por diversos factores como: la composición del medio, también influye el pH, temperatura, aireación y agitación sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en el uso de inductores agregados al medio de cultivo.

En este trabajo se obtuvieron mejores resultados al incorporar Cu²⁺ (1 mM) al medio de cultivo HCHN modificado por este trabajo, al 4to día de la inoculación del hongo *T. terrestris* Co3Bag1 donde se observó a las 24 h posteriores un aumento considerable de la actividad enzimática. La máxima actividad de lacasa fue de 862.76 UL⁻¹ en el 10mo día de cultivo, 34 veces más que el obtenido en medio sin Cu²⁺ (25.28 UL⁻¹). Estudios previos han demostrado que el cobre es un eficiente inductor de lacasa cuando se complementa en el medio de cultivo en forma de sulfato de cobre al aumentar la

transcripción y la actividad de la enzima (Baldrian, 2002). Dhakar y Pandey (2013), reportó 2 veces más de producción de lacasa por *Trametes hirsuta*, también por *Trametes. Suaveolens* (Vrsanska et al., 2016). Concentraciones >2 mM de CuSO₄ han inducido a lacasas de hongos de *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Pestalotiopsis* sp. (Collins y Dobson, 1997; Domínguez et al., 2007; Hao et al., 2007). Zhuo et al., (2017), reportó actividades de lacasa de 312.3 UL⁻¹ con Cu²⁺ 2 mM, y 522.7 UL⁻¹ para Cu²⁺ 4 mM, 2.31 y 3.86 veces más respectivamente comparado con el control, 135.2 UL⁻¹. Tychanowicz, et al. (2006), reportó un incremento en la actividad de lacasa de 270 a 1,420 UL⁻¹ con Cu²⁺ 25 mM, y solo mostró inhibición de crecimiento del hongo en presencia de Cu²⁺ 40 mM. Concentraciones menores de cobre también han inducido la actividad de lacasa. Palmieri et al. (2000) encontraron que Cu²⁺ 150 μM como la mejor concentración para mejorar la actividad de lacasa por *Pleurotus ostreatus*. De acuerdo a Zouari-Mechichi et al. (2016), *Trametes trogii* produce una actividad lacasa de 20 UmL⁻¹ en presencia de Cu²⁺ 300 μM. Fonseca et al. (2010), reportó la inducción de la actividad de lacasa con Cu²⁺ a 0.5 mM en *Ganoderma applanatum*, *Peniophora* sp. (BAFC 633), *Pycnoporus sanguineus* (BAFC 2126) y *Coriolus versicolor* (BAFC 266). Además ya se ha reportado que la expresión de lacasa está fuertemente regulada por iones de cobre en *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* y *Trametes pubescens*, así lo ha demostrado Pezzella et al, (2013). Además muchos estudios han marcado diferencias en la respuesta transcripcional a los iones de cobre que exhiben diferentes genes lacasa en una sola especie (Litvintseva et al., 2002; Karp et al., 2012; Nakade et al., 2013; Park et al., 2015; Garrido et al., 2016; Othman et al., 2018).

Por lo general, los metales comienzan a ser tóxicos para el hongo en una concentración solo unas pocas veces mayor que la requerida (Hughes et al., 1991). El cobre puede causar daño oxidativo a las proteínas por estrés pero al mismo tiempo sirve como un cofactor en el centro catalítico de lacasa (Baldrían, 2003).

Con la misma concentración óptima de cobre (1 mM) añadido durante la fase logarítmica, con la producción máxima de lacasa en este trabajo, y sin ningún efecto

significativo en el crecimiento de *T. terrestris* Co3Bag1, en otras especies de hongos, como *Trametes trogii*, indicaron que la concentración de Cu^{2+} hasta 1 mM están asociadas con un mayor crecimiento micelial sin embargo, la respuesta al Cu^{2+} se ve afectada por la concentración debido que, a dosis extremadamente altas, la disminución del crecimiento fúngico conduce a una disminución de la actividad de lacasa (Fonseca et al., 2016). Ramsay et al. (1993) reportaron que a altas concentraciones de metales tóxicos, como Cu^{2+} en *Trichoderma virens* y *Rosea clonostachys*, disminuyen la tasa de utilización de carbono, efecto que puede ocurrir porque la presencia de Cu^{2+} impide la capacidad de los hongos para usar recursos como el carbono que, por lo tanto, no puede utilizarse para la nutrición fúngica (Fomina et al., 2003). Algunos autores han demostrado una relación entre el crecimiento del hongo y la actividad de la enzima. (Mouso et al., 2003; Tlecuitl-Beristain et al., 2008). En contraste, se han reportado que los niveles de biomasa y la secreción de lacasa no siempre siguen un patrón común, como se demostró en nuestro trabajo, pues determinamos una producción de biomasa máxima en el octavo día de 0.350 y 0.364 gL^{-1} en presencia y ausencia de cobre, respectivamente en el pico máximo de actividad de lacasa no observando un efecto severo en cuanto a la biomasa de *T. terrestris* Co3Bag1 en presencia de Cu^{2+} , pero si en la actividad de lacasa, comportamientos similares fueron reportados en *Trametes pubecens* (Galhaup et al., 2002).

Después de establecer condiciones de cultivo para mejorar la producción de actividad lacasa por el hongo *T. terrestris* Co3Bag1, nos pareció relevante purificar una lacasa de este hongo que se expresara bajo las condiciones que favorecen la mayor producción de la enzima. Así, se purificó una lacasa, a partir del sobrenadante de cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1, cultivado en presencia de fructosa, nitrato de sodio y el ion metálico Cu^{2+} , bajo las condiciones antes descritas. La lacasa purificada, denominada TtlacA; exhibió una actividad específica de 1.852 Umg^{-1} , y con el protocolo de purificación se obtuvo un rendimiento de 32.5 % y un factor de purificación de 15.6 veces.

La lacasa TtlacA purificada, denominada TtlacA, presentó un peso molecular estimado de 70 kDa. Se han reportado lacasas fúngicas con pesos moleculares muy variados, pero

el rango común oscila entre 50-90 kDa. Lacasas de *Trametes versicolor* (62, kDa) (Xiao et al., 2003); *Paraconiothyrium variable* (84 kDa) (Forootanfar et al., 2011); *Pycnoporus sanguineus* (66-68 kDa), (Ramírez-Cavazos et al., 2014). Entre lacasas, de pesos moleculares menores a 70 kDa, se han reportado Lacc1 y Lacc2 de *Agaricus bisporus* CU13 con pesos moleculares de 40 y 27 kDa, respectivamente (Othman et al., 2018). La lacasa de *Trametes hirsuta* mostró un peso molecular de 45 kDa (Dhakar y Pandey, 2013). Mientras que *Podospora anserina* produce una lacasa de 383 kDa (Durand et al., 2012). También se han purificado varias lacasas de un mismo hongo como *Cerrena unicolor* que expresa 13 lacasas con pesos moleculares diferentes entre 45 y 75 kDa (Lisova et al., 2010). En el hongo *T. terrestris* NRRL8126 se han identificado en su genoma seis multicobre oxidasas con pesos moleculares teóricos alrededor de 60 kDa a 90 kDa (Berka et al., 2011).

Los valores óptimos de pH de las lacasas dependen del sustrato oxidado (Othman et al., 2016). Lacasas fúngicas tienen un pH óptimo entre un rango ácido de 3.0 a 6.0, utilizando ABTS como sustrato. TtLacA libre e inmovilizada exhibió un pH óptimo de 3.0. Resultados similares fueron reportados en lacasas de *Coprinus cinereus* (Lin et al., 2013), *Fomitopsis pinicola* (Park y Park, 2014), *Xylaria* sp. (Castaño et al., 2015) *Marasmius scorodoni* (Jeon y Lim, 2017) y *Paraphoma* sp. GZS18 (Du et al., 2018). Patrick et al. (2009) expresaron que el perfil de pH es el resultado de dos efectos contrastantes: uno de ellos es atribuible a la diferencia de potencial redox entre el sustrato a reducir y el centro de cobre de lacasaT1, donde la velocidad de transferencia de electrones es preferencial a un pH alto; el segundo, se debe a la unión del anión hidroxilo a los centros de cobre T2 / T3 de la lacasa T2 / T3 que restringen al oxígeno como aceptor final de electrones, razón por la cual, a pH alcalino la actividad podría reprimirse debido al exceso de OH⁻ (Othman et al., 2016).

