



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y  
DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

Expresión génica de lacasas del hongo termófilo  
*Thielavia terrestris* Co3Bag1 en presencia de cobre  
como inductor

Tesis que presenta

CARLOS GABRIEL SÁNCHEZ CORONA

Para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS  
en la especialidad de  
BIOTECNOLOGÍA

Dirección:

DRA. MARÍA EUGENIA HIDALGO LARA

CINVESTAV Biotecnología y Bioingeniería

Comité:

DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES  
UNAM Dpto. BQ Facultad de Medicina

DR. RODOLFO MARSCH MORENO  
CINVESTAV Biotecnología y Bioingeniería

DR. JORGE E. CAMPOS CONTRERAS  
UNAM UBIPRO FES Iztacala

DR. ROBERTO RUIZ MEDRANO  
CINVESTAV Biotecnología y Bioingeniería

Ciudad de México Octubre, 2020

# ÍNDICE

1. RESUMEN   ABSTRACT.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1   Lacasas.....	2
2.2   Lacasas fúngicas.....	11
2.3   Genes de lacasa .....	15
2.4   Producción de lacasas .....	19
2.5   Investigaciones y aplicaciones.....	26
3. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	34
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	35
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	36
5.1   Organismo fuente.....	36
5.2   Cinética de crecimiento.....	36
5.3   Inducción por cobre.....	39
5.4   Análisis bioinformático de secuencias.....	39
5.5   Extracción de gDNA y evaluación de cebadores .....	40
5.6   Extracción de RNA .....	42
5.6   Síntesis de cDNA.....	43
5.7   Evaluación de librerías y detección de expresión .....	43
6. RESULTADOS .....	44
6.1   Cinéticas .....	44
6.2   Análisis de secuencias .....	48
6.3   Diseño de cebadores .....	55
6.4   Evaluación de cebadores con gDNA.....	59
6.5   Extracción de RNA y detección de expresión .....	59
7. DISCUSIÓN.....	62
8. CONCLUSIÒN.....	71
9. ANEXOS .....	i
10. FUENTES .....	vi

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-I Ejemplo de lacado japonés © Kyoto National Museum .....	2
Figura 2-II Ejemplos de fuentes de lacasa.....	3
Figura 2-III Funciones fisiológicas de las lacasas en diversos organismos.....	6
Figura 2-IV Presunta dinámica de las lacasas de hongos y plantas.....	6
Figura 2-V Representación gráfica de los centros de cobre de la lacasa CotA.....	9
Figura 2-VI Representación tridimensional de la lacasa de <i>Trametes versicolor</i> .....	9
Figura 2-VII Mecanismo de reducción de oxígeno a agua por lacasas.....	9
Figura 2-VIII Ciclo catalítico de un Sistema Lacasa Mediador .....	10
Figura 2-IX Estructura de lacasa a nivel de secuencia.....	15
Figura 2-X Elementos de regiones promotoras para lacasas .....	17
Figura 2-XI Enfoques para optimizar los niveles de lacasas secretadas por levaduras .....	24
Figura 2-XII Regiones objetivo para mutaciones de lacasa. ....	25
Figura 2-XIII Ejemplos de productos relacionados con lacasas. ....	28
Figura 2-XIV Evolución de las investigaciones sobre lacasas.....	31
Figura 5-I Esquema general de trabajo.....	36
Figura 6-I Cinéticas de crecimiento de <i>Tht. C3B1</i> en ZMO y ZMM. ....	45
Figura 6-II Cinéticas de crecimiento de <i>Tht. C3B1</i> en ZMO+Cu y ZMM+Cu .....	45
Figura 6-III Crecimiento en matraces desde el día 3 al 14. ....	46
Figura 6-IV Aspectos de los cultivos de <i>Tht. C3B1</i> . ....	46
Figura 6-V. Parte del alineamiento entre Lac A, B, C, D, E y N .....	48
Figura 6-VI Árbol filogenético para lacasas y MCO de NRRL8126 y Co3Bag1 .....	49
Figura 6-VII Resultado de <i>Standard Numbering</i> .....	53
Figura 6-VIII Modelo tridimensional obtenido Lac A-N.....	54
Figura 6-IX Posición de cebadores en cada secuencia de lacasa y $\beta$ -tubulina. ....	57
Figura 6-X a) Extracción de gDNA y PCR con gradiente térmico (55.7-65.0°C).....	59
Figura 6-XI Extracción de RNA de cultivos en medios diferenciados con y sin inducción .....	59
Figura 6-XII PCR de librerías de cDNA con cebadores para lac A-N. ....	60
Figura 6-XIII Productos de PCR (27 ciclos), para medios diferenciados y lac A-N .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-I Investigaciones y aplicaciones de lacasas fúngicas desde 1974 a 2020 .....	32
Tabla 5-I Composición por litro de los medios para esporulación y producción de lacasas .....	37
Tabla 6-I Secuencias para lacasa reportadas por Berka <i>et al.</i> 2011 .....	48
Tabla 6-II Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac A guarda similitud .....	50
Tabla 6-III Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac B guarda similitud .....	50
Tabla 6-IV Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac C guarda similitud .....	51
Tabla 6-V Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac D guarda similitud .....	51
Tabla 6-VI Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac E guarda similitud .....	51
Tabla 6-VII Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac N guarda similitud .....	52
Tabla 6-VIII Secuencias de $\beta$ -tubulina reportadas con las que $\beta$ -tub Tht C3B1 guarda similitud .....	56
Tabla 6-IX Oligonucleótidos para $\beta$ -tubulina fúngica descritos por Einax & Voigt, 2003 .....	56
Tabla 6-X. Evaluación de oligonucleótidos para $\beta$ -tub C3B1 .....	56
Tabla 6-XI Evaluación de oligonucleótidos para Lac A, B, C, D, E y N .....	58

## 1 RESUMEN | ABSTRACT

Las lacasas, pertenecientes a las oxidasas multicobre (MCO), son enzimas caracterizadas por su capacidad de oxidación de sustratos orgánicos e inorgánicos, acoplada con la reducción de oxígeno molecular en agua. Se han reportado diversas funciones *in vivo* en organismos procariotas y eucariotas como algas, insectos, plantas y hongos; estos últimos considerados la fuente óptima por sus mejores actividades degradadoras. *Thielavia terrestris*, es un hongo ascomiceto termófilico y comprobado productor de lacasa. En este estudio se buscó identificar a nivel transcripcional la respuesta de la cepa Co3Bag1 de *T. terrestris* en la producción de lacasas en medios diferenciados en fuentes de C y N, además del efecto inductivo de iones de  $\text{Cu}^{2+}$ , suministrado como  $\text{CuSO}_4$  1mM. Se inició con el diseño de cebadores específicos para secuencias putativas para lacasa (Lac A, B, C, D, E y N), establecidas a partir de secuencias reportadas en repositorios para lacasa y otras MCO. El momento ideal de cada cultivo para la inducción y posterior extracción de RNA de la biomasa, se estableció mediante cinéticas de crecimiento evaluando actividad enzimática y generación de biomasa. La expresión de los genes putativos para lacasa se comprobó fue diferencial entre los medios de cultivo con y sin inducción por Cu. El medio (ZMO) con fuentes de C y N de fácil asimilación (glucosa y tartrato de amonio) mostro no inducir la expresión de ningún gen para lacasa, hasta su inducción, cuando se confirma la expresión de la mayoría de dichos genes, siendo además detectable por un incremento de hasta 44 veces más en la actividad enzimática, respecto al medio ZMO. En contraste, el medio (ZMM) con fuentes de C y N de difícil asimilación (fructosa y nitrato de sodio), mostro poder inducir la expresión de todos los genes putativos de lacasa, sin verse un efecto por la adición de Cu, inclusive en los niveles de actividad enzimática.

Laccases, belonging to multi-copper oxidases (MCO), are enzymes characterized by their ability to oxidize organic and inorganic substrates, coupled with the reduction of molecular oxygen in water. Various *in vivo* functions have been reported in prokaryotic and eukaryotic organisms such as algae, insects, plants, and fungi; the latter considered the optimal source for their best degrading activities. *Thielavia terrestris* is a thermophilic ascomycete fungus and a proven producer of laccase. In this study we sought to identify at the transcriptional level the response of the *T. terrestris* strain Co3Bag1 in the production of laccase in differentiated media in C and N sources, in addition to the inductive effect of  $\text{Cu}^{2+}$  ions, supplied as 1mM  $\text{CuSO}_4$ . It began with the design of specific primers for putative sequences for laccase (Lac A, B, C, D, E and N), established from sequences reported in repositories for laccase and other MCO. The ideal moment of each culture for the induction and subsequent extraction of RNA from the biomass was established by means of growth kinetics evaluating enzymatic activity and biomass generation. The expression of the putative genes for laccase was found to be differential between the culture media with and without Cu induction. The medium (ZMO) with sources of C and N of easy assimilation (glucose and ammonium tartrate) showed not to induce the expression of any gene for laccase, until its induction, when the expression of most of these genes is confirmed, being in addition detectable by an increase of up to 44 times more in the enzymatic activity, compared to the ZMO medium. In contrast, the medium (ZMM) with C and N sources of difficult assimilation (fructose and sodium nitrate), showed to be able to induce the expression of all putative laccase genes, without seeing an effect by the addition of Cu, even in levels of enzyme activity.

## ② MARCO TEÓRICO



Figura 2-1 Ejemplo de lacado japonés. *Jikiro* (recipiente para alimentos) decorado con dragones y fénix en *urushi* (pintura de laca) y *maki-e* (pintura de laca con polvo de oro o plata), de entre 1848-54. © Kyoto National Museum

### 2.1 | Lacasas

La lacasa (Lac, EC 1.10.3.2, benzenodiol: O<sub>2</sub> oxidorreductasa), fue descrita por primera vez en 1883 como parte del extracto de la savia del árbol *Toxicodendron verniciflum* (antes *Rhus vernicifera*), una mezcla de urishiol (o *laccol*), agua, polisacáridos y otras enzimas (Yoshiba 1883; Kumanotani 1988). Para 1894, esta enzima fue aislada, purificada y nombrada como tal por Gabriel Bertrand, quien en trabajos posteriores detectó su presencia en muchos otros vegetales y en hongos, además descubrió y comprobó la acción oxidativa de la lacasa sobre polifenoles, en especial aquellos con grupos oxhidrilo en posiciones *orto* (-*o*-) y *para* (*p*-), por ejemplo, el urishiol, con el cual se genera la laca utilizada en las artes decorativas de China y Japón (Figura 2-1); siendo este uno de sus usos más antiguos. También detectó como elemento activo de la enzima al manganeso (Mn) (Dawson & Mallette 1945; Reynolds 2014; Wisniak 2014), que 50 años más tarde se comprobaría se trataba en realidad de Cobre (Cu) (Keilin & Mann 1939; Tissières 1948).

Actualmente las lacasas, principalmente las de origen fúngico, son reconocidas por sus cada vez más diversas aplicaciones, desde el campo médico, las industrias química y alimenticia hasta la ingeniería ambiental (Senthivelan *et al* 2016). En las siguientes secciones se abordarán de manera sucinta las fuentes, características, funciones y aplicaciones de esta enzima.

## 2.1.A | Fuentes: distribución y funciones biológicas

Actualmente las lacasas se creen ubicuas, pues se han encontrado en organismos procariotas (Martins *et al.* 2015), así como en muchos otros organismos eucariotas como algas, insectos y hongos (Figuras 2-II y 2-III) (Mayer 1986; Mayer & Staples 2002; Otto *et al.* 2010; Claus 2004).

En procariotas, encontramos que la lacasa mejor estudiada es CotA, de la endospora de la bacteria *Bacillus subtilis*, que parece estar implicada en la biosíntesis de pigmentos marrones en esporas para su protección de la radiación ultravioleta (UV) y de agentes químicos. Las lacasas bacterianas son de interés en la industria e investigación por ser termoestables y servir como modelos útiles para la ingeniería de proteínas, aunque, comparadas con lacasas de otros organismos poseen bajo potencial redox y un rango limitado de sustratos (Hullo *et al.* 2001; Sharma 2006; Singh 2011).

En algas, a partir de su primer reporte en *Tetracystis aeria*, se han encontrado funciones como la degradación de sustancias fenólicas tóxicas en ambientes terrestres y acuáticos, la síntesis de compuestos asociados a pared celular y absorbentes de UV, y la adquisición de nutrientes a través de la transformación de sustratos lignocelulósicos; además se ha propuesto su uso para la remoción de xenobióticos, disruptores endocrinos y compuestos aromáticos naturales (Otto *et al.* 2010; Otto & Schlosser 2014; Otto *et al.* 2015).

En insectos, como la mariposa o gusano de la seda (*Bombyx mori*), se ha relacionado la presencia y actividad de lacasas con su fisiología, a través de la síntesis de agentes esclerotizantes quinonoides propios de la melanización cuticular que da forma a su exoesqueleto (Hopkins & Kramer 1992; Kramer *et al.* 2001; Yatsu & Asano 2009). También se han encontrado actividades metabólicas y de homeostasis de iones metálicos en otros insectos como *Manduca sexta* y *Anopheles gambiae* (Dittmer & Kanost 2010).

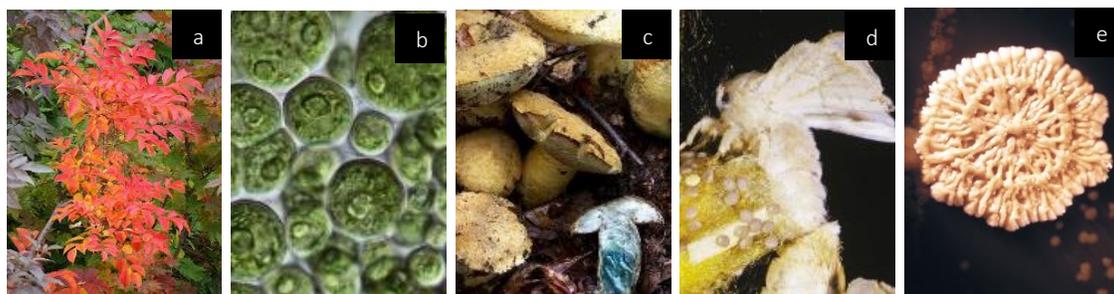


Figura 2-II Ejemplos de fuentes de lacasa: a) *Toxicodendron vernicifluum*, b) *Tetracystis aeria*, c) *Boletus cyanescens*, d) *Bombyx mori* y e) *Bacillus subtilis*. Tomado de enciclopedia britannica, funghiitaliani y SYKOA.

En plantas, se ha detectado actividad de lacasas en la lignificación de xilemas en varias especies, en un proceso que aún continúa en estudio, pues aunque algunos perfiles de transcripción específicos sugieren que las lacasas son correguladas por genes de biosíntesis de monómeros de lignina y genes secundarios que forman la pared celular, y en pruebas *in vitro* han actuado como *p*-difenoil: O<sub>2</sub> oxidorreductasas, oxidando junto a fenoloxidasas todos los tipos de monolignoles, los monómeros base de la lignina (alcoholes coniferílico, sinapílico y cumarílico), y produciendo polímeros de deshidrogenación que tienen características similares a la lignina, estas enzimas parecen estar implicadas de manera diferente en la lignificación de la pared celular de tipos celulares específicos (O'Malley 1993; Dean & Eriksson 199; Barros 2015). Por otra parte, algunos estudios sugieren que la dinámica de la lignificación debería centrarse más en los compuestos intermediarios, aunque sin dejar de lado a los tres precursores clásicos, pues existen especies, como la picea de Noruega (*Picea abies*), que están formadas en su mayoría por uno de estos, en este caso alcohol coniferílico (Elfstrand *et al* 2001; Boerjan *et al* 2003).

En cuanto a los hongos, la presencia y actividad intra o extracelularmente de las lacasas se ha demostrado en decenas de especies, principalmente en los hongos xilófagos de los filos Basidiomycota (Basidiomicetos) y Ascomycota (Ascomicetos), sin haberse comprobado producción por parte de hongos de los filos Chytridiomycota y Zygomycota (Yaropolov 1994; Baldrian 2006), a excepción del género *Mucor* en este último (Bonugli-Santos *et al* 2010).

Las principales funciones de las lacasas fúngicas son la morfogénesis, la interacción patogénica en infecciones en plantas, la defensa contra el estrés y la degradación de la lignina (Thurston 1994). Esta última es considerada una de las más importantes, incluso sirve para clasificarlos como hongos de la podredumbre blanca, marrón y blanda, según las coloraciones o modificaciones resultantes de su mecanismo de ataque enzimático sobre la madera. El primer mecanismo remueve la lignina y la celulosa, el segundo elimina los componentes celulósicos y modifica la lignina, mientras que el tercero degrada preferentemente la celulosa (Luley 2006).

De esta clasificación, se consideran como los degradadores de lignina más eficientes a los hongos de la podredumbre blanca, al tener una alta actividad de lacasas y otras enzimas como la manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) o lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), definidas como un mínimo necesario para dicho proceso, ya que este debe ser asistido por muchas otras enzimas como peroxidasas, glioxal oxidasa, glucosa oxidasa, aril alcohol oxidasa, así como componentes no enzimáticos. También se pueden agrupar a los hongos según la predominancia de sus enzimas en la

degradación de lignina como: grupo I, de la lignina-manganeso peroxidasa (e.g. *Phanerochaete chrysosporium*); grupo II, de la manganeso peroxidasa (e.g. *Dichomitus squalens*), y grupo III, de la lignina peroxidasa-lacasa (e.g. *Phlebia ochraceofulva*) (Mayer & Staples 2002; Dwivedi *et al* 2011).

### 2.1.A.1 | Funciones ecosistémicas

La lignina es un componente principal de la materia orgánica presente en los ecosistemas del suelo y una fuente potencial de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>); sin embargo, su degradación es difícil dada su naturaleza recalcitrante y estructura compleja, y además requiere de múltiples organismos y por tanto de enzimas (Datta *et al* 2017). Como es el caso de la lacasa, cuya actividad en suelos ya ha sido comprobada (Ruggiero 1984; Criquet *et al* 1999).

En este punto, la lacasa, con su comprobada abundancia en hongos y actividad degradadora de lignina, así como su actividad en la polimerización de lignina en las plantas, ha llevado a suponerle un papel importante en el control del ciclo biogeoquímico del carbono (Figura 2-IV) (Luis *et al* 2004; Baldrian 2006; Luo *et al.* 2017). Por ejemplo, en pruebas de mineralización de los compuestos recalcitrantes de la materia orgánica del suelo (SOM – del ingl. *soil organic matter*), se analizó la influencia de las concentraciones de CO<sub>2</sub> y la participación de plantas de crecimiento activo, como el heno *Deschampsia flexuosa*, encontrando que la exposición de suelos a elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> a largo plazo, aumenta la producción vegetal y la respiración subterránea, estimula la microbiota del suelo y la actividad de las lacasas, es decir, el crecimiento activo de las plantas puede estimular la actividad de la lacasa en el suelo, pero el potencial de producción de lacasa inducida por las plantas parece depender del potencial de producción de lacasa del suelo (Partavian *et al* 2015).

Es claro que existe interacción entre lacasas entre organismos, pero un análisis profundo de esta dinámica es complejo y los resultados de estudios ecológicos, enzimáticos y moleculares pueden discrepar entre sí y hacer difícil una mejor comprensión de la actividad de lacasas por hongos en los ecosistemas del suelo (Theuerl & Buscot 2010). Por otra parte, las predicciones de estructura tridimensional, a nivel monomérico, para las lacasas bacterianas, fúngicas y vegetales, sugieren una alta conservación en los motivos de unión a Cu de las secuencias de los dominios de cupredoxina, especialmente en los dominios 1 y 3, donde se encuentran tales motivos. Sin embargo, existen diferencias significativas en los residuos conservados de los sitios de unión a Cu entre las enzimas de diferentes organismos, lo que podría explicar las funciones duales y contrastantes de la lacasa, principalmente entre hongos y plantas (Dwivedi *et al.* 2011; Janusz *et al.* 2020).

## 2.1.B | Sustratos

Propiamente, las lacasas son enzimas oxidasas pertenecientes a las oxidorreductasas y a las oxidasas multicobre (MCO - del ingl. *multicopper oxidases*), junto a la ceruloplasmina (EC 1.16.3.1), la nitrito reductasa (EC 1.7.2.1) y la ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3), caracterizadas por su capacidad de oxidación de sustratos acoplada con la reducción de oxígeno molecular. En el caso de la lacasa, en un balance de 4 moléculas oxidadas de sustrato por cada una de oxígeno reducido, generando como productos agua (H<sub>2</sub>O) y no sustancias indeseables como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), además de productos diméricos o poliméricos con carboxilaciones oxidativas, dependiendo de los radicales libres generados y las condiciones de reacción. Tienen baja especificidad de sustrato, por lo que utilizan una amplia variedad de sustancias, sean:

Orgánicas con sustituyentes en posiciones:

*Orto* (e.g. guayacol, pirocatecol, ácido caféico y ácido gálico),

*Meta* (e.g. *m*-fenilendiamina, orcinol, resorcinol y floroglucina) o

*Para* (e.g. *p*-fenilendiamina, *p*-cresol e hidroquinona), e

Inorgánicas, como los iones:

Mo(CN)<sub>8</sub><sup>4-</sup>, Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup>, Os(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup> y W(CN)<sub>8</sub><sup>4-</sup> (Morozova 2007a; Solomon *et al* 2008).

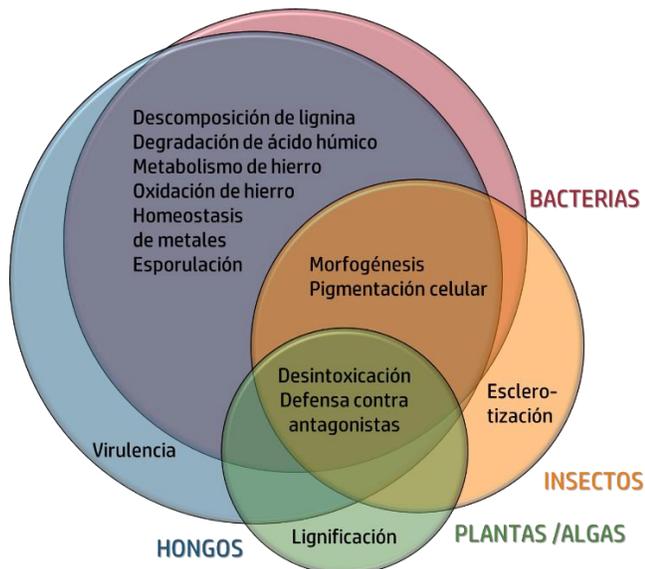


Figura 2-III Funciones fisiológicas de las lacasas en diversos organismos. Elaboración propia basada en Janusz *et al.* 2020.

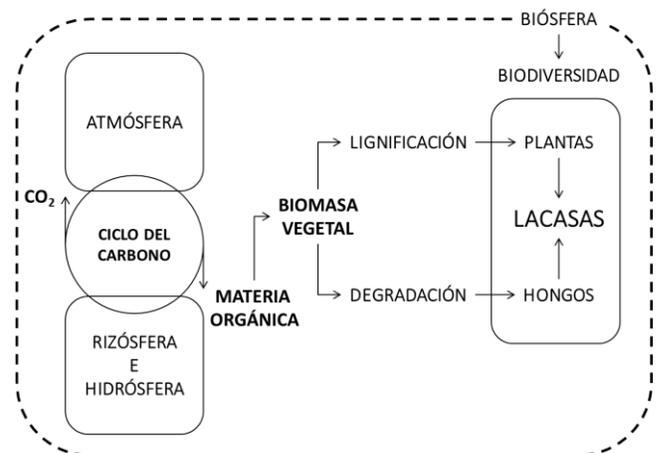


Figura 2-IV Presunta dinámica de las lacasas de hongos y plantas dentro del ciclo biogeoquímico del carbono. Elaboración propia basada en Janusz *et al.* 2020.

## 2.1.C | Estructura y mecanismo catalítico

Estructuralmente, la lacasa es una de las MCO más sencillas, en su forma de holoenzima activa es una glicoproteína dimérica o tetramérica, con un peso molecular entre 50 y 130 kDa, donde cada monómero tiene un sitio activo formado por cuatro átomos de Cu que pueden dividirse en tres sitios de oxidorreducción denominados T1, T2 y T3 (**Figura 2-V**), de acuerdo con sus propiedades espectrofotométricas (Farver & Pecht 1984).

El sitio T1 define la eficiencia catalítica de estas enzimas, al definir también su potencial de oxidorreducción ( $\epsilon$ , ORP - del ingl. *Oxidation-Reduction Potential*). Este sitio es originado de un coordinado trigonal entre un átomo de Cu y dos residuos de Cys (cisteína) y un residuo de His (histidina) (Solomon 1996; Kunamneni *et al.* 2008 a), que en su forma oxidada se caracteriza por una intensa Absorbancia a  $\sim 600$  nm (color azul) detectable por resonancia paramagnética electrónica (EPR - del ingl. *Electronic Paramagnetic Resonance*) debido a la naturaleza altamente covalente del enlace Cu – S (Cys) (Li *et al.* 2004; Madhavi & Lele 2009).

Algunas enzimas parecidas que carecen de Cu se denominan lacasas amarillas o blancas, ya que sin Cu no poseen coloración azul. A veces no se consideran lacasas verdaderas (Baldrian 2006).

El sitio T2 presenta paramagnetismo no visible detectable por EPR, debido a la coordinación entre el Cu y dos residuos de His (Madhavi & Lele 2009), mientras que el sitio T3 presenta Absorbancia no detectable por EPR. En este sitio el Cu es coordinado por seis His (**Figura 2-VI**) (Kunamneni *et al.* 2007).

Relacionado a la estructura de la enzima, el mecanismo enzimático empieza con cuatro oxidaciones monoeléctricas del sustrato en el sitio T1, donde los residuos de esfera primaria y secundaria<sup>1</sup> que rodean a este sitio controlan la transferencia de electrones tanto de manera intermolecular, desde el sustrato al T1, como intramolecular mediante la vía de Cys – His, desde el T1 al grupo de cobre trinuclear (TNC - del ingl. *trinuclear copper*), que está formado por los sitios T2 y T3. Ahora con la enzima completamente reducida, el mecanismo continúa con la reducción de oxígeno molecular ( $O_2$ ) a  $H_2O$  por medio de dos electrones, primero se forma un intermediario peróxido, donde se unen los átomos de Cu de los sitios T2 y T3 y que es el lugar de la reducción del

---

<sup>1</sup> Se denomina esfera de coordinación primaria al complejo formado por los ligandos unidos directamente a un centro metálico, mientras que la segunda esfera comprende iones, moléculas y porciones de una cadena principal de un ligando. La interacción entre ambas esferas influye en la reactividad y propiedades del complejo metálico (Raymo & Stoddart 1996).

O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Esta transferencia de dos electrones se repite ahora reduciendo al peróxido y originando al intermediario nativo, implicando para ello la ruptura del enlace O-O de la molécula de dioxígeno y la entrada de la enzima a su estado de reposo, la cual posee cuatro cobres oxidados que incluyen un centro T3 con puentes de hidróxido. La enzima vuelve a estar reducida cuando un reductor dona cuatro electrones para reducir los cuatro átomos de cobre (II) (Cu<sup>+2</sup>) a cobre (I) (Cu<sup>+</sup>) transferidos del T1 al TNC (**Figura 2-VII**) (Solomon *et al.* 2008; Jones & Solomon 2015).

### 2.1.C.1 | Potencial de óxido reducción y eficiencia catalítica

Como ya se ha mencionado, el sitio T1 determina el ORP de las lacasas y otras MCO, pues estas enzimas sólo pueden oxidar directamente compuestos con potenciales menores o ligeramente mayores que el de sus sitios T1. En lacasas, estos ORP varían entre 0.4 y 0.8 V (frente a un electrodo normal de hidrógeno<sup>2</sup>, NHE - del ingl. *normal hydrogen electrode*), y son dependientes de muchos factores a nivel molecular, algunos de estos son: (1) un ambiente hidrófobo, que puede aumentar el ORP, (2) enlaces de hidrógeno (H) en átomos de azufre (S) unidos a metales, que también lo aumenta, (3) estado entáxico o restricción de proteínas, que puede modular el ORP cambiando las posiciones y orientaciones de los ligandos del Cu, así como ajustando las fuerzas de los enlaces de coordinación, (4) interacciones electrostáticas intraproteicas, y principalmente (5) ligandos axiales como Met (metionina), Gln (glutamina) y Glu (glutamato), que pueden disminuir los ORP al estabilizar al Cu. (Li *et al.* 1994; Jones & Solomon 2015).

La presencia de un ligando axial Cu – Ser (Met) disminuye el ORP del sitio T1 y da a la enzima una geometría tetraédrica alargada trigonalmente coordinada, debido a que se trata de un ligando más largo y débil que los otros tres enlaces de ligando con el sitio T1. Este tipo de estructura es típico de las lacasas de plantas, mientras que las lacasas fúngicas muestran una estructura plana trigonal de tres coordenadas, resultado de la presencia de un residuo hidrofóbico no coordinado, como Phe (fenilalanina) o Leu (leucina), en lugar de Met axial. Así, las lacasas de plantas, con un ligando Met, a menudo tienen potenciales aproximados a 0.4 V, mientras que las lacasas fúngicas, sin un ligando axial, tienen en su mayoría potenciales más altos, algunos cercanos a 0.8 V (Jones & Solomon 2015; Sekretaryova *et al.* 2019).