Estudios de estabilidad mostraron que TtLacA mantuvo una actividad residual de más del 50 % en un rango de pH 2.6 a 5.6 a 25 °C, y a un pH cercano al neutro se inactiva completamente la enzima. Al contrario de este perfil de pH, algunas lacasas fúngicas cuyo pH óptimo es ácido, tienen una alta estabilidad en condiciones neutras o alcalinas

(Sadhasivam et al., 2008). Una lacasa de *Lentinus* sp. de 2.5 pH como óptimo, fue estable dentro del rango de pH de 6 a 10 (Hsu et al., 2012).

La actividad de lacasa en TtLacA libre, incrementó gradualmente con el aumento de la temperatura de reacción hasta los 65 °C, que es el valor de temperatura óptima. Olajuyigb et al. (2016), explica que el aumento de actividad enzimática a mayor temperatura es probablemente mediante la mejora de la energía cinética de las moléculas responsables del aumento de la interacción entre el sustrato y el sitio activo de la enzima, y posteriormente la desnaturalización de la enzima hace que la actividad lacasa disminuya a temperaturas de reacción elevadas. Estudios previos han revelado que para la mayoría de las lacasas fúngicas la temperatura óptima está entre un rango de 50 a 60 °C (Baldrian, 2006; Yang et al., 2013), lo que concuerda para la temperatura óptima de TtLacA purificada en este estudio (65 °C), utilizando como sustrato ABTS. Ejemplos con temperaturas óptimas superiores a 60 °C, como la lacasa de *Coriolus unicolor* 137 (60 °C) (Michniewicz et al., 2006), *Abortiporus biennis* (60 °C) (Zhang et al., 2011), *Marasmius quercophilus* (80 °C) (Farnet et al., 2004); mientras que con temperaturas óptimas menores podemos citar una lacasa de *Rigidoporus lignosus* fue casi completamente activa en un rango de temperatura de 30-50 °C, con actividad máxima a 40 °C (Cambria et al., 2000), una lacasa de *Agaricus placomyces* (30 °C) (Sun et al., 2012), una lacasa de *Inonotus baumii* (30 °C) (Sun et al., 2014) y una lacasa de *Pleurotus ostreatus* (35 °C) (Palmieri et al., 2003).

Con respecto a la estabilidad térmica, la actividad de TtLacA permaneció constante y completamente activa durante 210 min a 55 °C. La vida media ($t_{1/2}$) de TtLacA fue de 50 min a su temperatura óptima (65 °C) y de 163 y 8 min a 55 y 75 °C, respectivamente. Similares resultados son reportados a los de *Trichoderma harzianum* WL1 con un valor de $t_{1/2}$ 60 min a 65 °C, y son superiores a la lacasa de *Funalia trogii* con solo $t_{1/2}$ de 30 min a 60 °C (Patrick et al., 2009). TtLacA mostró poca estabilidad a 75 °C, resultados por debajo de *Pycnoporus cinnabarinus* con $t_{1/2}$ de 60 min (Egger et al., 1996).

El efecto de varios iones metálicos sobre la actividad de TtLacA fueron evaluados. Sólo Mn^{2+} y Cu^{2+} (1 mM), mejoraron la actividad de lacasa con 106.0 % y 128.0 %, respectivamente. Una lacasa de *Pleurotus ferulae* exhibió un incremento con 488.51% al agregar Cu^{2+} 0.1 mM, valor que hasta el momento ha sido el más alto que otras lacasas fúngicas (Ding et al., 2014). Los iones Ag^{2+} y Fe^{2+} (1 mM), provocaron una notable inhibición de la actividad TtLacA de *T. terrestris* Co3Bag1 dejando sólo 6.1 y 10.4 %, respectivamente, y en menor porcentaje el ion Co^{2+} con 56 % de la actividad enzimática inicial. De forma similar a los estudios anteriores, De Castro et al. (2006), reportaron que Co^{2+} redujo la actividad de lacasa de *Cyathus bulleri* y también en *Scytalidium thermophilum* (Du et al., 20013). Yang et al. (2013) reportó que el Fe^{2+} inhibía una lacasa de *Shiraia* sp. y una lacasa de *Trametes orientalis* (Zheng et al., 2017), caso similar con TtLacA que es completamente inhibida por Fe^{2+} a 10 mM. Todos los demás metales evaluados a una concentración de 10 mM, disminuyeron la actividad de TtLacA lo que podría deberse que a estas concentraciones ya existe una competencia entre los metales y la enzima por el sitio de unión al sustrato (Hu et al., 2014).

Un reactivo reductor típico es NaN_3 que es capaz de inhibir la actividad de lacasa, ya que puede unirse a los sitios cobre T2 / T3 bloqueando la transferencia de electrones y la reducción del oxígeno molecular (Guajirro et al., 2009; Ausec et al. 2015). TtLacA se vio fuertemente inhibida por la azida a 1 mM con sólo 13.8 % de actividad relativa original y completamente inactiva a 10 mM. Lac-P de *Paraphoma* sp. GZS18, fue completamente inhibida por NaN_3 a 1 y 10 mM (Du et al., 2018). También se evaluó la actividad de TtLacA en presencia de EDTA como agente quelante. El EDTA es un inhibidor de metaloproteínas conocido por su capacidad de formar complejos inactivos con los cofactores de la enzima (Pawlik et al., 2016). TtLacA redujo su actividad a 67 % con respecto a la actividad de lacasa original con EDTA a 1mM y se inactivó a 10 mM. Sin embargo, las lacasas de los hongos *Marasmius quercophilus* (Eggert et al., 1996), y *Pycnoporus cinnabarinus* (Dedeyan et al., 2000) las enzimas se mantienen activas en presencia de EDTA a 10 mM.

Los principales parámetros cinéticos, fueron determinados para TtLacA, cuyo valor de K_M fue de 0.26 mM y la V_{max} fue de 3.571 Umg^{-1} , utilizando como sustrato ABTS. Valores similares fueron obtenidos por la lacasa de *Trichoderma harzianum* WL1, con 3.95 Umg^{-1} (Sadhasivam et al., 2008). Con velocidades máximas de reacción menores citamos a una lacasa de *Chaetomium thermophilum* con V_{max} 2.6 Umg^{-1} (Chefetz et al., 1998).

En cuanto a la afinidad por el ABTS, de TtLacA se agrupa con lacasas con valores medios de K_M . Por ejemplo, lacasas de *Trametes polyzona* (0.150 mM) (Chairin et al., 2014), *Pleurotus pulmonarius* (0.210 mM) (Liu et al., 2014), *Cerrena unicolor* (0.3027 mM) (Wang et al., 2017), *Coprinus comatus* (1.590 mM) (Zhao et al., 2014), *Ganoderma lucidum* (3.7 mM) (Ko-Em et al., 2001), *Pleurotus ostreatus* HP-1 (46.51 mM) y *Trametes trogii* S0301 (69 mM) (Yan et al., 2014). Entre las lacasas con valores menores de K_M se encuentran las lacasas de *Pleurotus sajor-caju* (0.092mM) (Lo et al., 2001), y de *Pleurotus ostreatus* ARC280 (0.476 X10⁻³ mM) (Othman et al., 2014).