---

<sup>2</sup> Potencial de un electrodo de platino en solución ácida 1 M (Spitzer *et al.* 2013)

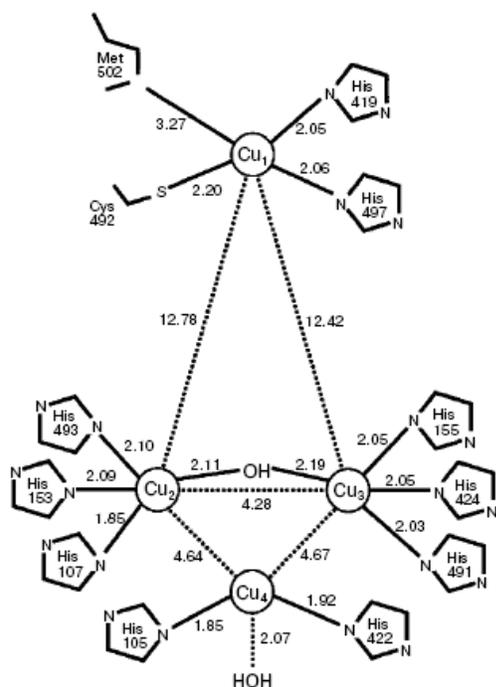


Figura 2-V Representación gráfica de los centros de cobre de la lacasa CotA de *B. subtilis*, incluyendo sus distancias interatómicas. Tomado de Enguita *et al.* 2003

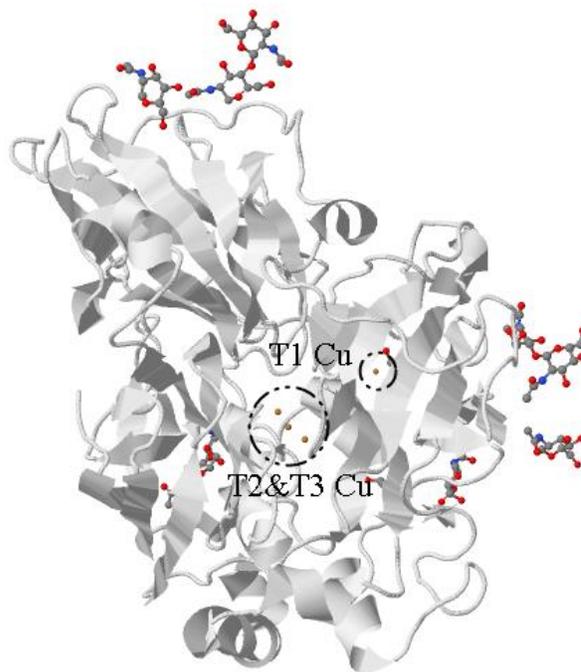


Figura 2-VI Representación tridimensional de la lacasa de *Trametes versicolor* (TvL) con los tres sitios de cobre señalados. Modificado de Protein Data Bank (código 1GYC)

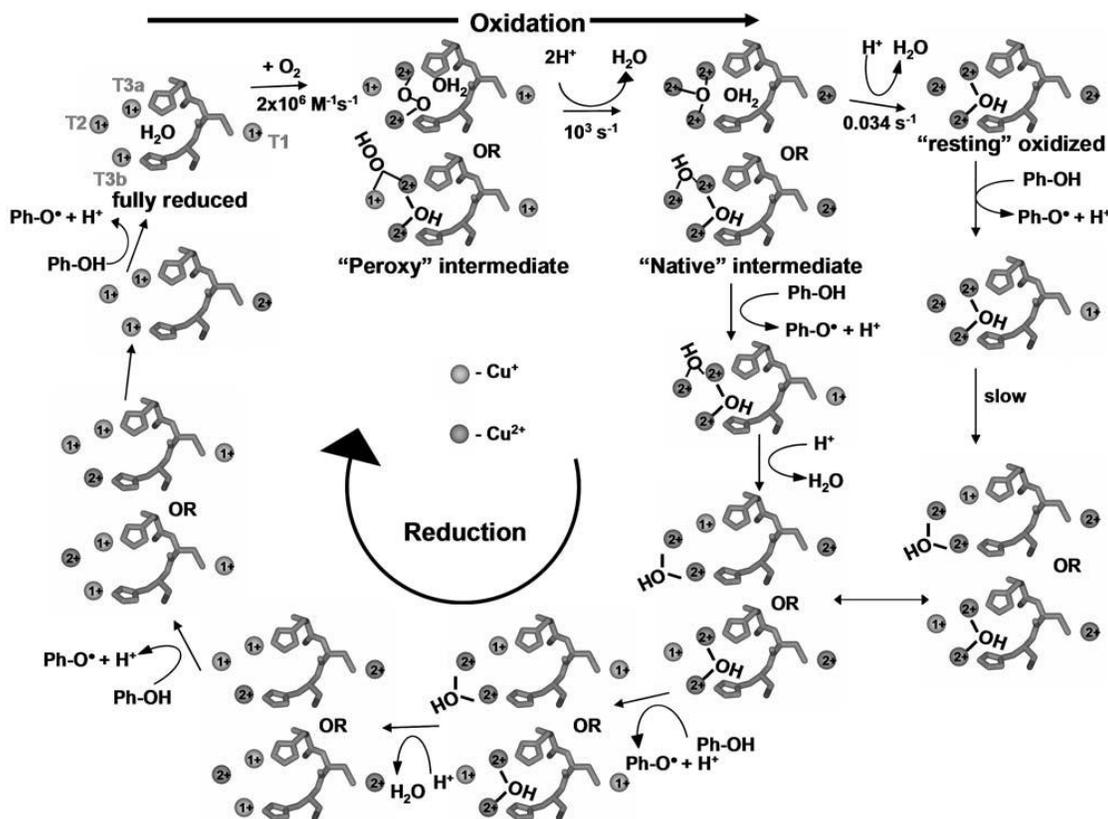


Figura 2-VII Mecanismo de reducción de oxígeno a agua por lacasas. Tomado de Mot & Silaghi-Dumitrescu 2012

Los cambios en el ORP también tendrán efectos en la cinética de reacción, pues la velocidad de una reacción de oxidación con lacasa depende de la diferencia de potenciales entre la enzima y el sustrato, por tanto, las constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de estas reacciones también varían según el sustrato. A nivel estructura, esto se puede relacionar con el tamaño y la forma del sitio de unión del sustrato cerca del sitio T1, (Frasconi *et al.* 2010) donde, en el caso de las lacasas, se sugiere que, para alcanzar un  $K_m$  bajo, se requiere de una unión favorable entre el sitio T1 y el sustrato, es decir, es dependiente de la afinidad y características electrónicas de los sustratos, ya que sólo contribuyen a la cinética las conformaciones que participan activamente en la transferencia de electrones por asociación óptima con el sitio T1 (Mehra *et al.* 2018).

### 2.1.C.2 | Sistema lacasa - mediador

A finales de los años 70's (s. XX), investigaciones promovidas por la industria papelera acerca del bioblanqueo de pulpa, permitieron conocer más sobre la biodegradación de la lignina; como un proceso de naturaleza multienzimática y donde intervienen metabolitos aromáticos sintetizados por organismos degradadores, principalmente hongos (Eggeling 1983; Gutiérrez & Martínez 1996).

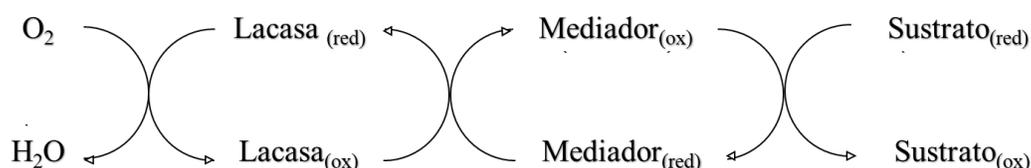


Figura 2-VIII Ciclo catalítico de un Sistema Lacasa Mediador. Elaboración propia basada en Christopher *et al.* 2014

Para 1983, estas bases permitieron encontrar a la lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14), constituyente enzimático principal de este proceso, así como establecer la función de otras enzimas como la lacasa que, por su baja especificidad de sustrato, se había relacionado principalmente con la oxidación de fragmentos fenólicos de la lignina para la formación de radicales fenoxi, involucrados en reacciones de condensación posteriores (Glenn *et al.* 1983; Tien & Kirk 1983).

Más tarde, en 1990, Bourbonnais & Paice encontrarían que se podía acoplar la actividad enzimática de la lacasa a la reactividad de mediadores, pequeños compuestos de bajo peso molecular con un alto potencial redox ( $> 900$  mV); formando así un sistema lacasa - mediador (LMS - del ingl. *Laccase-Mediator System*) capaz de oxidar la parte no fenólica de la lignina.

El primer mediador probado fue el 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS), considerado sintético; existiendo también mediadores naturales derivados de la lignina, como el siringaldehído y la vainillina. En la industria se han preferido a los mediadores sintéticos, sin embargo, se ha comenzado a apostar por los naturales por su menor impacto ambiental y bajo costo (Morozova 2007 b; Kunamneni 2007).

Los mediadores funcionan como transportadores de electrones entre la lacasa y el sustrato, idealmente deben poder ser oxidados y reducidos de manera cíclica sin inhibir la reacción ([Figura 22-VIII](#)). Se hipotetiza que cuando son oxidados por la lacasa se vuelven intermediarios altamente oxidantes (co - mediadores), que una vez fuera de su sitio activo, se reducen oxidando los sustratos que la enzima antes no podía, sea por tamaño, impedimento estérico o alto potencial redox. Los electrones tomados por las lacasas son finalmente transferidos nuevamente al oxígeno para formar peróxido de hidrógeno. (Morozova 2007 a; Datta *et al.* 2017)

Las aplicaciones de los LMS son tan amplias como los de la lacasa misma ([Véase 2.5](#)), sea en las industrias textil, cosmética, alimenticia, entre muchas otras, incluyendo a la del papel, precursora de su estudio (Rodríguez & Toca 2006).

## 2.2 | Lacasas fúngicas

Las lacasas fúngicas fueron descritas desde 1896, pero fue hasta el comienzo de los estudios de degradación enzimática de la madera por hongos de la podredumbre blanca, que éstas comenzaron a crear mayor interés. Actualmente, el registro de hongos productores de lacasas es amplio, diverso y generalmente relacionado con la degradación de lignina en el suelo ([Véase 2.1.A.1](#)) (Baldrían 2006).

En general, las lacasas fúngicas son proteínas globulares monoméricas de entre 60–70 kDa, con un punto isoeléctrico (pI) de pH 4.0, aunque existen varias excepciones. La mayoría son enzimas extracelulares generalmente glucosiladas, entre 10 y 25% y sólo en algunos casos superior al 30% (Piscitelli *et al.* 2010).

Dentro de los hongos productores de lacasa destacan hongos basidiomicetos y ascomicetos, sean filamentosos, levaduras, micorrizas o de la pudrición blanda, blanca y marrón, según el criterio de clasificación (Baldrían 2006; Lundell *et al.* 2010). De estos grupos destacan las lacasas de

basidiomicetos de podredumbre blanca por sus altos ORP ( $\epsilon_0 \approx 0.8$  V para el sitio T1), en comparación con ascomicetos con un  $\epsilon_0 = 0.4\text{--}0.7$  V (Haddad Momeni *et al.* 2019).

Comparando la estructura de las lacasas fúngicas, vegetales y bacterianas, se ha observado que todas conservan en común la presencia de tres dominios de cupredoxina, con el centro de Cu mononuclear en el dominio 3, donde aparentemente también se ubica el sitio de unión a sustrato. Sin embargo, las dos primeras parecen tener más similitud entre sí, respecto a las bacterianas, que se distinguen en las conexiones entre dominios y por la presencia de un bucle y una hélice corta en el sitio de unión a sustrato, lo que puede explicar la relación función–estructura de las lacasas y la diferencia de sus propiedades según su fuente (Dwivedi *et al.* 2011).

## 2.2.A | Lacasas de hongos termofílicos

Las condiciones de operación de muchos procesos industriales o aplicaciones biotecnológicas requieren de enzimas termotolerantes y termoestables, es decir, enzimas que mantengan su actividad catalítica y no se inactiven o desnaturalicen a altas temperaturas. Los microorganismos termofílicos son una excelente fuente de estas enzimas pues, en su adaptación a sus respectivos ambientes, se caracterizan por tener un óptimo crecimiento a temperaturas entre los 45°C y 80°C, siendo hipertermofílicos aquellos con una temperatura óptima de crecimiento cercana a 80°C, y mesofílicos aquellos con una por debajo de 45°C (Haki & Rakshit 2003; Salar 2018).

Estas características enzimáticas se han buscado sustentar a nivel molecular a partir de su estudio y comparación con otras no provenientes de fuentes termofílicas, encontrando que algunos factores fisicoquímicos relacionados son el empaquetamiento de las proteínas, la hidrofobicidad, un mayor número de pliegues helicoidales, la densidad de enlaces internos de hidrógeno y puentes salinos, la proporción de aminoácidos, así como la glicosilación; que también es importante en la sensibilidad a las proteasas y la conformación de proteínas (Hildén *et al.* 2009).

En general, los microorganismos termofílicos pertenecen a los dominios Bacteria y Archea, pero también existe una pequeña fracción en el dominio Eukarya, representada, entre otros, por hongos con una temperatura óptima de crecimiento entre 20° - 50°C, y que esporulan a 45°C (Cooney & Emerson 1964, citado en Stoll 2007), pero que puede extenderse hasta 62°C (Salar 2018).

Los hongos termofílicos se encuentran en distintos hábitats naturales o artificiales asociados a altas temperaturas; como son las regiones tropicales, las industrias donde se genera calor y sus

efluentes, o sitios donde se descompone materia orgánica por acción metabólica, sean montículos artificiales de composta o producto de la degradación natural en suelos; siendo estos últimos los principales sustratos para el aislamiento de estos hongos (Maheshwari *et al.* 2000; Salar & Aneja 2007; Salar 2018; De Oliveira & Rodriguez 2019).

Existen otras fuentes de enzimas fúngicas con propiedades interesantes como halotolerantes, alcalifílicas y psicrófilicas, provenientes respectivamente, de hábitats extremos como ambientes marinos y aguas profundas (dentro de esponjas), sitios hiperalcalinos y ambientes de bajas temperaturas. Además de líquenes, una asociación simbiótica entre hongos y cianobacterias, considerada como un ambiente extremo por la deficiencia de nutrientes (Prakash *et al.* 2019).

### 2.2.B | Asco-lacasas y *Thielavia* sp.

Como se ha mencionado antes, las lacasas fúngicas más exploradas son las de basidiomicetos (*basi-lacasas*), en comparación con las denominadas *asco-lacasas*, provenientes de ascomicetos, tanto así que, por ejemplo, existen diversos reportes sobre las estructuras cristalinas de las *basi-lacasas*, mientras que hasta el momento de la presente revisión, sólo se han obtenido 4 estructuras de *asco-lacasas* de los organismos *Melanocarpus albomyces*, *Aspergillus niger*, *Botrytis aclada* y *Thielavia arenaria*. Estas lacasas están caracterizadas por un grupo carboxilo terminal que apunta al centro trinuclear, en lugar de la superficie de la proteína, como ocurre en otras lacasas, aunque claro con diferencias estructurales debido a sus distancias evolutivas entre sí (Kallio *et al.* 2011, Mot & Silaghi-Dumitrescu 2012, Ernst *et al.* 2018).

De las especies anteriores, *M. albomyces* y *T. arenaria* son reconocidas como termófilicas, pero sólo de la primera abundan estudios en torno a lacasa, como su caracterización, purificación, expresión heteróloga y, claro, obtención de su estructura (Kiiskinen *et al.* 2002, Kiiskinen *et al.* 2004). Sobre *T. arenaria* y en general sobre *Thielavia* sp. hay escasa información en torno a lacasas. En los estudios más relevantes, se han realizado con cultivos identificados como *Thielavia* sp. (cepa HJ22), análisis de actividad de lacasas con la capacidad de remover colorantes textiles y compuestos fenólicos (Mtibaà *et al.* 2018, Mtibaà *et al.* 2019) (Tabla 2-I), así como con otras especies en cultivos aplicados para remoción de contaminantes y el fraccionado de compuestos de lignina (van de Pas *et al.* 2011, Ammann *et al.* 2013).

Es por lo anterior que este género representa un recurso biológico con amplio potencial biotecnológico aún por explorar, y en particular con las especies identificadas como termófilicas.

## 2.2.B | *Thielavia terrestris*

Tomando en cuenta que ascomicetos, deuteromicetos y zigomicetos se consideran termófilos verdaderos, y que sólo los dos primeros grupos son mayoritariamente productores de lacasas ([Véase 2.1.A](#)), el estudio de lacasas fúngicas termoestables y termotolerantes podría centrarse en las especies termofílicas de estos.

*Thielavia terrestris* ((Apinis) Malloch & Cain 1973), por ejemplo, es un hongo ascomiceto termofílico y filamentoso, que fue primero encontrado como teleoformo en suelos aluviales en Nottingham (Reino Unido), y posteriormente fue descrito su anamorfo<sup>3</sup>, *Acremonium alabamense* (Morgan-Jones 1974); estableciéndose su conexión en 1977 por Samson *et al.*

Acerca de su crecimiento, *T. terrestris*, tiene una temperatura mínima de crecimiento de 20°C, óptima de 45°C y máxima de 52°C. Morfológicamente, su ascoma se desarrolla debajo de la estera micelial lanosa, no ostiolada, esférica, lisa, negra y de 150-300 µm de diámetro, peridio marrón oscuro, con hifas unidas y superficie de textura epidermoidea, ascocarpos subglobosos a globosos de 100-200 µm de diámetro, con ascos de 14-20 X 6-8 µm y de 8 esporas por cada uno. Estas ascosporas son de forma ovoide, de coloración marrón oscura y de poro germinal apical y conidios en cadenas de conidióforos simples o poco ramificados, hialinos, ovoides a piriformes, lisos, unicelulares y de 3-5 X 1.5-2.5 µm. (Malloch & Cain 1973; Mouchacca 1999).

Este hongo destaca también por su capacidad de producción de enzimas termotolerantes de importante actividad conversora de biomasa; como son: xilanasas (Gilbert *et al.* 1993), glucoamilasas (Rey *et al.* 2003), cutinasas (Yang *et al.* 2012), glucuronil esterases (Tang *et al.* 2019), inulinasas, (Fawsi 2011) y celulasas (Gilbert *et al.* 1992; Rosgaard *et al.* 2006), por mencionar algunas.

Por otra parte, Berka *et al.* 2011, obtuvieron el genoma de la cepa NRRL 8126 de *Thielavia terrestris* (*Tht.* N-6) y lo compararon con el de la cepa ATCC42464 de *Myceliophthora thermophila*, además de la predicción de sus secretomas con 789 y 683proteínas, respectivamente.

---

<sup>3</sup> Algunos hongos se diferencian entre individuos por su forma de reproducción, por lo que son consideradas especies distintas, pese a que están relacionadas morfológica, bioquímica y genéticamente entre sí. Aquellos sin un ciclo sexual registrado se denominan anamorfos y se clasifican como deuteromicetos (*Deuteromycota*), mientras que sus contrapartes teleomorfas, son aquellas con un ciclo de reproducción específico, y se encuentran en diversos filos y géneros (Braus *et al.* 2002). Debe mencionarse que recientemente se han realizado clasificaciones taxonómicas que no reconocen a *Deuteromycota* como un filo real (Ruggiero *et al.* 2015).

## 2.3 | Genes de lacasa

La mayoría de los hongos reportados como productores de lacasas, lo son para más de una de estas, por lo que, a la fecha gracias a los trabajos de expresión y secuenciación, el total de genes de lacasa ha aumentado a varios cientos. Se ha comprobado de manera general que estos genes codifican isoformas proteicas de lacasa de entre 520 - 550 aminoácidos, incluyen una péptido señal N-terminal de secreción de 20 aminoácidos, cuatro regiones conservadas de Cys (cisteína) y diez de His (histidina), que forman un entorno de ligandos quelantes para iones de Cu ubicados en el sitio activo de la enzima. Cuentan también con intrones de 50–90 pb de longitud y se han reportado hasta 19 en Basidiomicetos y hasta 6 en Ascomicetos (Janusz *et al.* 2013).

### 2.3.A | Secuencias firma para lacasas

A partir de investigaciones enfocadas en el análisis de secuencias de aminoácidos de lacasas y otras MCO, desde finales de los años 80's (s. XX) y hasta la fecha, se han definido aún más sus propiedades a partir de patrones relacionados con su estructura tridimensional, principalmente con los sitios de Cu: T1, T2 y T3 (Figura 2-X).

En T1, se encontró de manera conservada la presencia de dos residuos de His y uno de Cys, como ligandos ecuatoriales del Cu de este sitio; al igual que un ligando axial que varía según la fuente de la enzima y que tiene efectos importantes sobre su ORP (Véase 2.1.C.1).

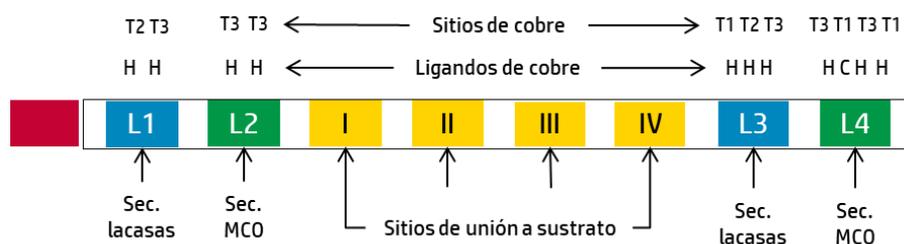


Figura 2-IX Estructura de lacasa a nivel de secuencia. Elaboración propia.

En el sitio T3, el Cu cuenta con ocho residuos de His como ligandos, en un patrón de cuatro secuencias HXH. Siendo X en una de estas secuencias, una Cys que se une al Cu del sitio T1 formando la ruta de transferencia de electrones al centro trinuclear. Estas secuencias se encuentran separadas por 25-175 residuos (Kües & Rühl 2011; Janusz *et al.* 2020). Así, con un total de 10 His y una Cys, los ligandos del Cu se alojan en cuatro secuencias firma altamente conservadas de al menos ocho residuos de longitud, denominadas L1, L2, L3 y L4:

L1	H-W-H-G-X <sub>9</sub> -D-G-X <sub>5</sub> -QCPI
L2	G-T-X-W-Y-H-S-H-X <sub>3</sub> -Q-Y-C-X-D-G-L-X-G-X- (FLIM)
L3	H-P-X-H-L-H-G-H
L4	G- (PA) -W-X- (LFV) -HCHI-DAE-X-H-X <sub>3</sub> -G- (LMF) -X <sub>3</sub> - (LFM)

Donde (según código IUPAC-IUB):

X = residuo indefinido	G = Gly, glicina	Q = Gln, glutamina
A = Ala, alanina	H = His, histidina	S = Ser, serina
C = Cys, cisteína	I = Ile, isoleucina	T = Thr, treonina
D = Asp, ácido aspártico	L = Leu, leucina	V = Val, valina
E = Glu, ácido glutámico	M = Met, metionina	W = Trp, triptófano
F = Phe, fenilalanina	P = Pro, prolina	Y = Tyr, tirosina

Considerando que antes de estas secuencias, se reportaron algunas similares a L1 y L3 en otras MCO, y que estas mismas secuencias, así como L2 y L4, comparten homología. Se han definido a L1 y L3 como secuencias firma para MCO, mientras que L2 y L4, al sólo haberse encontrado en lacasas, se han definidos como secuencia firma para éstas. También se han identificado en MCO cuatro regiones de unión a sustrato (I, II, III y IV), donde la lacasa ha mostrado poca relación con sus similares proteicos, aparentemente debido a su diversidad de sustratos (Messerschmidt & Huber 1990; Larrondo *et al.* 2003).

Adicionalmente, para las lacasas *sensu stricto* de hongos ascomicetos, se han propuesto como elementos distintivos la presencia conservada de un triángulo Ser-Asp-Ser/Ala (denominado como *SDS-gate*), un dominio DSGL/I/V (Asp Ser Gly Leu/Ile/Val) en el C-terminal y un residuo F/L (Phe/Leu) como ligando de coordinación axial del cobre T1 ([Véase 2.1.C.1](#)) (Hakulinen *et al.* 2008; Cázares-García *et al.* 2013).

### 2.3.B | Regulación de la expresión

La regulación de la expresión ocurre como respuesta de las células a cambios y estímulos en el medio, y señales de otras células, alterando la cantidad o el tipo de proteínas que expresan. Este conjunto de procesos se regula genéticamente por promotores, que determinan el nivel potencial máximo de expresión génica en la transcripción; operadores, que inhiben la transcripción; y elementos de control positivo, que son reconocidos por las proteínas activadoras que estimulan la transcripción en el promotor (Bertrand *et al.* 2013).

En amplio sentido, la expresión de genes de lacasa se regula de manera diferencial en respuesta a factores internos, siendo todos aquellos relacionados al microorganismo modelo (cepa,

etapa de crecimiento, promotor de lacasa, etc.), y a factores externos, todos aquellos relacionados al medio (composición, nutrientes, iones metálicos y xenobioticos, etc.) (Bertrand *et al.* 2013; Yang *et al.* 2017). No como se consideraba en un principio, atribuyendo la diferencia entre lacasas a modificaciones postraduccionales, sin embargo, varias especies de hongos poseen más de un gen codificante para lacasa, y con diversidad de secuencias moderadas.

Los fenómenos de regulación de lacasa son complejos y los mecanismos moleculares precisos a través de una variedad de elementos de acción *cis* sólo se conocen parcialmente (Piscitelli *et al.* 2011). En las secuencias promotoras de lacasa se han descrito regiones sensibles, que se creen capaces de regular las transcripciones de genes (Figura 2-IX), así como su número de copias en ácido ribonucleico mensajero (mRNA - del ingl. *messenger ribonucleic acid*). Estas contienen secuencias TATA y al menos un motivo CAAT, encargados de iniciar y controlar la transcripción, respectivamente. La posición de estas secuencias difiere entre genes y pueden relacionarse con regiones conservadas (Galhaup *et al.* 2002; Janusz *et al.* 2013).

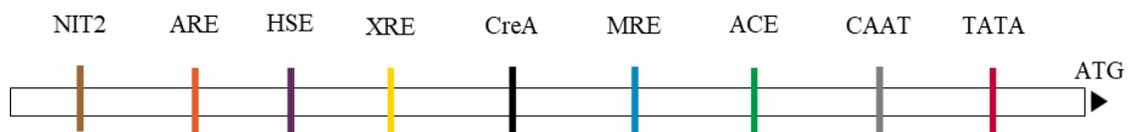


Figura 2-X Elementos de regiones promotoras para lacasas

Dentro de estas regiones se han identificado varios elementos que actúan en *cis* en las regiones promotoras de lacasa, como el elemento de respuesta a metales (MRE – del ingl. *metal response element*), los sitios de unión al factor de transcripción sensible al cobre (ACE1 – del ingl. *Cooper-Dependent Transcription Factor*), los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE – del ingl. *xenobiotic response elements*), los elementos de respuesta a antioxidantes (ARE – del ingl. *antioxidant response elements*), los elementos de respuesta a choque térmico (HSE – del ingl. *heat shock response elements*), el elemento de respuesta a la represión por nitrógeno (NIT2 – del ingl. *nitrogen catabolic enzyme regulatory protein*) y los sitios de unión a los elementos de respuesta al catabolismo (Cre – del ingl. *catabolite responsive element*), mediada por cAMP (Adenosín monofosfato cíclico), y de los cuales CreA es el más conocido.

Las secuencias de lacasa MRE se adhieren a la región consenso TGCRNC, mientras que las secuencias XRE tienen secuencias menos conservadas T / GCG / AT / CGC / G y NGAAN repetidas en cualquier orientación para HSE. El sitio CreA participa en la represión de glucosa y se conserva

estrictamente entre los hongos y requiere un sitio de unión de la caja GC con las secuencias consenso SYGGGG y SYGGRG. El NIT2, que activa la expresión de muchos genes estructurales durante condiciones de limitación de nitrógeno, contiene copias de secuencias GATA que se encuentran dentro de 30 pb entre sí y el sitio de unión de NIT2 con consenso adherido a la secuencia TATCDH (Janusz *et al.* 2013; Yang *et al.* 2017).

### 2.3.C | Secreción

Se suele denominar secretoma a todas aquellas enzimas extracelulares, incluida la lacasa, que en hongos permiten adaptar su metabolismo a diferentes fuentes de carbono (C) y nitrógeno (N), por ejemplo mediante la degradación de las lignocelulosas y otros biopolímeros.