Las enzimas inmovilizadas han ganado popularidad debido a que se le confiere diversas ventajas como: la recuperación de la enzima, mayor estabilidad y durabilidad, rápida separación entre la enzima y la mezcla de reacción, tolerancia a pH extremo, temperaturas y concentraciones altas de sustrato (Chen et al., 2012; Edalli et al., 2016). Sin embargo, el uso de polímeros biológicos tiene beneficios adicionales como la no toxicidad, la economía y la biocompatibilidad, como el alginato, que se emplea comúnmente en la inmovilización formando geles con cationes divalentes además de su propiedad de biodegradabilidad (Braccini et al., 2001).

En experimentos preeliminares de este trabajo, se inmovilizó la actividad de lacasa por el método de enlace covalente en nylon-6 y por atrapamiento en perlas de alginato, este último fue seleccionado para inmovilizar el SLM cuya discusión se abordará más adelante.

TtLacA fue inmovilizada en perlas de alginato de cobre, con una eficiencia de 73.8 %. Con valores de eficiencia más bajos podemos citar a Palmeiri et al., (2005) y Brandi et al., (2006), ambos reportaron una eficiencia de 65 % de inmovilización de lacasa en perlas de alginato de cobre. Y con valores superiores es reportado una eficiencia del 80 % (Sondhi et al., 2018). TtLacA inmovilizada presentó valores iguales y cercanos que TtLacA libre. Su pH óptimo fue también de 3.0 y su temperatura óptima incrementó 5 °C más que la enzima libre (65 °C). Es evidente que TtLacA inmovilizada incrementó su estabilidad en ambos parámetros (pH y T°), pues TtLacA inmovilizada tuvo más del 80 % de su actividad a diferentes valores de pH en un rango de 2.6 a 5.6, mientras que TtLacA libre retiene su actividad relativa de apenas el 70 % a los mismos valores. En cuanto a la temperatura, se observa también un incremento en actividad relativa de TtLacA, pues se mantiene activa a una temperatura de 80 °C con más del 80 % no siendo así para TtLacA libre que retiene a penas el 40 % de actividad relativa a la misma temperatura.

Similares comportamientos son reportados por Sondhi et al., (2018), una lacasa parcialmente purificada inmovilizada en perlas de alginato de cobre, mostro un incremento en temperatura de 75 °C a 85 °C y de la misma forma aumentó su estabilidad térmica.

Patel et al. (2014) informó que la estabilidad térmica de lacasa inmovilizada fue significativamente mayor que la del enzima libre, con una vida media de 11 y 18 veces más alta a temperaturas de 50 °C y 60 °C, respectivamente. En contraste, Chhabra et al., (2015), reporta que el pH y la temperatura óptimos de la lacasa libre e inmovilizada de *Cyathus bulleri* permanecieron iguales con ABTS como sustrato.

Ahn et al., (2002), explica que el incremento de termoestabilidad puede deberse a que la inclusión de la enzima en el sistema de soporte da como resultado la protección de la estructura de la enzima, por lo tanto la protección del aminoácido presente en el sitio activo, así como en la superficie de la enzima. A medida que la temperatura aumenta, las

moléculas de sustrato se mueven rápidamente al sitio activo, lo que da como resultado el aumento de la temperatura óptima de la actividad enzimática (Chhabra et al., 2015).

De la misma manera también fue evaluado el efecto de iones metálicos, azida y EDTA sobre la actividad de TtLacA inmovilizada. Observamos que la inmovilización en perlas de alginato de cobre le confiere a TtLacA mayor resistencia por los iones metálicos evaluados, incluso por Hg^{2+} (1 mM), que tiene una actividad relativa de 14.3 % que comparado con TtLacA libre que a la misma concentración es completamente inactiva. También se observó mayor resistencia a EDTA caso similar, se reporta el 56.3 % de actividad relativa de una la lacasa de *Cercospora* SPF-6 inmovilizada en perlas de alginato (Thakhur et al., 2015). Para el caso de NaN_3 , TtLacA inmovilizada mostro un incremento en la actividad relativa en ambas concentraciones evaluadas. Leontievsky et al., (2001) también reporta que la enzima inmovilizada en perlas de alginato fue más tolerante a la azida de sodio que en su forma libre.

En cuanto a los parámetros cinéticos, la lacasa inmovilizada mostró menor afinidad y velocidad máxima (K_M 0.45 mM y V_{max} 2.865 Umg^{-1}) para ABTS en comparación con la enzima libre (K_M 0.26 mM y V_{max} 3.571 Umg^{-1}). Esta observación se comparte con varias otras enzimas inmovilizadas (Brandi et al., 2006; Songulashvili et al., 2012; Wang et al., 2013; Xu et al., 2013) y se atribuye a la resistencia a la transferencia de masa exhibida por las enzimas atrapadas, esto eventualmente conduce a una disminución en la eficiencia catalítica (Fernández et al., 2013). Esto también se puede atribuir a la baja permeabilidad de las perlas de cobre que conduce a una baja difusividad del sustrato, así como al oxígeno requerido para la acción de la lacasa (Champagne et al., 2006).

La reutilización de enzimas inmovilizadas es una de los más importantes factores que afectan la utilización de las enzimas inmovilizadas. La reutilización de TtLacA inmovilizada en perlas de alginato de cobre se mantuvo sin cambios durante los primeros seis ciclos y hasta siete ciclos con 70.3 % de actividad enzimática fue retenida y para el 8vo ciclo tuvo tan sólo el 46.57 % de actividad relativa. Una disminución en la actividad enzimática puede deberse a la desnaturalización enzimática o bien a la

disolución de perlas de alginato de cobre a temperaturas por arriba de 60 °C (Sondhi et al., 2018). Patel et al., (2016), reporta una lacasa que retiene el 93.1 % de actividad residual después de 10 ciclos de reuso. Lloret et al., (2012), inmovilizaron la lacasa de *Myceliophthora thermophila* y lograron 4 ciclos consecutivos.

Después de haber caracterizado a la enzima inmovilizada utilizando como sustrato el ABTS se procedió a realizar la inmovilización del sistema lacasa-mediador para la oxidación de alcohol veratrílico (VA), compuesto no fenólico. Inicialmente se determinó que TtLacA libre y ABTS de forma independiente no tenían la capacidad de oxidar VA en contraste con el SLM, estos datos coinciden con Bourbonnais y Paice, (1990) y d'Acunzo et al., (2006). Para que una reacción lacasa-mediador-sustrato sea espontánea debe de cumplir la condición energética de potenciales redox $E_{lacasa} > E_{mediador} > E_{sustrato}$ y si no se satisface las condiciones de potenciales requeridos, el tiempo de reacción es prolongado o la reacción es nula (Li et al., 1999).

Aunque la reacción entre lacasa y ABTS está bien estudiada, todavía existe incertidumbre en el mecanismo de reacción. Lo que es evidente es que la reacción de ABTS con lacasa produce dos especies oxidativas, el catión radical $ABTS^{\bullet+}$ y el dicatión $ABTS^{2+}$, responsable de la reacción con sustratos no fenólicos, con la evidencia más convincente derivada del E° determinado para cada especie. Los voltamogramas cíclicos demuestran que $E^{\circ} = 0.69$ V para $ABTS^{\bullet+} / ABTS$ y $E^{\circ} = 1.1$ V $ABTS^{2+} / ABTS^{\bullet+}$ (Fabbrini et al., 2002; Branchi et al., 2005). Dado que el E° para el alcohol veratrílico es 1.39 V (Bietti et al., 1998), la oxidación por el catión sería desfavorable desde el punto de vista redox. Además $ABTS^{2+}$ tiene una mayor estabilidad a un pH más ácido (Bourbonnais y Paice, 1990), lo que sugiere que es más probable que esta especie participe en la oxidación de sustratos no fenólicos que el catión.

El SLM de este trabajo fue inmovilizado de la misma forma que TtLacA cuyas condiciones de reacción fueron las óptimas de TtLacA inmovilizada en perlas de alginato de cobre. La eficiencia de atrapamiento fue de 80 %. En desventaja SLM inmovilizado mostro una conversión de VA de tan solo el 17.7 %, comparado con 26.3

% por el SLM sin inmovilizar por 24 h de incubación. Shumakovich et al., 2006 reportó 76 % de conversión de AV por 48 h de incubación y Bourbonnais y Paice, (1990), el 33 % de conversión de AV por 18 h de incubación, ambos en SLM sin inmovilizar.