Para ser excretadas, las lacasas requieren al menos tres pasos de procesamiento: co-traducción de plegamiento en el retículo endoplásmico, incorporación de una secuencia precursora (glucosa 3 manosa 9-glucosa-N acetilglucosamina<sub>2</sub>) que se une con la asparagina (Asp) de la mayoría de las secuencias NXT/S de la proteína, y unión a iones de calcio (Ca) que estabilizan la apolacasa resultante. Posteriormente, en el aparato de Golgi, se añaden los iones de Cu junto con carbohidratos adicionales antes de la secreción.

Las lacasas también contienen una secuencia de secreción N terminal abundante en arginina y lisina. No todas las lacasas son extracelulares, algunas otras se han encontrado localizadas en la pared celular y el citoplasma (Bertrand *et al.* 2013).

### 2.3.D | Análisis: RT-qPCR

Desde su descubrimiento y desarrollo en los 80's (s. XX), la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR – del ingl. *Polymerase Chain Reaction*), se ha adaptado para numerosas aplicaciones de Biología Molecular. El análisis de expresión génica por PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR) ha sido una tecnología habilitadora clave de la era posterior al genoma. Toma como base, primero una reacción de PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR – del ingl. *Reverse Transcriptase PCR*), donde se parte de RNA como molde y se sintetiza DNA complementario (cDNA – del ingl. *Complementary DNA*) mediante retrotranscripción y luego amplificación de la primer hebra de cDNA; y posteriormente un determinado número de reacciones de PCR cuantitativa (qPCR – del ingl. *quantitative PCR*), también conocida como PCR en tiempo real (del ingl. *real time PCR*), que permite amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de dicha amplificación y para

lo cual se utilizan reporteros fluorescentes; siendo uno de los más comunes SYBR Green, un colorante que después de la replicación mediada por cebador de la secuencia objetivo durante la PCR, se une al producto y emite una señal fluorescente detectable.

La cuantificación se puede hacer de manera absoluta, obteniendo la cantidad exacta de moléculas de cDNA por comparación con una curva estándar, o de manera relativa comparando una muestra control con la muestra a analizar. En el caso de la cuantificación relativa es necesario analizar tanto los genes de referencia (*housekeeping*) con expresión constitutiva como los genes de interés. Siendo utilizado para ello comúnmente el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , que emplea valores de CT (del ingl. *cycle threshold*) correspondiente al número de ciclo de PCR en el cual la fluorescencia detectada se puede diferenciar del ruido de fondo. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de DNA inicial y es característica de cada una de las reacciones (VanGuilder *et al.* 2008; Becker *et al.* 2010; EMBL-EBI 2016; Taylor *et al.* 2019).

## 2.4 | Producción de lacasas

Dadas sus propiedades y su amplio potencial de aplicaciones ([Véase 2.5](#)), la optimización y aumento de la producción de lacasa, ha atraído el interés de muchas investigaciones, que aunado al aislamiento de productores naturales, han probado el mejoramiento mediante cocultivos o técnicas de tipo molecular para aumentar no sólo la producción de lacasa y sino también su actividad (Yang *et al.* 2017) (*vide infra*).

### 2.4.A | Cultivo

Como factores principales de la regulación de la expresión de lacasas, destacan las fuentes y concentraciones de nutrientes presentes en los medios de cultivo, sea C, N o microelementos. La relación óptima entre las fuentes de C y N para la producción de lacasas varía según el organismo productor, así, algunos reportes mencionan altas actividades enzimáticas en cultivos con altas relaciones C/N, mientras que otros reportan mayores actividades enzimáticas ante una relación C/N baja. De manera similar, se ha reportado que la producción de lacasas se desencadena con el agotamiento de N, sin embargo, otros estudios reportan que el N no presenta efecto sobre la actividad enzimática.

En general, las fuentes de N orgánicas dan altos rendimientos de biomasa y en comparación, las fuentes inorgánicas conducen a bajos niveles de lacasa y suficiente producción de biomasa.

Además se han reportado al extracto de levadura y el aminoácido L-asparagina (Asn), como buenas fuentes de N que aumentan el rendimiento de la enzima. En cuanto a la glucosa y sacarosa, como fuente de C, se ha reportado un efecto inhibitorio cuando se agrega en exceso, pues permite la producción constitutiva de la enzima, pero reprimen su inducción (Gochev & Kratanov 2007; Brijwani & Vadlani 2010; Senthivelan *et al.* 2016).

En una misma tendencia, condiciones como la temperatura y tiempo de incubación también varían entre especies, como ocurre con los microorganismos termofílicos que tienen temperaturas de crecimiento óptimas cercanas y por encima de 45 °C, muy diferentes a otros organismos productores de lacasa. El potencial de Hidrógeno (pH), si bien, tampoco está definido, muchos reportes concuerdan en un pH 4.5 - 6.0 en el medio antes de la inoculación, que, aunque no se mantiene, permite el crecimiento del hongo y la producción de lacasa. (Gochev & Kratanov 2007; Muthukumarasamy & Murugan 2014).

#### 2.4.A.1 | Escala biorreactor

La producción de lacasas a nivel biorreactor suele dificultarse por las variaciones reológicas generadas por diferentes tipos de morfología fúngica que afectan la transferencia de masa y la productividad, aunque se ha encontrado que la producción de altos títulos de lacasa no depende de altos rendimientos de biomasa (Gochev & Kratanov 2007).

La producción de lacasa se puede efectuar mediante varios modos de fermentación, como la fermentación sumergida y en estado sólido.

Fermentación sumergida (SMF - del ingl. *Submerged fermentation*): Implica el cultivo de microorganismos en medio líquido con un contenido rico de nutrientes requeridos, así como otras condiciones, como oxígeno. En este tipo de fermentación debe de considerarse la viscosidad del líquido tras el crecimiento de hongos y la transferencia de masa.

Fermentación sólida (SSF - del ingl. *Solid-state fermentation*): Implica la ausencia o reducción de líquido en el cultivo, con un sustrato sólido inerte sea sintético o natural. Como sustratos naturales se han utilizado residuos agrícolas lignocelulósicos, que por su contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa actúan como inductores naturales y por también contener azúcares, promueve el crecimiento de hongos. Este tipo de fermentación resulta adecuado porque imita las condiciones naturales de crecimiento para hongos filamentosos (Couto & Toca-Herrera 2007; Brijwani & Vadlani 2010; Yang *et al.* 2017).

Es importante, también considerar el modo de operación de los biorreactores (intermitente, continuo o semicontinuo), por ejemplo, mientras que algunos reportes apuntan a que la agitación puede dañar el micelio del hongo y disminuir su producción; otros reportes mencionan excelentes resultados en tanques agitados, con enzimas previamente inmovilizadas, y otros encontraron irrelevancia de la agitación en la producción (Brijwani & Vadlani 2010).

## 2.4.B | Inducción

En hongos las lacasas generalmente se producen en bajas concentraciones, mejorándose los rendimientos con la adición de suplementos a los medios, afectando así el metabolismo y/o la tasa de crecimiento de las fuentes, como respuesta desarrollada contra compuestos tóxicos. Algunos de los compuestos xenobióticos suplementarios más utilizados son compuestos fenólicos y aromáticos como xilideno, lignina, alcohol veratrílico e incluso etanol y celobiosa, cuyo efecto inductivo depende de sus estructuras moleculares, concentración y tiempo de adición a los cultivos (Gochev & Kratanov 2007; Brijwani & Vadlani 2010; Píscitelli *et al* 2011).

Se ha comprobado que los iones metálicos, como plata (I) ( $\text{Ag}^+$ ), manganeso (II) ( $\text{Mn}^{+2}$ ), y principalmente cobre (II) ( $\text{Cu}^{+2}$ ), tienen efectos sobre la expresión a nivel transcripcional en diversos hongos, los dos primeros como moduladores de la transcripción, y el último como inductor y también disminuye la actividad proteolítica extracelular, por lo tanto deteriorando la degradación de lacasa. Es importante señalar que el mismo metal puede ejercer efectos opuestos en diferentes especies de hongos y que la inducción varía según el organismo y parece ser específica de ciertos compuestos aromáticos. (Píscitelli *et al* 2011).

### 2.4.B.1 | Inducción por cobre

De acuerdo con diversos reportes, se ha relacionado a las MCO en la homeostasis del Cu, por ejemplo, en *Aspergillus fumigatus*, las lacasas se han visto implicadas como factor de virulencia en la aspergilosis, donde utilizan al Cu como cofactor (Antsotegi-Uskola *et al.* 2019).

Como otra respuesta a la presencia de iones de Cu en el medio, se ha comprobado que la adición a los medios de cultivo de bajas concentraciones de cobre, por ejemplo, en forma de sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4$ ), estimula la producción de lacasa en los hongos productores y la actividad de la enzima, por tener también un efecto regulador en los niveles de mRNA de genes codificantes para lacasa (Gochev & Kratanov 2007; Vrsanska *et al.* 2016).

A nivel molecular, los sitios de unión al factor de transcripción sensible al Cu, como ACE1 en *P. brumalis* o CUF1 en *C. neoformans*, representan el elemento regulador mejor entendido en la región promotora de la lacasa, que al interactuar con iones de Cu durante la inducción, aumenta su expresión. Por otra parte, se ha registrado que cuando los iones de Cu no cumplan una función inductora, estos estabilizan el centro catalítico de la enzima que contiene Cu. La regulación por Cu es analoga al efecto del Mn en la expresión del gen *mnp* de la MnP (manganeso peroxidasa) a través de los MRE que se ajustan a la secuencia consenso, TGCRNC, propia de promotores de genes de metalotioneína (MT) en eucariotas superiores, y que se caracteriza por operar mediante un sistema de un sólo componente, donde una proteína metaloreguladora intracelular única funciona como receptor de metal y como factor de transcripción en trans (Collins & Dobson 1997; Yang *et al.* 2017).

#### 2.4.C | Inmovilización

La inmovilización celular es una técnica que busca contrarrestar los problemas asociados a la viscosidad del caldo y la transferencia de oxígeno y masa en cultivos líquidos, aumentando la vida útil de la enzima al unirla a un soporte insoluble, haciéndola más resistente ante las condiciones de operación (pH, temperatura, agitación, inhibición, etc.), aunque generalmente a costa de la disminución de su actividad específica y volumétrica, la flexibilidad enzimática, el impedimento estérico y las limitaciones de difusión (Brijwani & Vadlani 2010; Yang *et al.* 2017).

Para las lacasas fungicas, los reportes de inmovilización son tan diversos como lo son los materiales de soporte, los cuales están recientemente enfocados en las innovaciones tecnológicas de nanomateriales y la creación de materiales resistentes a condiciones extremas (Brijwani & Vadlani 2010; Fernández-Fernández *et al.* 2013; Yang *et al.* 2017).

Los métodos de inmovilización de lacasas las comunes son: atrapamiento, encapsulación, adsorción, unión covalente y autoinmovilización.

El primero consiste en la retención de las enzimas sobre una matriz sólida porosa (*e.g.* poliacrilamida, colágeno, alginato o gelatina); en el segundo, la enzima queda aislada del medio dentro de un soporte, por lo que la transferencia de masa se ve limitada, a menos que se encapsulen en materiales semipermeables (*e. g.* polietilenimina y SiO<sub>2</sub>).

La adsorción, por su parte, se sustenta en las fuerzas de atracción entre el soporte y la enzima, la hidrofobicidad de la superficie de soporte y el pH y la fuerza iónica del medio. De manera

similar, en la unión covalente, los grupos químicos de la superficie del soporte reacción con los grupos nucleofílicos de la proteína, generalmente lisina (Lys), formando enlaces covalentes.

Por último, la autoinmovilización se basa en el uso de reticuladores bifuncionales (e. g. cristales enzimáticos reticulados (CLEC – del ingl. *cross-linked enzyme crystals*) o los agregados enzimáticos reticulados (CLEA – del ingl. *cross-linked enzyme aggregates*), donde se requieren enzimas de alta pureza para su posterior cristalización o precipitación (Fernández-Fernández *et al.* 2012).

#### 2.4.D | Ingeniería

Las lacasas más utilizadas en la industria provienen de hongos, logrando altos rendimientos en enzimas reactivas por vía nativa en producción optimizada. Sin embargo, con regularidad se producen isoformas con propiedades muy similares entre sí, lo que dificulta la purificación de estas, obstáculo que la producción recombinante supera, incluyendo su producción, que puede optimizarse mediante el uso de un promotor fuerte adecuado y una secuencia de señal que dirija la enzima a los medios de cultivo (Figura 2-XI) (Antošová & Sychrová 2015).

La actual predominancia de las proteínas recombinantes en la industria está basada en el aumento de la producción de éstas en huéspedes de fácil manejo, sea por ser de fácil cultivo, no patógenos y/o generalmente reconocidos como seguros (GRAS – del ingl. *Generally Recognized as Safe*), en comparación con sus contrapartes nativas; además de reducir tiempos y costos en los procesos, como la purificación. A su vez el éxito de producir eficientemente lacasas en un huésped heterólogo depende en gran medida de la naturaleza de los cambios introducidos en el DNA original o la secuencia de aminoácidos (Piscitelli *et al.* 2010).

Los sistemas de expresión para lacasas más comunes son:

Levaduras (e. g. *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*): por su rapidez de crecimiento, facilidad de manipulación microbiana y genética, capacidad de realizar modificaciones postraduccionales específicas de eucariotas, como el procesamiento proteolítico, la formación de puentes disulfuro y la glicosilación.

Hongos filamentosos (e. g. *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Trichoderma reesei*): por su alta capacidad natural de secreción al medio, mejores rendimientos (mg/l) en comparación con levaduras.