Finalmente se determinó el número de ciclos de SLM inmovilizado en perlas de alginato de cobre. Se observó que la enzima conserva su actividad después de 2 ciclos repetidos. En el 3er ciclo se observa una disminución a 75.3 % de actividad relativa y para el 3er ciclo solo tuvo el 22.5 % de actividad relativa, hasta el momento no hay trabajo que nos permita comparar la oxidación de VA por un SLM inmovilizado en perlas de alginato sin embargo, se ha reportado el SLM inmovilizado para la degradación de tintes sintéticos en su mayoría, por ejemplo la decoloración de efluentes textiles en continuo por al menos 192 h de incubación (Sondhi et al., 2018). Palmieri et al., (2008) inmovilizó en perlas de alginato de cobre un extracto crudo de *Pleurotus ostreatus* complementada con cobre y ácido ferúlico como mediador para decolorar el colorante Remazol Brilliant Blue R (RBBR). La eficacia del sistema inmovilizado se evaluó durante adiciones de colorantes por etapas en operaciones por lotes y se logró una decoloración del 70 % de RBBR incluso después de 20 ciclos. Aunque en este trabajo el SLM inmovilizado resultó menos eficiente que en su forma libre, es de destacar que la reutilización del sistema puede reducir costos, además el alginato de cobre utilizado no es tóxico y proporciona una mayor estabilidad a la enzima (Sondhi et al., 2018). Si bien, el número de ciclos de reuso fueron pocos, los resultados son prometedores, ya que sugieren la posibilidad de incorporar a la enzima TtLacA en un Sistema Lacasa-Mediador en el ámbito industrial, ya que el hecho de reciclar tanto a la enzima como al mediador, disminuyen costos del proceso; además, se podrían probar otros compuestos fenólicos, no-fenólicos o ambos.

Con la finalidad de clonar y expresar heterológicamente una lacasa de *Thielavia terrestris* Co3Bag1 en el hongo *A niger*, en este trabajo se logró clonar el ORF del gen *lacB* a partir del cDNA de *Thielavia terrestris* Co3Bag1 cultivado en medio modificado HCHN con Cu^{2+} 1 mM. Su secuencia del gen completo fue obtenida a partir de la secuencia del genoma del hongo *Thielavia terrestris* Co3Bag1. El gen *lacB*, presenta una secuencia

nucleotídica de 1786 pb, de las cuales 70 pb corresponden a un intrón, éste gen *lacB* de 1716 pb codifica para una proteína de 572 residuos de aminoácidos, con un PM teórico de 63 kDa. También por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y a partir de la secuencia genoma del hongo *Thielavia terrestris* Co3Bag1 se identificó el gen *lacA* que codifica para la proteína TtLacA, esta cuenta con una secuencia de 2, 373 pb con 4 intrones. TtLacA se conforma de 1782 pb que codifica para una proteína de 594 residuos de aminoácidos con un peso molecular teórico y experimental de 65.3 kDa y 70 kDa respectivamente. Este hecho implicaría que en el genoma del hongo *Thielavia terrestris* Co3Bag1 existe información para codificar, al menos, dos lacasas diferentes. Distintos de lacasas se han caracterizado por poseer un gran número de intrones. El gen *poxl* de *Pleurotus ostreatus* tiene una secuencia de 2592 pb, interrumpido por 19 intrones, que codifica una proteína de 529 aa con cinco posibles sitios de glicosilación (Giardina et al., 1995). Una cepa nativa se ha reportado el gen *lccK* que consiste de 2929 pb, con 19 intrones y marco de lectura de 1599 pb que codifican una proteína de 533 aa (Okamoto et al., 2003), El gen *lcc1* de *Trametes máxima* esta conformado por 2401 pb, nueve intrones y codifica una de proteína de 519 residuos de aminoácidos (Soto-Gutiérrez, 2009).

La secuencia de *laca* y *lacB* tienen una similitud del 100 % y 98 % respectivamente, con una enzima multicobre oxidasa de *T. terrestris* NRRL8126 (UniProtKB acceso número G2R0D5). Se realizó un alineamiento múltiple tomando como referencia la secuencia de aminoácidos de la proteína multicobre de *T. terrestris* NRRL 8126 (XP_003651936.1), con secuencias en aminoácidos de las cuatro coincidencias principales por análisis de identidad utilizando el Programa BLAST. Se identificaron las cuatro regiones conservadas de unión a cobre, diez histidinas y una cisteína, que se encuentran en todas las oxidasas de cobre azul (Claus, 2004). El motivo His-Cys-His, implicado en la transferencia de electrones desde el centro de cobre de T1 al centro de cobre trinuclear T2/T3 y, a continuación en la secuencia, aparece un residuo de isoleucina (Ile485) que también se ha descrito como en la lacasa del ascomiceto *Melanocarpus albomyces* como posible ligando del sustrato (Ile505, Hakulinen et al., 2002). Por otro lado, estas

secuencias pueden presentar cierta homología con lacasa de otros géneros debido a las regiones altamente conservadas de la lacasa (Thurston, 1994).

Sirim et al., (2011), han creado una base de datos (<http://www.lcced.uni-stuttgart.de>) a partir de las secuencias genéticas y estructuras de más de 2.200 lacasas y multicobre oxidasas y las han clasificado en 11 superfamilias y 56 familias homólogas (**XII. Anexo C.1**). Atendiendo a esta clasificación, ambas lacasas de *T. terrestris* Co3Bag1 se sitúan en el grupo B, el correspondiente a las lacasas de ascomicetos. En este mismo grupo también estarían clasificadas las lacasas de *Monocillium indicum* (Thakker et al., 1992), *Chaetomium thermophilum* (Chofetz et al., 1998), *Mauginiella* sp (Palonen et al., 2003), *Botryosphaeria rhodina* (Dekker et al., 2007), *Paraconiothyrium variabile* (Forootanfar et al., 2011) y *Xylaria* sp. (Castaño et al., 2015).

IX. CONCLUSIONES

Este trabajo demostró que la sustitución de glucosa/tartrato de sodio por fructosa/nitrato de sodio, mejora la producción de lacasa en cultivo líquido del hongo termófilo *T. terrestris* Co3Bag1. Además la incorporación de cobre sobre la fase logarítmica de crecimiento de este hongo aumentó 34 veces más con respecto al mismo medio de cultivo modificado (fructosa/nitrato de sodio) sin cobre.

Se purificó una lacasa (TtLacA) a partir del sobrenadante de cultivo de *T. terrestris* Co3Bag1 y su caracterización bioquímica de la enzima puso de manifiesto ser una enzima ácida y termofílica.

TtLacA inmovilizada en perlas de alginato de cobre incrementó su estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura sin embargo la afinidad por el sustrato ABTS y velocidad máxima se vieron disminuidas, con respecto a la enzima libre.

La TtLacA libre e inmovilizada, no es capaz de oxidar por sí misma alcohol veratrílico (compuesto no-fenólico), a veratraldehído, pero sí en presencia de ABTS como mediador de la reacción enzimática.

T. terrestris Co3Bag1 produce al menos dos lacasas *lacA* y *lacB*, bajo las condiciones de cultivo modificadas.

El análisis de la secuencia de las lacasas *lacA* reveló la presencia de motivos característicos de las oxidasas multicobre, entre los que cabe destacar las cuatro regiones de unión de los átomos de cobre. Este análisis reveló asimismo la presencia de un residuo de cisteína en la secuencia de aminoácidos de TtLacA, que la reconoce como una lacasa azul “verdadera”.

X. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

En este trabajo demostramos que la producción de lacasa de *T. terrestris* Co3Bag1 en medio de cultivo líquido se vio favorecida por la sustitución de fuentes de carbono y nitrógeno, y la incorporación de cobre como inductor sin embargo, tanto la biomasa como la producción de lacasa aun es baja, por lo tanto es necesario continuar con el objetivo de expresar la lacasa en un sistema heterólogo que pueda producir a la enzima en mayor proporción. Actualmente contamos con clonas de *A. niger*, aunque ya se ha corroborado que su transformación fue exitosa, aún no se ha detectado actividad de lacasa tanto en medio sólido como líquido, por ello se propone cambiar el medio de cultivo (medio mínimo) a un medio enriquecido que beneficie la producción de lacasa.

Además quedó pendiente ensayos de PCR en tiempo real. Ya contamos con oligonucleótidos directos y reversos diseñados a partir de alineamientos múltiples con otras secuencias de lacasa de hongos, para identificar los genes codificantes para lacasa que son expresados bajo las condiciones de cultivo modificadas en este trabajo.

También se realizaron solo las pruebas iniciales de inmovilización de TtLacA bajo un sistema lacasa-mediador que puede ser completado con pruebas con otros compuestos no necesariamente solo no fenólicos si no también fenólicos o ambos, con el fin de reutilizar tanto a la enzima como al mediador que generalmente disminuye su costo del proceso, propósito principal para muchas industrias.

TtLacA u otra lacasa de *T. terrestris* Co3Bag1 podría ser utilizada de forma individual en algún proceso biotecnológico por ejemplo en la biorremediación de aguas contaminadas de efluentes textiles o la generación de biosensores empleando el SLM, Además, podría ser utilizada en conjunto con otras enzimas que se tiene en el grupo de trabajo, laboratorio 51 de ingeniería de proteínas (xilanasas y celulasas), y analizar si existe un efecto sinérgico de las mezclas de enzimas en la degradación de algún sustrato.

XI. ANEXOS

XII. Anexo A.1 Cuantificación de proteína por el método de Lowry (1951)

Reactivos	Volumen	Reactivos	Volumen
Reactivo A		Reactivo C	
CuSO ₄	0.5 g	Reactivo A	1 mL
Citrato de sodio	1.0 g	Reactivo B	50 mL
Reactivo B		Reactivo D	
Na ₂ CO ₃	2 g	Reactivo de Follin/H ₂ O	1:1
NaOH	0.4 g		

XII. Anexo A.2 Electroforesis SDS-PAGE 10 %

Gel Concentrador	
Reactivos	Volumen (2 gel)
H ₂ O dd	2.4 mL
Monómero acrilamida y Bis-Acrilamida (30:80)	0.6 mL
Amortiguador concentrador	1.0 mL
SDS 10 %	0.04 mL
PSA	25 µL
TEMED	10 µL

Gel separador	
Reactivos	Volumen (2 gel)
H ₂ O d	4.1 mL
Monómero acrilamida y Bis-Acrilamida (30:80)	3.3 mL
Amortiguador de separación	2.5 mL
SDS 10 %	0.1 mL
PSA	50 µL
TEMED	10 µL

Amortiguadores para SDS-PAGE	
Reactivos	Volumen
Amortiguador para gel separador	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
Tris	3.6 g
H ₂ O dd	150 mL
Ajustar a pH 8.8 con HCl	---
Aforar con H ₂ O dd	hasta 200 mL
Amortiguador para gel concentrador	0.5 Tris-HCl, pH 6.8
Tris	3.0 g
H ₂ O dd	40 mL
Ajustar a pH 6.8 con HCl	--
Aforar con H ₂ O dd	hasta 50 mL

Amortiguador de carga para proteína		Amortiguador de corrida	
Reactivos	Volumen	Reactivos	Volumen
glicerol	20 %	Tris-glicina pH 8.0	0.25 mM
β -mercaptoetanol	10 %	SDS	0.1 (p/v)
SDS	4.6 %		
Tris	0.125 mM		
Azul de bromofenol	0.02 %		

Los zimogramas fueron preparados siguiendo la misma metodología, excluyendo el SDS y β -mercaptoetanol de todas las soluciones.

XII. Anexo A.3 Soluciones para la extracción de ADN genómico

Reactivos	Concentración
Amortiguador TE	
Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA	1 mM
Amortiguador de extracción	
Tris-HCl pH 8.5	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0.5 %

XII. Anexo A.4 Condiciones de PCR Quiagen (Cat No./ID:202602)

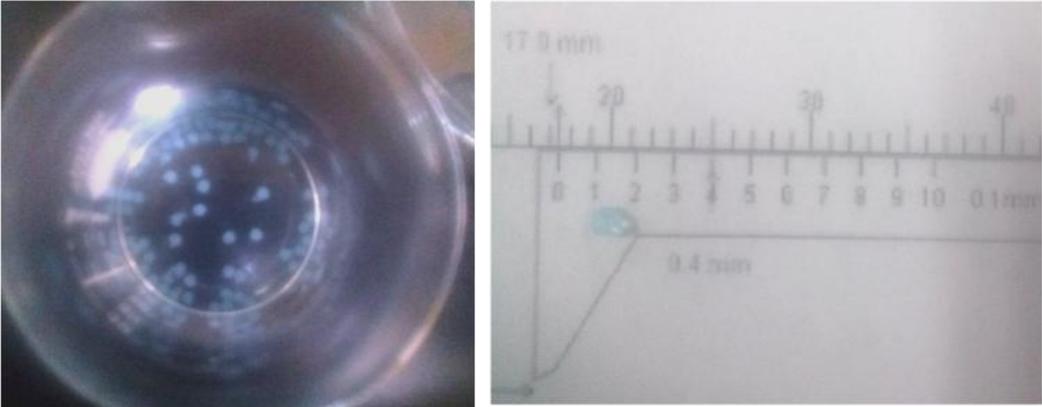
PCR de acuerdo al protocolo Quiagen	
Mezcla de reacción	Volumen (μ l)
Amortiguador	20
Primer A	4
Primer B	4
DNA genómico	4
Taq pol	2
H ₂ O	66
Total	100