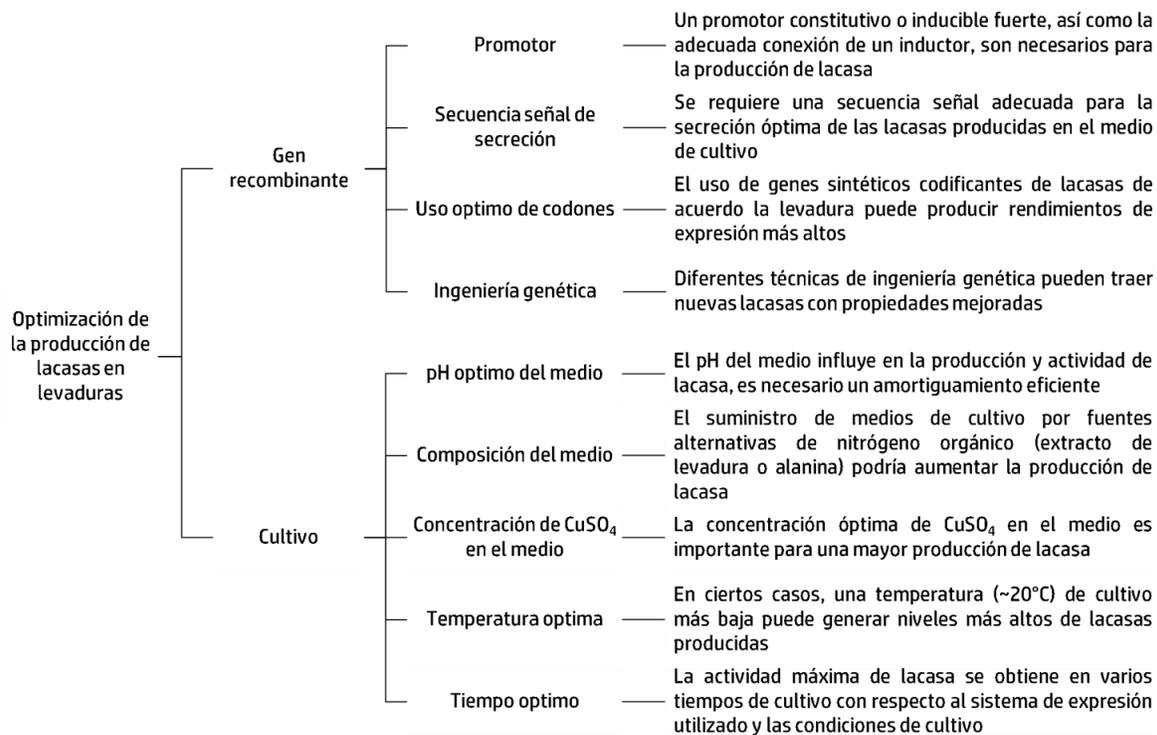


Figura 2-XI Descripción general de los enfoques para optimizar los niveles de lacasas activas secretadas por levaduras. Traducido de Antořová & Sychrová 2015.

Así mismo, también se han utilizado como sistemas de expresión a otros organismos como plantas e insectos. En plantas destacan *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Oryza sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Saccharum officinarum* y *Zea mays*, obteniéndose plantas resistentes a bacterias patógenas o con la capacidad de degradar compuestos fenólicos, gracias a la expresión de lacasas. En cuanto a insectos, el estudio y determinación de la presencia de lacasas y sus funciones fisiológicas, fue posible gracias a su expresión en baculovirus (Piscitelli *et al.* 2010; Robert *et al.* 2011; Antořová & Sychrová 2015).

La disponibilidad de estos sistemas de expresión recombinante para lacasas y sus isoenzimas, ha permitido desde los años 90's (s. XX) su ingeniería, con el objeto principal de profundizar el conocimiento de las relaciones de función - estructura y mejorar, según necesidades industriales específicas, varias características enzimáticas, como estabilidad, actividad, especificidad, parámetros bioquímicos y/o catalíticos (Figura 2-XII). La mutagénesis (racional o aleatoria), junto a otras técnicas como fusión, delección, marcado (*tagging*) y barajado (*shuffling*) de dominios, han sido descritas en lacasas para generar variantes, ya sea en levaduras o en hongos filamentosos (Piscitelli *et al.* 2010; Robert *et al.* 2011).

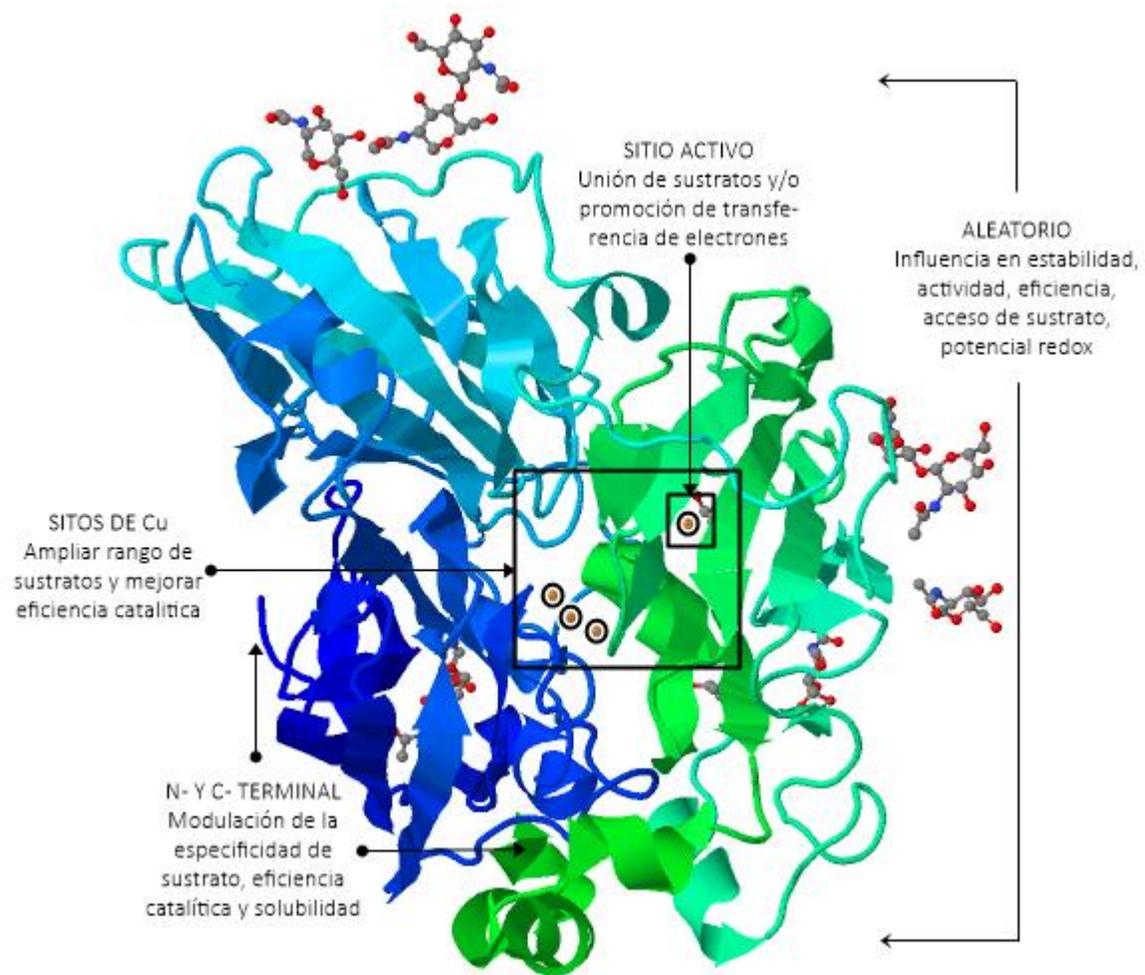


Figura 2-XII Regiones objetivo para mutaciones de lacasa. Elaboración propia basada en Stanzione *et al.* 2019 y modificado de Protein Data Bank (código 1GYC). Lacasa de *Trametes versicolor* (TVL).

A estas técnicas, también se puede incluir la producción quimérica de lacasas, siendo la primera de estas enzimas descrita en 2009, fusionando una lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* con el conector C-terminal y el módulo de unión a carbohidratos de la celobiohidrolasa B de *Aspergillus niger*, mismo organismo donde fue producida (Ravalason *et al.* 2012).

Con la incorporación de herramientas informáticas que permiten pronosticar confiablemente las regiones enzimáticas específicas que se mutarían, las investigaciones recientes han tendido a la combinación de un enfoque computacional con validación experimental, que ha dado buenos resultados (Stanzione *et al.* 2019). Por ejemplo, la ingeniería *de novo* para nuevas proteínas, permite el diseño de sistemas complejos en biología sintética, incluso basados en datos cristalográficos y en la mecánica molecular (Glykys *et al.* 2011).

## 2.5 | Investigaciones y aplicaciones

Las comprobadas propiedades de las lacasas como biocatalizadores para una amplia diversidad de reacciones, así como su capacidad de acoplarse para muchas otras mediante Sistemas Lacasa-Mediador, junto a tecnologías cada vez más innovadoras y sustentables, han priorizado su aplicación en distintos campos, buscando así reemplazar agentes químicos de mayor riesgo y establecer nuevos y más eficientes procesos. Esto es perceptible en las investigaciones en la materia al igual que en la oferta de estas enzimas o sus derivados como producto de consumo (Figura 2-XIII-d). Actualmente hay reconocidas compañías productoras de lacasas, entre las que destacan Novozymes (Dinamarca), Genencor Inc. (Estados Unidos), Lignozym GmbH (Alemania), Zytex Biotech Pvt. Ltd. (India) y Season Bio-Chemicals Ltd. (China), cuyo principal mercado se encuentra en el sector textil, papelerero y alimenticio.

Las investigaciones en torno a las aplicaciones de lacasas siguen una tendencia similar de acuerdo con las industrias a las que están orientadas; destacan la textil, alimenticia, papelerera, farmacéutica y cosmética, así como otras dedicadas a la biorremediación, biocombustibles y biosensores. Según el número de reportes (hasta 2016), el campo más investigado es el medioambiental (29%), seguido por el de biosensores (22%), textiles (20%), papel (11%), alimentos (10%), síntesis orgánica (4%) y otros (4%, biocombustibles, paneles de fibra, cosméticos y pinturas) (Osma *et al.* 2010; Mate & Alcalde 2016; Moreno *et al.* 2019).

### 2.5.A | Industria química y bioquímica

El uso más directo que se puede encontrar para las lacasas es el de biocatalizador, siendo utilizadas en una amplia gama de reacciones cuyo interés reside en el producto obtenido, algunos ejemplos son: reacción de Diels-Alder para la síntesis de *orto* y *para* naftoquinonas, reacción tipo Michael de oxidación en cascada para la síntesis de benzofuranos,  $\alpha$ -arilación de acetonitrilo de benzoilo, acoplamiento de catecol y aminas aromáticas con un sistema cocatalítico de lacasa-lipasa, y síntesis de 2,3-etilenditio-1,4-quinonas (Cannatelli & Ragauskas 2016).

Otro ejemplo, lo encontramos en los polímeros, pues esta enzima logra la formación inicial de radicales a partir de un sustrato, entonces, estos radicales pueden sufrir reacciones de polimerización hacia materiales homopoliméricos. A pesar de esta capacidad comprobada, la implementación a corto plazo de la síntesis de polímeros mediada por enzimas aún no se reportaba viable económicamente (Burton 2003; Pezzella *et al.* 2015).

Dentro de las reacciones mediadas por lacasas, también se han descrito algunas cuyos productos son considerados como de valor agregado, como en reacciones de oxidación de flavonoides (*e. g.* catequina) obteniendo polímeros con una mayor actividad antioxidante. También se pueden obtener sustituyentes de urishiol natural para la elaboración de laca a partir de derivados de catecol en reacciones *in vitro*; en reacciones con poliestireno sulfonado mediadas por oxidorreductasas pueden obtenerse polímeros conductores, como la polianilina (PANI), incluso se ha logrado sintetizar por polimerización oxidativa de 4-fluoroguaiacol en presencia de disolventes orgánicos, un material fotoluminiscente con emisiones en azul, verde y rojo, con muchas potenciales aplicaciones (Pezzella *et al.* 2015; Senthivelan *et al.* 2016).

### 2.5.B | Industria alimenticia

En esta industria, las lacasas son utilizadas principalmente en productos horneados, procesamiento de jugos y vinos. En los productos horneados esta enzima da mayor resistencia a la estructura del gluten en la masa, obteniendo un producto más suave, y mejora la panificación con harina de avena para productos para celíacos (Brijwani *et al.* 2010).

De acuerdo con diversos estudios, en el procesamiento de jugos y vinos, e incluso cerveza, la lacasa puede ser utilizada para la estabilización del color y aroma del producto, removiendo fenoles y polifenoles naturales de este, ya que al oxidarse producen cambios indeseables en sus características organolépticas (Brijwani *et al.* 2010; Osma *et al.* 2010).

Es importante recalcar que, paradójicamente, en el caso de algunos vinos, las lacasas y otras fenoloxidasas, como la tirosinasa, son predominantemente indeseables durante el macerado, dado que una vez que se destruye la integridad de las bayas y son expuestas al aire, estas enzimas oxidativas alteran la composición fenólica final mediante un pardeamiento enzimático (Claus & Mojsov 2018). Por otra parte, la presencia de lacasas suele estar asociada a uvas demasiado maduras infectadas por *Botrytis cinerea* (infección denominada "podredumbre noble"), dando lugar a vinos botritizados (**Figura 2-XIII-c**) con un contenido de azúcar residual mayor o menor y una composición aromática única que los vuelve especiales (Magyar & Soós 2016).

Las lacasas también se han relacionado con la obtención de productos de valor agregado para la industria alimenticia, como la pectina de remolacha azucarera (SBP- del ingl. *Sugar beet pectin*) y emulsificantes como la proteína aislada del suero de la leche (WPI – del ingl. *Whey protein isolates*) (Senthivelan *et al.* 2016).

## 2.5.C | Industria papelera

En la industria del papel, la lacasa se utiliza principalmente para el blanqueo de pulpa, ya que esta enzima puede despolimerizar la lignina y deslignificar las pulpas de madera, reduciendo así el uso de productos químicos a base de cloro y la generación de compuestos alifáticos y aromáticos clorados que podrían ser cancerígenos, mutagénicos y tóxicos (Widsten & Kandelbauer 2008; Upadhyay y Agrawai 2016; Christopher *et al.* 2014; Singh & Arya 2019).

Es en este campo, donde el LMS es altamente apreciado, ya que incluso fue por investigaciones de esta industria que dicho sistema fue descrito por primera vez (ver 2.1.C.2). Uno de los primeros sistemas implementados fue Ligozym, donde se acoplo la lacasa y compuestos con grupos  $-NO$ ,  $-NOH$  o  $HRNOH-$  para la deslignificación (Call & Mücke 1997; Kunamneni *et al.* 2008 b).



Figura 2-XIII Ejemplos de productos relacionados con lacasa: a) Chaqueta de mezclilla de H&M decolorada con lacasa; b) Tratamiento capilar Link-D con lacasa como parte de sus ingredientes activos; c) Chateau d'Yquem, vino botritizado francés; d) Producto a granel de Novozymes, uno de los principales productores de enzimas para uso industrial. Tomado de H&M, Linkl-D, Yquem, Novozymes.

## 2.5.D | Industria cosmética

En el campo cosmético, las lacasas se han aplicado para tratamientos aclaradores de la piel, removiendo incluso manchas derivadas de melanina, además de utilizarse como catalizador en la síntesis de productos como tintes capilares y en la formulación de desodorante, pasta dental, enjuague bucal, detergente y jabón (Figura XIII-b) (Pezzella *et al.* 2015; Upadhyay & Agrawai 2016).

### 2.5.E | Industria textil

En la industria textil, las lacasas se han incorporado en procesos como el blanqueo y teñido de fibras (**Figura 2-XIII-a**), resultando ser una alternativa más ecológica respecto a los procesos tradicionales. En el blanqueo, se utilizan para la eliminación de pigmentos naturales e impurezas celulósicas antes del teñido de fibras, donde las lacasas participan en la síntesis *in situ* de colorantes. Las lacasas también se han aplicado en la modificación de fibras proteicas, como la lana y el algodón, mejorando sus propiedades originales, haciéndolas repelentes al agua (Pezzella *et al.* 2015).

### 2.5.F | Industria médica y farmacéutica

Parte de los productos generados por síntesis mediada por lacasas son anestésicos, antimicrobianos, desintoxicantes, antiinflamatorios, antibióticos o sedantes, por lo que esta enzima se encuentra en investigación para la síntesis de compuestos como los antibióticos mitomicina, cefalosporinas y vinblastina (droga contra el cáncer), por mencionar algunos. Adicionalmente, algunos reportes han relacionado a las lacasas con la síntesis de prostaglandinas, importantes mediadores inflamatorios; así como en la inhibición de la proliferación de líneas celulares de leucemia y hematoma humano, y la reducción de la actividad de la transcriptasa inversa del VIH-1 (Upadhyay & Agrawai 2016)

En este mismo sentido, las lacasas obtenidas de extractos de hongos han sido investigadas por su actividad anticancerígena, en concreto contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y la línea celular de carcinoma hepatocelular hepático Hep-G2, y aún más importante, fue capaz de matar selectivamente las células cancerosas sin causar daño a las células normales (Guest & Rashid 2016).

### 2.5.G | Biosensores

Gracias a su amplia especificidad de sustrato y catálisis de reacciones de transferencia de electrones sin cofactores adicionales, éstas han sido empleadas para la detección de un amplio rango de fenólicos, oxígeno o azidas, presentes en contaminantes ambientalmente importantes, metabolitos clínicamente relevantes. Esta capacidad de detección acoplada a nanomateriales ha permitido crear biosensores para compuestos en té y vino, así como la detección de neurotransmisores como dopamina, epinefrina y norepinefrina, por citar algunos ejemplos (Upadhyay & Agrawai 2016; Yasha *et al.* 2018).

## 2.5.H | Biorrefinerías

En la producción de biocombustibles, las lacasas, en particular las termoestables, e incluyendo los LMS, pueden contribuir en una mayor utilización de la biomasa lignocelulósica, ya sea modificando y/o eliminando parcialmente la lignina de la biomasa pretratada y mediante la oxidación selectiva de compuestos fenólicos, mejorando así la posterior hidrólisis enzimática de los carbohidratos y reduciendo la carga de enzimas hidrolíticas para su correcta valoración. Esto según métodos más recientes como el *ligning-first biorefinery*, enfocado en evitar la condensación de lignina sin comprometer la integridad estructural de los carbohidratos, en comparación con otros métodos que no atienden la propensa degradación irreversible de la lignina que genera estructuras recalcitrantes (Renders *et al.* 2017; Liu *et al.* 2019; Sharma *et al.* 2019; Moreno *et al.* 2020).

## 2.5.I | Biorremediación

La biorremediación es un proceso basado en el uso de plantas, microorganismos o sus partes para degradar compuestos xenobióticos en una matriz ambiental, transformándolos en sustancias menos o no tóxicas, y en comparación con otros métodos físicos o químicos, se considera más seguro, barato y eficiente. Dentro de los organismos utilizados, destacan los hongos por soportar condiciones de estrés, y por poder inducirse mediante diversas fuentes de carbono.

En suelo, se utilizan en su mayoría hongos basidiomicetos, cuyas enzimas, como la lacasa, pueden degradar compuestos considerados contaminantes en esta matriz como clorofenoles, nitrofenoles e hidrocarburos poliaromáticos, (Guimarães *et al.* 2017).

En aguas residuales, las lacasas han obtenido buenos resultados en la remoción de contaminantes de aguas residuales de algunas industrias en particular, como la alimenticia, con aguas con predominancia de residuos orgánicos y azúcares; textil, para la remoción de colorantes (antraquinonas); y farmacéutica, con contaminantes emergentes como los antibióticos (penicilinas, tetraciclinas, sulfonamidas, quinolonas y trimetoprima) (Strong & Burgess 2008 a & b; Brijwani *et al.* 2010; Kant 2012; Guimarães *et al.* 2017; Yang *et al.* 2017; Arıkan *et al.* 2019; Unuofin *et al.* 2019).

En ambientes naturales, se han implementado sistemas de reacciones de humificación mediadas por lacasa (L-MHRs – del ingl. *laccase-mediated humification reactions*) para la remoción de estrógenos, contaminantes orgánicos no degradables (Chen *et al.* 2019).

Mención especial en la biorremediación merece la ingeniería de proteínas, que ha permitido enriquecer el catálogo de lacasas altamente eficientes y con propiedades biotecnológicas personalizadas, viéndose buenos resultados en la remoción de contaminantes, incluidos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), colorantes recalcitrantes, disruptores endocrinos (EDC) y compuestos organofosforados, todo a través de la combinación de la evolución de laboratorio con estrategias racionales y semi-racionales (Piscitelli *et al.* 2010; Stanzione *et al.* 2019).

Por último, si bien, las investigaciones en torno a las lacasas han permitido aumentar el conocimiento acerca de estas enzimas y su aplicabilidad, hoy en día su potencial completo está sin explotar, por ello bien vale la pena hacer una retrospectiva de los enfoques desde su primer reporte en 1883 hasta nuestros días, pudiendo encontrar cuatro *eras* en la producción de lacasas, actualmente con una perspectiva mucho más ecológica y sustentable (Figura 2-XIV y Tabla 2-I).

1. Búsqueda de fuentes naturales para la obtención de lacasas con características deseables e inmovilización de enzimas para mejoramientos en costos y desempeño.
2. Producción recombinante homóloga y heteróloga para aumentar rentabilidad.
3. Ingeniería de proteínas para mejorar características y dotar de propiedades específicas.
4. Metagenómica para identificar nuevas enzimas de fuentes no cultivables e incorporación de diseños más robustos soportados por un enfoque computacional (Stanzione *et al.* 2019).

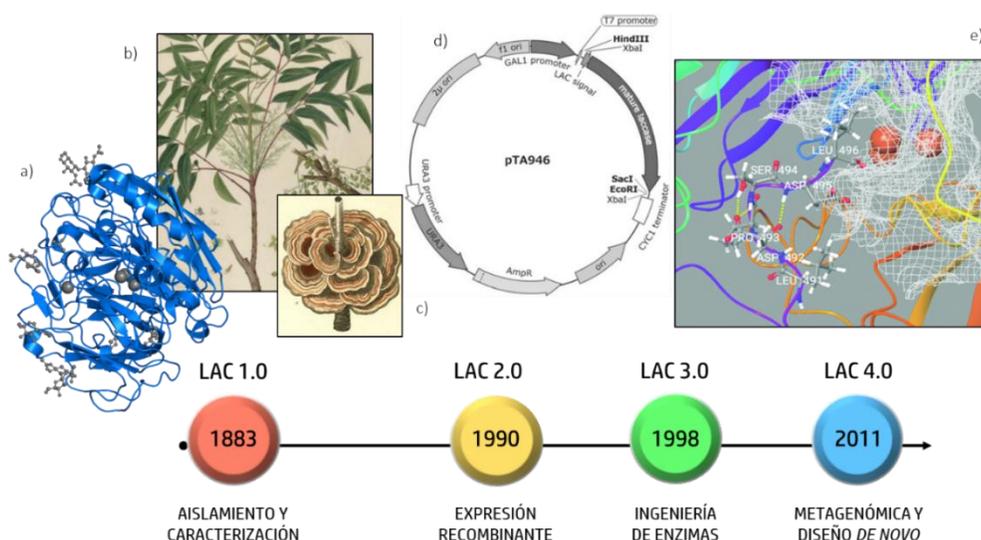


Figura 2-XIV Evolución de las investigaciones sobre lacasas. Elaboración propia basada en Stanzione *et al.* 2019. a) Estructura tridimensional de lacasa de *Trametes versicolor*, b) Ilustración de *Toxicodendron vernicifluum*, c) Ilustración de *Trametes versicolor*, d) Mapa del plásmido de expresión pTA946 para la expresión de lacasa de *Trametes versicolor* en *Saccharomyces cerevisiae*, e) Representación tridimensional de una sustitución hidrofóbica en la estructura de una lacasa. Obtenido de Protein Data Bank in Europe, Huang 2017, Biodiversity Heritage Library. Iimura *et al.* 2018, Santiago *et al.* 2016.

Tabla 2-I Publicaciones sobre investigaciones y aplicaciones de lacasas fúngicas desde 1974 a 2020

FTE	CCF	LAB	ORG	M PROD	COND	A ENZ +PM	P CIN +PI	APLI	REF	
<i>Myceliophthora thermophila</i>	A	T	 RS	CM DK	Exp. heteróloga en <i>Aspergillus oryzae</i> <b>INM</b> en nanopartículas de sílice	pH 6.8	L: 1220 IU/ml I: 13.1 IU/mg prot.	X	Degradación de lindano	Bebić <i>et al.</i> , 2020
<i>Fusarium oxysporum</i>	D	PV	 PL	CA ES	Exp. heteróloga en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y diseño de una nueva enzima mediante mutagénesis aleatoria y técnicas de saturación del sitio	pH R: 3 M1&2: 4 T 40 °C	R: 6.23 U/mg M: 35.4 U/mg	Kcat/Km R: 0.01 M: 0.21 4C1	X	Kwiatos <i>et al.</i> , 2020
<i>Cerrena unicolor</i>	B	S	  	CA PL	Biosensor a base de lacasa liofilizada y electrodo de carbono vítreo por la técnica de Polimerización de Plasma Blando <b>FC/N</b> residuos agrícolas como fuente de carbono <b>IND</b> con CuSO <sub>4</sub>	pH 5	L: 186 000 nkat/l Lio: 24,000 nkt/l Rh: 141 U/mL	X	Biosensor a base de lacasa para isómeros de dihidroxibenceno	Malinowski <i>et al.</i> , 2020 Mazur <i>et al.</i> , 2015
<i>Trametes versicolor</i>	B	IM	 CN	CM CN	<b>INM</b> en materiales biomiméticos con marcos organometálicos que contiene cofactor Cu <sup>2+</sup>	L: T 50 °C I: T 60 °C L&I: pH 4	L: 0.5 U/mg	L: Kcat/Km 33.984 I: Kcat/Km 122.619	Degradación de bisfenol A	Zhang <i>et al.</i> , 2019
<i>Pleurotus dryinus</i> <i>Trametes hirsute</i>	B B	C S	   	CA US CA IN	Cultivo de <i>Pleurotus dryinus</i> , <i>Trametes hirsute</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Aspergillus caesiellus</i> , <i>Pseudogymnoascus</i> sp, <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>Emericellopsis</i> sp. <b>FC/N</b> Glucosa y astillas de madera Solo <i>P. dryinus</i> y <i>T. hirsute</i> tuvieron lacasa.	pH 7	<i>P. dryinus</i> G: 31.7 U/l AM: 47 U/l <i>T. hirsute</i> G: 17 U/l AM: 60 U/l	X	Biorremediación de aguas residuales con compuestos fenólicos y HAPs	Ariste <i>et al.</i> , 2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A	I	 IT	CA	<b>LMS</b> con ácido clorogénico	T pH	2.5 U/ml	X	Elaboración de queso Giancata	Loi <i>et al.</i> , 2019
<i>Phellinus igniarius</i>	B	IM	 CN	CA	Mutagénesis por láser He-Ne	T 28 °C pH	0.13 mmol/l/min	K <sub>m</sub> 0.21 mmol/ml	X	Zhu <i>et al.</i> , 2019
<i>Panus strigellus</i>	B	-	 BR	CA	<b>FC/N</b> ; Bagazo de caña y 4 fuentes de N <b>IND</b> con compuestos fenólicos, CuSO <sub>4</sub>	T 30 °C pH 5	55342 U/l	X	Decoloración de RB220 y RBBR	Cardoso <i>et al.</i> , 2018
<i>Thielavia</i> sp.	A	T	  	NS Árido	Cultivo <b>INH</b> con Hg <sup>2+</sup> y Fe <sup>2+</sup>	T 70 °C pH 5-6	7400 U PM 70 KDa	K <sub>m</sub> 23.7µM K <sub>cat</sub> 4.14s <sup>-1</sup>	Decolorar RBBR (90%)	Mtibaà <i>et al.</i> , 2018
<i>Marasmiellus palmivorus</i>	B	PV	 IN	-	Diseño de Taguchi, cultivo SSF Factores: pH, T, galactosa, conc. Inóculo <b>IND</b> con CuSO <sub>4</sub>	T 28 °C pH 5	667.4 U/ml	X	X	Chenthamar-akshan <i>et al.</i> , 2017
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B	C	 EG	CA	<b>IND</b> Tween-80, CuSO <sub>4</sub> y metionina <b>FC/N</b> residuos orgánicos como fuente de C y 6 fuentes diferentes de N	X	4610 U/gfs	X	Síntesis de partículas de oro	El-Batal <i>et al.</i> , 2015
<i>Trametes hirsuta</i>	B	PV	 IN	NS Glaciar	Cultivo <b>IND</b> con CuSO <sub>4</sub> <b>FC/N</b> Fructosa y (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	T 35 °C pH 5-7	394.5 U/l PM 45KDa	X	X	Dhakar & Pandey, 2013
<i>Pycnoporus</i> sp	B	-	 	CA CN	Producción de un crudo de lacasa en un reactor air-lift de 65 litros	T 50 °C pH 3.5	72,000 U/l	X	Producción a nivel industrial	Liu <i>et al.</i> , 2013
<i>Penicillium martensii</i>	A	IM	 EG	CA	Cultivo considerando: tiempo de incubación, vol. de inóculo, pH, T, fuentes de C y N <b>IND</b> con Tween 80 y CuSO <sub>4</sub>	T 30 °C pH 5.5	39.52 U/mg	X	X	Elshafei <i>et al.</i> , 2012
<i>Trametes versicolor</i>	B	IM	 CN	CM	Cultivo <b>INM</b> con C. mesoporoso magnético	I&L: T 45°C pH I:3 L:4	23.3 U/mg	I: K <sub>m</sub> 0.550 mM L: K <sub>m</sub> 0.232 mM	Remoción de <i>p</i> -clorofenol y fenol	Liu <i>et al.</i> , 2012



### 3 ANTECEDENTES DIRECTOS

En 2011, en el grupo de trabajo, Cervantes aisló la cepa *Co3Bag1* a partir de un conjunto de 29 cepas de hongos identificados como termófilos productores de enzimas con actividad ligninolítica, y que fueron aislados de montículos de composta con bagazo de caña como fuente de carbono.