XII. Anexo B.1 Secuencia de la multicobre oxidasa de *T. terrestris* Co3Bag1

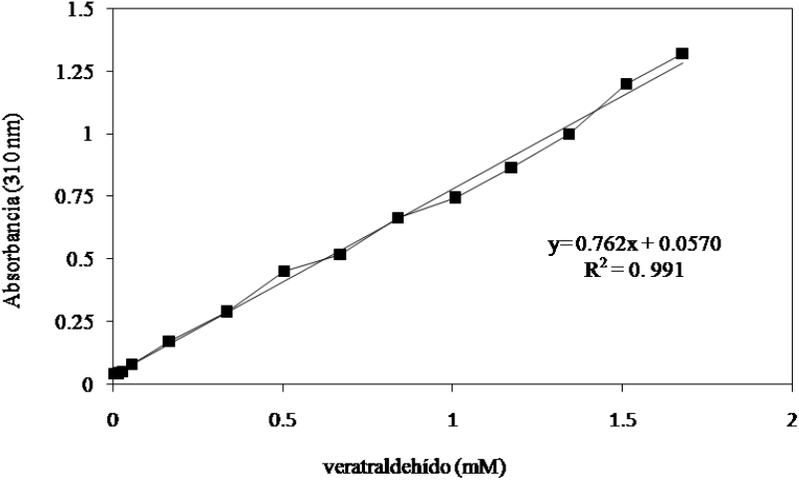
atgggccttttgcgcgccctgctcgagagcgtctccgagaccctcgagctgttctacaca
M G L L R G L L E S V S E T L E L F Y T
 gcgacggctacgctgacccaggagagcaccacgggctttcgctcttggggactctattg
A T A T L T Q E S T N G L S L L G T L L
 gcccgctcctgcccttttctgacaaataatccgcttcccgatggatttccatggggc
A R V L P L F L T N N P L P D G F P W G
 tctttatctgacaccaacaccaatccgtatgtcgactaccctcggaccggcggttccg
S L S D T N T N P Y V D Y P R T G V V R
 tactatgacttcacggtcagccggggatcatcgccggcgggtaccaacgggacggt
Y Y D F T V S R G I I A P D G Y Q R D V
 ctcttgtcaacggcgccctatcccggctcccctcatcgaggcgaactggggcgacacgatt
L L V N G A Y P G P L I E A N W G D T I
 gtcgtgactgtgcaacaacatcagcaacccgaagacggcactaccatccactggcac
V V T V H N N I S N P E D G T T I H W H
 ggtttcttcaacgtgagactccttgggctgacggggcgccggggatctcacagtgtccc
G F L Q R E T P W A D G A P G I S Q C P
 atcccggcgggagcagctacacctacgagttcgttgcagctctgttggcaccaggtg
I P P G S S Y T Y E F V A S L F G T S W
 tatcatgcccactactcggcacagtcgctgggggtgtcgtcgggcccattgtcgtttac
Y H A H Y S A Q Y A G G V V G P I V V Y
 ggcccgacacatgcccaagtcagatgtcgaccttggccgatcatgctgagcagttggtac
G P T H A K Y D V D L G P I M L S D W Y
 cacagagacttccagatgtcaaggagctgctatctccaaatgccagcccgagggtg
H R E Y F D I V K E L L S P N A S P R V
 ctgtcggacaacaacctgatcgacggcaagatgaactttgactgctcgacagttgccct
L S D N N L I D G K M N F D C S T V A P
 ggagacaacaccccgtgcaccgatagagccggtatctcgaagtccaagtttcagacgggc
G D N T P C T D R A G I S K F K F Q T G
 aagacgcaccgctcgtctgatcaattcgggcgcgacgggtgtccaacgcttctcgatc
K T H R L R L I N S G A D G V Q R F S I
 gaccaacacactctgactgtcatcgcggaagactttgtgcccgtgaagccgtacaacacc
D Q H T L T V I A E D F V P V K P Y N T
 acggtggtcaccttgggggtcggtcagcgcaccgacgtgcttgcacggccaacagctggc
T V V T L G V G Q R T D V L V T A N A G
 ccgcccattctctgttttgatgcggtccaacctgacgacgtgctcggcccgcgccgag
P P D S L F W M R S N L T T C S P A R Q
 ccaacgccttggcgccgtcactacgacaagccgacacttcggccaacgcttccgac
P N A L A A V Y Y D K A D T S A T P S S
 agaccctgggatgttcggatccaggaacctgcgccaacgacccgctcgacatctcggag
R P W D V P D P G T C A N D P L D I S E
 ccgctgtatccgatacagttgcccagcccgccattaccagaccatggatccgagcta
P L Y P I P L P K P A I T Q T M D I E L
 ttcaagaacgcttcgaatgtgacgctttggaagttcaacggcggtgctccatgagaactgac
F K N A S N V T L W K F N G V S M R T D
 tacaatagcccgggtgatcctgcttgcacaaccagggcaactttagctaccgcccctgaatgg
Y N S P V I L L A N Q G N F S Y P P E W
 aacgtggtgaactaccaacagacaacggcgatccgcatcatcatcaacaataagggggccc
N V V N Y Q Q T T A I R I I I N N K G P
 ggccctcaccgatgcatctccatgggcacaacttctacattctgcatgaagggcccggc
G P H P M H L H G H N F Y I L H E G P G
 gaatgggacgggaccatcgttcggcgtcaaaccggatgcgggcggaagcgtggaactcgtg
E W D G T I V R P S N P M R R D V E L V
 cgcggcaacggctcatcttctgatacagttcgacggcgcccctggcgtctggcctttccac
R G N G H L V I Q F D G A P G V W A F H
 tgccacatcgcttggcattcctcggggcggttctcctggcatcgcttctcgttcagccacac
C H I A W H S S G G F L A S L L V Q P H
 aaggtgcagcagatgcaccttctcggcgatgtcgagcagaactgccgagcctgggactta
K V Q Q M H L P G D V E Q N C R A W D L
 tggacgaagcacaacgcttctcgaccagattgacagcggcacataa
W T K H N V V D Q I D S G T

Secuencia en nucleótidos de 1785 pb y 594 aa, contiene siete posibles sitios de N-glicosilación (Asn-X-Ser-Thr, subrayado) y cuatro sitios de unión a cobre (azul).

XII. Anexo B.2 Perlas de alginato de cobre



XII. Anexo B.3 Curva estándar de concentración de veratraldehído.



XII. Anexo C.1 Distribución de las oxidasas multicobre en familias según la base de datos LccED (Laccase Engineering Database). Tomado de Sirim et al. (2011).

Superfamilia	Familias homólogas	Proteínas	Estructuras
A (Lacasas de basidiomicetos)	4	201	13
B (Lacasas de ascomicetos)	6	421	6
C (Lacasas de insectos)	8	168	0
D (MCOs pigmentos fúngicos)	4	55	0
E (Ferroxidasas fúngicas)	6	117	6
F (AOs de plantas y hongos)	6	137	8
G (Lacasas de plantas)	5	333	0
H (Proteínas CopA de bacterias)	6	383	0
I (Bilirrubin oxidasas de bacterias)	5	149	24
J (Proteínas CueO de bacterias)	5	310	11
K (Homólogos SLAC)	1	18	3

Símbolos: AO: ascorbato oxidasa; MCO: oxidasa multicobre

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmed, M. A., Solbiati, J.O. and Cann, I.A. 2013. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Appl Microbiol.* 82:5-8.
- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W., Kanost, M.R. and Kramer, K. J. Laccase is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proc Natl Acad Sci.* 102:11337-11342.
2. Arora, D. S. and Sharma, K.R. 2010. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Appl Biochem Biotechnol.* 160:1760–1788. Arroyo M. Inmovilización de enzimas.1998. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharm* 39:23-39.
3. Baldrian P. 2006. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30:215-242. Bajpai, P. 2004. Biological bleaching of chemical pulps. *Crit Rev Biotechnol.* 24:1-58. Barreca, A. M. 2003. Laccase mediated oxidation of lignin model for improved delignification procedures. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 26:105-110.
4. Bento, I., Silva, S.C., Chen, Z., Martins, L.O., P.F., Lindley, C. and Soares, M. 2010. Mechanisms underlying dioxygen reduction in laccases. Structural and modelling studies focusing on proton transfer. *Structural Biology.* 10:28. Bertrand, G., 1985. Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase. *CR Acad. Sci.* 120:266-269.
5. Bodke, P. M., Senthilarasu, G. and Raghukumar, S. 2012. Screening Diverse Fungi for Laccases of Varying Properties. *Indian J Microbiol.* ; 52(2): 247–250. Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:519-546.
6. Bourbonnais, R. and Paice, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102. Brena, B. and Batista V. 2002. Immobilization of Enzymes A Literature Survey. From: *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition Edited by: J. M. Guisan © Humana Press Inc., Totowa, NJ 15-29.
7. Broekhuijsen, M.P., Mattern, I.E., Contreras, R., Kinghorn, J.R and van den Hondel, C.A.M.J.J. 1993. Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*:

- production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *J Biotechnol* 31:135-145.
8. Calvo, A. M., Copa, P., González A. E. 1998. Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Arch Microbiol* 171:31-36.
 9. Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, S. and Martinez, A.T. 2005 Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microbiol*, 71:1775-178.
 10. Cañas A. and Camarero, S. 2010. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol. Adv.*28:694-705.
 11. Cervantes, R. 2011. Aislamiento y selección de hongos termotolerantes degradadores de lignina que participan en el composteo de cachaza y bagacillo de la industria cañera. Tesis de Maestría. CIBA.
 12. Champagne, P., Ramsay, J. A. Reactive blue 19 decolouration by laccase immobilized on silica beads. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;77:819–23.
 13. Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl Environ Microbiol*. 64:9:3175-3179.
 14. Chen, M., Zeng, G., Tan, Z., Jiang, M., Li, H. 2011. Understanding Lignin-Degrading Reactions of Ligninolytic Enzymes: Binding Affinity and Interactional Profile. *PLoS ONE* 6(9): e25647. doi:10.1371/journal.pone.0025647.
 15. Claus, G., Faber, H. and König. 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:672-678.
 16. Cao, L., van Langen, L. and Sheldon, R. 2003. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?. *Current Opinion in Biotechnol.* 14:387–394.
 17. Daassi, D., Mechichi, Z., Prieto, A., Martínez, M., Nasri, M. and Mechichi, T. 2013. Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes* sp. isolated in Tunisia: role of the enzyme in olive mill waste water treatment. *Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s11274-013-1380-7
 18. Dashtban, M., Schraft, H. and Quin, W. 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *Int. J. Sci.*, 5:578-595.

19. Demet, S., Florian, W., Lei, W., Schmid, R. and Pleiss, J. 2011. The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. Article ID bar006, doi:10.1093/database/bar006.
20. D'Acunzo. 2002. A mechanistic survey of the oxidation of alcohols and ethers with the enzyme laccase and its mediation by TEMPO. *Eur. J. Org. Chem.* 24:4195-4201. d'Acunzo, F., Baiocco, P. and Galli, C. 2003. A study of the oxidation of ethers with the enzyme laccase under mediation by two N-OH-type compounds. *New J. Chem.* 27:329-332.
21. D'souza, T. D., Tiwari, R., Sah, A. K., & Raghukumar, C. 2006. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technol.* 38:504–511. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.07.005.
22. Demain, A.L. and Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances.* 27:297-306.
23. Durán N, Rosa MA, D'Annibale A, Gianfreda L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb Technol* 2002;31:907–31 Eda Çelik, E. and Çalık, P., 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* 30:1108–1118.
24. Elisashvili, E. and Kachlishvili, E. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *J. Biotechnol.* 144:37-42.
25. Ericksson, O.E. 2002. Outline of Ascomycota. *Myconet.* 3:1-88. Fernández, F., Sanromán, A. and Moldes, D. 2012. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*
26. Fillat, A., Colom, J. and Vidal, T. 2010. A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. *Bioresource Technol.* 101: 4104-4110.
27. Forde, J., Tully, E., Vakurov, A., Gibson TD, Millner P, Ó'Fágáin C. 2010. Chemical modification and immobilization of laccase from *Trametes hirsuta* and from *Myceliophthora thermophila*. *Enzyme Microb Technol.* 46:430–7.

28. Frommer, W. and Ninnemann, O. 1995. Heterologous expression of Genes in bacterial, fungal, Animal, and plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:419-440.
29. Garg, N., Bieler, B., Kenzom, T., Chhabra, CH., Ansorge-Schumacher, M. and Mishra, S. 2012. Cloning, sequence analysis, expression of *Cyathus bulleri* laccase in *Pichia pastoris* and characterization of recombinant laccase *BMC Biotechnology* 12:75.
30. Garavaglia, S., Cambria, M., Miglio, Santa, R., Iacoba, I., Palmieri, CH., Scaloni, A. and Rizzil. 2004. The Structure of *Rigidoporus lignosus* Laccase Containing a Full Complement of Copper Ions, Reveals an Asymmetrical Arrangement for the T3 Copper Pair. *Mol. Biol.* 342:1519-1531.
31. Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. and Sannia, G. 2010. Laccases: A never-ending story. *Cell Mol Life Sci.* 67:369-385. Gunne, M. and Urlacher, V. 2012. Characterization of the Alkaline Laccase Ssl1 from *Streptomyces viceus* with Unusual Properties Discovered by Genome Mining. *PLoS* 7(12):e52360. *Journeal.pone.005260.*
32. Hildén, K., Hakala, T., Lundell, T. 2009. Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnol Lett.* 31:1117-1128.
33. Huifang, X., Li, Q., Wang, M. and Zhao, L. 2003. Production of a Recombinant Laccase from *Pichia pastoris* and Biodegradation of Chlorpyrifos in a Laccase/Vanillin System. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23(6): 864–871.
34. Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H. and Takegawa, K. 2010. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:403-17.
35. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H.L., Bolivar, F. and Boyer, H.W. 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198:(4321)1056-1063.
36. Kaal, E.E.J., Field, J.A. and Joyce, T.W. 1995 Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. *Biores Technol.* 53:133-139. doi: 10.1016/0960 8524(95)00066-N.

37. Karp, S.G., Faraco, V., Amore, A., Birolo, L., Giangrande, C., Soccol, V.T., Pandey, A. and Soccol, C.R. 2012. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol.* 114:735-9. doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.058.
38. Katchalski-Katzir, E. 1999. Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol.* 11, 471-478.
39. Kumar, S., Kumar, T., Singh, R. and Lee, J. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* 14:1232-1277; doi:10.3390/ijms14011232
40. Khlifi-Slama, R., T. Mechichi, S. Sayadi, and A. Dhouib. 2012. Effect of natural mediators on the stability of *Trametes trogii* laccase during the decolourization of textile wastewaters. *J. Microbiol.* 50:226-234.
41. Kim, J.K., Lim, S.H. and Kang, H. 2013. Cloning and Characterization of a Novel Laccase Gene *fvlac*, Based on the Genomic Sequence of *Flammulina velutipes*. *Mycobiol.* 41(1):37-41.
42. Ko, E.M., Leem, Y.E. and Choi, E. 2001. Purification and characterization of laccase isoenzymes from the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:98-102.
43. Kudanga, T., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G.M. and Burton, S. 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 48:195-208.
44. Kües, U. y Rühl, M. 2011. Multiple multi-copper oxidase gene families in basidiomycetes. *Curr Genomics.* 12:72-94.
45. Kunamneni, A., Camarero, S., García, C., Plou, F.J., Ballesteros, A., and Alcalde, M. 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb. Cell Fact.* 7:32
46. Lacayo, I., Hwang, S., Ding, Shi-You and Telen, P. 2013. Lignin Depletion Enhances the Digestibility of Cellulose in Cultured Xylem Cells. *Journal Pone.* e682667:1-12.
47. Li, J., Hong, E., Xiao, E., Xu, E.Y. and Fang, W. 2007. High production of laccase B from *Trametes* sp. in *Pichia Pastoris*. *World J Microbiol Biotechnol.* 23:741-745.

48. Lico, C., Santi, L., Twyman, R.M., Pezzotti, M. and Avesani, L. 2012. The use of plants for the production of therapeutic human peptides. *Plant Cell Rep.* 31(3):439-51. doi: 10.1007/s00299-011-1215-7.
49. Liu, C., Miao, Y., and Zhang, K. 2011. Sequestration and transport of lignin monomeric precursors. *Molecules.* 16:710-727.
50. López, O. 2011. Purificación y caracterización bioquímica de una lacasa Lac97 de *Corynascus sepedonium* cepa Co3-Bag1. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN.
51. Lu, H., Zhang, H., Shi, P., Luo, H., Wang, Y., Yang, P. and Yao, B. 2013. A family 5 β -mannanase from the thermophilic fungus *Thielavia arenaria* XZ7 with typical thermophilic enzyme features. *Appl Microbiol Biotechnol.* Madhavi, V. and Lele, S. 2009. Laccase: Properties and applications. *Bio Resources.* 4(4):1694-1717.
52. Magnúsdóttir, A., Vidarsson, H., Björnsson, J.M. and Orvar, B.L. 2013. Barley grains for the production of endotoxin-free growth factors. *Trends Biotechnol.* 13:67-7799
53. Manubens, A., Canessa, P., Folch, C., Avila, M., Salas, L. and Vicuna, R. 2007. Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *FEMS Microbiol Lett.* 275:139-145.
54. Maquieira, A. 2010. Biosensores. Conceptos y aplicaciones. International Union of Pure and Applied Chemistry Physical Chemistry Division, Steering Committee on Biophysical Chemistry, Analytical Chemistry Division, Commission V.5.
55. Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz, D.F., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, J., Gutiérrez, A. and del Río, J. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology.* 8:195-204.
56. Mazur, M., Krysiski, P., Michota, Kamińska A, Bukowska J, Rogalski J, Blanchard GJ. Immobilization of laccase on gold, silver and indium tin oxide by zirconium–phosphonate–carboxylate (ZPC) coordination chemistry. *Bioelectrochemistry.* 71:15–22.
57. McAleer, J., Buynak, B., Maigetter R., et al., 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307:178-180.

58. Mechichi, H., Mechichi, T., Dhouib, A., Sayadi, S., Martínez, A., Martínez, M. 2006. Laccase purification and characterization from *Trametes troggi* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme Microb Technol.* 39:141-148.
59. Minussi, R., Glaucia, M., Pastore. and Duran, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science and Technology* 13:205-216.
60. Mohidem, N. A. and Mat, H. 2009. The catalytic activity of laccase immobilized in sol-gel silica. *J Appl Sci Res.* 9:3141-5.
61. Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V. and Yaropolov, A.I. 2007. "Blue" Laccases. *J.Biochem.*72(10):1136-1150.
62. Muhammad, I., Muhammad, N. and Quratualain, S. 2012. Media optimization for amylase production in solid state fermentation of wheat bran by fungal strains. *Journal of Cell and Molecular Biology* 10(1):55-64.
63. Muñoz, C., Guillen, F., Martinez, A. and Martinez, M. 1997. Laccase isozymes of *Pleurotus eryngii* : characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn^{2+} oxidation. *Appl Environ Microbiol.*63:2166-2174.
64. Nakatani, M., Hibi, M., Minoda, M., Ogawa, J., Yokozeki, K. and Shimizu, S. 2010. Two laccase isoenzymes and a peroxidase of a commercial laccase-producing basidiomycete, *Trametes* sp. Ha1. *Biotechnol.*27(4):317-23.
65. Ni, J. and Tokuda, G. 2013. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their microbiota, *Biotechnol Adv.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.005>.
66. Parenti, A., Muguerza, E., Redin, A., Omarini, A., Conde, E., Alfaro, M., Castanera, R., Santoyo, F., Ramírez, L. and Pisabarro, Antonio, G. 2013. Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. *Bioresource Technology.* 133:142-149.
67. Poonam, S., Nigam and Pandey, A. 2009. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. Pre-treatment of Agro-Industrial Residues. Part I* 13. Porowinska, D., Wujak, M., et al., 2013. Prokaryotic expression systems. *Postepy Hig Med Dosw.* 67:119-129.

68. Reiss, R., Ihssen, J., Richter, M., Eichhorn, E., Schilling, B. 2013. Laccase versus Laccase-Like Multi-Copper Oxidase: A Comparative Study of Similar Enzymes with Diverse Substrate Spectra. *PLoS ONE* 8(6):e65633. doi:10.1371/Journal.pone.0065633.
69. Rich, J., Timothy, D., Amber, M., Kenneth, M., Bischoffa, P. and Manitchot, P. 2013. Laccases from *Aureobasidium pullulans*. *Enzyme and Microbial Technology*. 53:33-37.
70. Rodgers, C., Blanfordl, C., Giddens, S., Skamnioti, P., Armstrong, F. and Gurr, S .2009. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?. *Trends in Biotechnol.* 28:62-73.
71. Rodríguez, C. and Toca, H. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv.* 24:500-513. Sakurai, T. and Kataoka, K. 2007. Four-electron Reduction of Dioxygen by a Multicopper. *Chem. Rec.* 7:220-229.
72. Santhanam, N., Vivanco, J.M., Decker, S.R., Reardon, K.F., 2011. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends Biotechnol.* 29: 480–489.
73. Saritha, M., Arora, A. and Lata. 2012. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. *Indian J. Microbiol.* 52(2):122-130.
74. Stchigel, A.M., Sagues, M., Cano, J. and Guarro, J. 2000. Three new thermotolerant species of *Corynascus* from soil, with a key to the known species. *Mycol Res* 104:879–887. Sharma, K. K. and Kuhad, R. C. 2008. Laccase: enzyme revisited and function redefined. *Ind. J. Microbiol.* 48:309-316.
75. Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., Kumar, A., 2011. Laccase: microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. *Enzyme Res.* 1-11.
76. Sheldon, R. A. 2007. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv Synth Catal.* 349:1289-307
77. Sirim, D., Wagner, F., Wang, L., Schmid, R.D., Pleiss, J., 2011. The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. Database. <http://dx.doi.org/10.1093/database/bar006>.

78. Slomczynski, D., Nakas, J.P., Tanenbaum, W., 1995. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:907–912.
79. Soares, G., de Amorim, M., Costa, M. 2001. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *J. Biotechnol.* 89:123-129.
80. Solís, O., Ugalde, V.M., González, I and Viniegra, G. 2005. An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *J. Electroanal. Chem.* 579:59-66
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol* 140:19-26.
81. van den Brink, J., Samson. R., Hagen, F., Boekhout, T. and de Vries, R. 2012. Phylogeny of the industrial relevant, thermophilic genera *Myceliophthora* and *Corynascus*. *Fungal Diversity.* 52:197–207.
82. Vega, O., De Marcob, R., De Risio, C. 2011. Efecto del empleo de ácido ascórbico, azodicarbonamida y las enzimas lacasa, xilanasa y lipasa sobre los parámetros fermentativos de una masa panaria. *Vector* 5:17-24.
83. Virk, A. P., Sharma, P. and Capalash, N. 2012. Use of laccase in pulp and paper industry. *Biotechnol Progress,* 28:21–32.
84. Wang, Y., Chantreau, M., Sibout, R. and Hawkins, S. 2013. Plant cell wall lignifications and monolignol metabolism. *Frontiers in Plant Science.* 4:1-14.
85. Wei, H., Xu Q, Taylor, L.E., Baker J. O, and Tucker, M,P. 2009. Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Curr Opin Biotechnol* 20:330-338.
86. Weng, J.K., and Chapple, C. 2010. The origin an devolution of lignin biosynthesis. *New Phytol.* 187:273-285. Wong, D. 2009. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol.* 157:174-209.
87. Wong, K. S., Cheung, M.K., Au, CH. and Kwan, H. S. 2013 A Novel *Lentinula edodes* Laccase and Its Comparative Enzymology Suggest Guaiacol-Based Laccase Engineering for Bioremediation. *PLoS One*:10.1371/journal.pone.0066426.
- Yoshida, H. 1883. Chemistry of lacquer (Urushi).Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *J. Chem. Soc.Transact.* 43:472-486.

88. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J. and Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Publ Gr.* 2015; 12:7-8. doi: 10.1038/nmeth.3213.
89. Yang J., Wang G., Ng T. B., Lin J. and Ye X. Laccase production and differential transcription of laccase genes in *Cerrena* sp. in response to metal ions, aromatic compounds, and nutrients. *Front. Microbiol.* 2016; 6:1558. doi:10.3389/fmicb.2015.01558.
90. Yin L., Ye J., Kuang S., Guan Y. and You R. Induction, purification, and characterization of a thermo and pH stable laccase from *Abortiporus biennis* J2 and its application on the clarification of litchi juice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 2017; 81(5):1033-1040. doi: 10.1080/09168451.2017.1279850.
91. Zhu M., Zhang G., Meng L., Wang H., Gao K. and Ng T. Purification and characterization of a white laccase with pronounced dye decolorizing ability and HIV-1 reverse transcriptase inhibitor activity from *Lepista nuda*. *Molecules.* 2016; 21(4):415-431. doi:10.3390/molecules21040415.
92. Zouari-Mechichi H., Mechichi T., Dhouib A., Sayadi S., Martinez A. T. and Martinez J. M. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in