En el mismo año, dicha cepa fue identificada por López-Olguín como *Corynascus sepedonium* mediante análisis taxonómico de rDNA 28S e ITS, y mediante análisis filogenético se relacionó con los géneros *Chaetomium* y *Chaetomidium*. Fue hasta la actualización de la base de datos del grupo que fue identificada como *Thielavia terrestris* por Charles River Laboratories International, Inc. (EE. UU.).

Referente a lacasas, previo al presente trabajo, Cervantes (2011) también reportó actividad de lacasa en la cepa de estudio utilizando ABTS como sustrato, mientras que López-Olguín (2011) purificó una lacasa de 97 kDa (Lac 97) por cromatografía de intercambio aniónico a partir del sobrenadante de cultivo, Lac97 mostro ser ácida y termotolerante con un pH y temperatura óptimos de 3.0 y 60 °C, además de valores de vida media ( $t_{1/2}$ ) de 3.5, 21 y 60 h a 70, 60 y 50 °C, respectivamente. La actividad de Lac97 fue inducible en un 25 % en presencia de iones  $\text{Cu}^{2+}$  e inhibida por iones  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ . Paralelamente López-Olguín, también 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 bases de datos.

En 2018, Gutiérrez Antón *et al.* comprobaron que la producción de lacasa de *T. terrestris* Co3Bag1 en medio de cultivo líquido se vió favorecida por la sustitución de fuentes de carbono y nitrógeno, así como por la incorporación de cobre como inductor, aunque tanto la biomasa como la producción de lacasa fue baja (2018).

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 graminicola* (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.

## ④ JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### Justificación

Dada la importancia de las lacasas en la ciencia básica y aplicada, la identificación, análisis y entendimiento de los genes codificantes para lacasas y los mecanismos reguladores que llevan a su expresión, son relevantes, en principio para aumentar su producción, así como para mejorar su actividad enzimática.

### Objetivos

#### General

Evaluar la expresión génica de lacasas del hongo termófilo *Thielavia terrestris* en presencia de cobre como inductor.

#### Particulares

Determinar la cinética de crecimiento del hongo en presencia de cobre.

Diseñar cebadores específicos para genes codificantes para lacasa de *T. terrestris*.

Analizar los patrones de expresión de genes codificantes para lacasa de *T. terrestris* en ausencia y presencia de cobre como inductor

## 5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La metodología ejecutada para el alcance y cobertura de los objetivos del presente proyecto se presenta de manera sucinta en el siguiente diagrama.

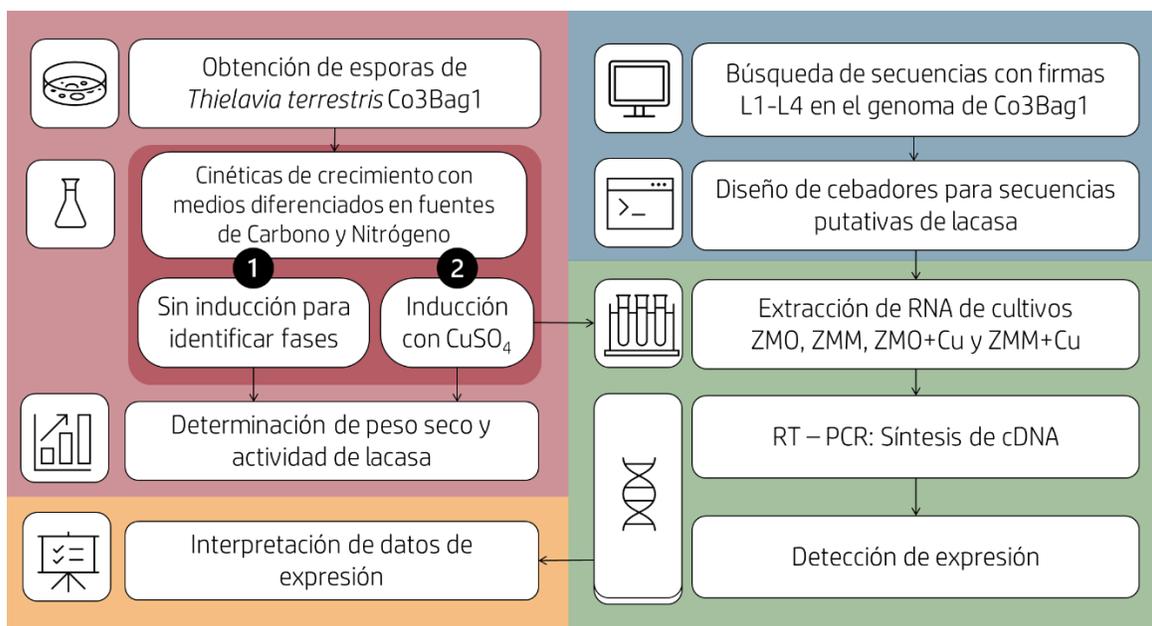


Figura 5-1 Esquema general de trabajo. Elaboración propia.

### 5.1 | Organismo fuente

*Thielavia terrestris* Co3Bag1 (*Tht.* C3B1) se aisló de un montículo de composta de gabazo de caña por el grupo de trabajo a cargo del Dr. Sergio Rubén Trejo Estrada, Investigador Titular del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico, Tlaxcala, México. El género y especie del organismo fueron identificados por *Charles River Laboratories International, Inc.* (EE. UU.), además por métodos moleculares de secuenciación del rDNA 28S (García-Huante, 2017). *Tht.* C3B1 fue depositado en la Colección de Cultivos (CDBB) del CINVESTAV Unidad Zacatenco, con número de acceso CDBB-H-1938.

### 5.2 | Cinética de crecimiento

*A priori*, para la obtención de esporas de *Tht.* C3B1, se sembró por picadura un inóculo de este organismo en matraces de 250 ml de volumen con 100 ml de medio sólido descrito por Tien & Kirk, 1988 (Tabla 5-1). Este cultivo se incubó a 45 °C por alrededor de 12 días, hasta su esporulación. Posteriormente, las esporas fueron recolectadas mediante agitación magnética y agua destilada para su suspensión, después se continuó con su filtración con fibras de nylon, para reducir la cantidad de

micelio en la suspensión y que esta fuese más homogénea. Todo el manejo del cultivo se realizó en condiciones de esterilidad y con material previamente esterilizado a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. Por último, se efectuó la lectura de absorbancia a 650 nm de una muestra representativa de esta suspensión para garantizar que los inóculos derivados tengan una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas, de acuerdo con la ecuación 1 (*vide infra*).

### 5.3.A | Medios de cultivo

A partir del trabajo realizado por Gutiérrez Antón *et al.* 2018, donde se mejoró la producción y actividad de lacasa de *Tht.* C3B1, a través de la modificación de nutrientes y sus concentraciones en el medio de crecimiento y producción de lacasas reportado por Zouari-Mechichi *et al.* 2006; se inició con la determinación de la cinética de crecimiento de esta cepa a lo largo de 14 días, considerando el medio original (ZMO) y modificado (ZMM) (Tabla 5-I), a fin de registrar el efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno y carbono, determinando la biomasa por peso seco y la actividad enzimática por medición de absorbancia.

Tabla 5-I Composición por litro de los medios para esporulación y producción de lacasas

Componentes	Tien & Kirk	ZMO*	ZMM*
Agar	20g	-	-
Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	10g	10 g	-
Fructosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	-	-	20g
Tartrato de amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> )	-	2 g	-
Peptona	2g	5 g	-
Extracto de levadura	2g	1 g	-
Extracto de malta	10g	-	-
Nitrato de sodio (NaNO <sub>3</sub> )	-	-	5g
Cloruro de potasio (KCl)	-	0.5 g	0.5 g
Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2g	1 g	1 g
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	1g	0.5 g	0.5 g
Tiamina-HCl (Vitamina B1) (C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OS+, HCl)	1mg	-	-
Solución de elementos traza**	-	1 ml	1 ml

\*Ajustar pH a 5.5 antes de esterilizar. \*\*Composición por litro: B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>2</sub> 10H<sub>2</sub>O (0.1g), CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O (0.01g), FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (0.05g), MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (0.01g), ZnSO<sub>4</sub> (0.07g), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O (0.01g). Para ZMM excluir CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O.

Para la puesta en marcha de la cinética se cultivó con un inóculo de esporas a una concentración de  $1 \times 10^6$  en matraces de 125 ml de volumen con 75 ml de medio ZMO y ZMM, previamente esterilizado a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. Los matraces inoculados se incubaron a 45°C y 120 rpm. Para cada día de la cinética se consideró un matraz y su duplicado de cada medio para ser sacrificados, es decir, cuatro matraces detuvieron su cinética cada 24 horas para la determinación de biomasa y actividad.

### 5.3.B | Biomasa

El contenido de cada matraz fue filtrado con embudo y papel filtro, de peso previamente conocido, reservando el extracto líquido para determinar actividad enzimática; mientras que la biomasa junto al papel filtro, sin exceso de líquido, fueron pesados y después sometidos a 100°C en mufla por entre 30 – 60 minutos, según los cambios en la cantidad de biomasa a lo largo de los días. Eliminada la humedad, se pesa el papel filtro y la biomasa. El valor del peso seco se obtiene por diferencia entre el peso antes y después del tratamiento, así como del papel filtro.

### 5.3.C | Actividad enzimática

La mezcla de reacción se compone de 800 µl de amortiguador Glicina-HCl, compuesto por glicina (75.07 g/mol) 100 mM a pH 3 (ajustado con HCl), y 100 µl de extracto enzimático que son incubados 5 minutos a 50°C. Después se agrega como sustrato una solución 5 mM de etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS, 514.62 g/mol), mientras simultáneamente se lee la reacción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 420 nm en periodos de 10 a 20 segundos por hasta 2 a 5 minutos, Como blanco de reacción se utiliza la misma mezcla de reacción bajo el mismo procedimiento, excluyendo de la mezcla al extracto enzimático. A simple vista, la reacción se muestra positiva con una coloración azul resultado de la oxidación del sustrato. Con base en las lecturas de absorbancia, se procede a calcular la actividad enzimática por medio de la ecuación 2.

$$V_i = \left( \frac{V_m \cdot 0.5}{\lambda_{650 \text{ nm}}} \right) \cdot 0.1 \quad (1)$$

Donde:

$V_i$  = Volumen del inóculo (ml)

$V_m$  = Volumen del medio a inocular (ml)

$\lambda_{650 \text{ nm}}$  = lectura de absorbancia a 650 nm

$$AE = \frac{m \cdot fd \cdot V_t}{\epsilon \cdot L \cdot V_e} \quad (2)$$

Donde:

AE = actividad enzimática (U/l)

$m = \Delta^{abs}/_{\text{min}}$ , variación de absorbancia en min  
pendiente al graficar abs vs min

$fd = 1000$ , factor de conversión a µmol/ml  
1mol=1000000 µmol/1litro=1000ml

$V_t$  = volumen de la mezcla de reacción (ml)

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar del sustrato  
( $\epsilon_{420 \text{ nm ABTS}} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$L = 1 \text{ cm}$ , longitud de celda (cm)

$V_e$  = volumen de extracto crudo (ml)

### 5.3 | Inducción por cobre

Partiendo de los resultados obtenidos en 5.2, se efectuó una nueva cinética bajo las mismas condiciones de preparación, incubación y evaluación tanto para ZMO como ZMM, añadiendo además el efecto inductivo del cobre al inicio de la fase logarítmica (fase log), mediante la adición en dicho momento de 150 µl de una solución 0.5 M de sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 249.68 g/mol), obteniendo una concentración final de 1mM en los medios de cultivo, denominados ahora ZMO+Cu y ZMM+Cu. De nueva cuenta se determinaron actividad enzimática y biomasa según 5.2.B y C.

### 5.4 | Análisis bioinformático de secuencias

Tomando como base el genoma secuenciado de *Tht.* C3B1, se buscaron secuencias de aminoácidos que compartieran las secuencias firma L1, L2, L3 y L4 para enzimas MCO y lacasas.

Adicionalmente, considerando el reporte de Berka *et al.* de 2011, se procedió a la búsqueda de secuencias de aminoácidos reportadas como lacasas o MCO de *T. terrestris* NRRL 8126 en el repositorio de datos UniprotKB. A partir de las secuencias encontradas se ejecutó un alineamiento de estas con las secuencias de *Tht.* C3B1, mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del programa ClustalΩ, disponible en la plataforma EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*). Las secuencias de *Tht.* C3B1 con mayor similitud con las secuencias de NRRL 8126, se consideraron putativas para lacasas u otras MCO.

Para cada una de las secuencias putativas seleccionadas se buscó mediante BLAST de la plataforma EXPASy (*Expert Protein Analysis System*), otras secuencias de lacasas fúngicas con las que compartiesen mayor identidad, a fin de corroborar su estatus como putativa de lacasa.

Cada secuencia putativa encontrada se buscó caracterizar mediante herramientas bioinformáticas a fin de dotarle de características y propiedades cuando menos teóricas.

#### 5.4.A | Diseño de cebadores para lacasa

Mediante la herramienta *Primer designing tool* de la plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), se procedió al diseño de cebadores para cada secuencia putativa de lacasa, previendo las condicionantes estándar para el diseño de cebadores como son: 18 – 30 nucleótidos de longitud, contenido de citosinas (C) y guaninas (G) entre el 40 – 60%, temperatura de fusión ( $T_m$  - del ingl. *melting temperature*) cercana a 50 - 65 °C y evitar secuencias complementarias (Dieffenbach *et al.* 1993). Adicionalmente se eligieron regiones no conservadas entre secuencias,

evitando principalmente las regiones L1-L4, debido a que desea identificarse el nivel de expresión de un gen respecto a los demás.

Para corroborar la elección de cebadores, cada uno de estos fue evaluado mediante la herramienta *OligoAnalyzer Tool* de la plataforma IDT (*Integrated DNA Technologies, Inc*).

#### 5.4.A.1 | Diseños de cebadores para $\beta$ -tubulina

Para los cebadores de  $\beta$ -tubulina, se planteó seguir una metodología similar. Sin embargo, se observó que toda la secuencia es altamente conservada y aunque esto facilitó encontrar la secuencia putativa para  $\beta$ -tubulina en el genoma de *Tht. C3B1*, no se encontró una secuencia conservada en particular de la cual partir. Por lo que, recurriendo a la literatura (Einax & Voigt, 2003), se encontró que se han reportado regiones en las secuencias de  $\beta$ -tubulina fúngicas que han sido comúnmente útiles para el diseño de cebadores. Considerando esto, se diseñaron cebadores para  $\beta$ -tubulina de *Tht. C3B1* en *Primer designing tool* y evaluándolos con *Olygoanalyzer*, utilizando como criterios de selección los valores de diseño y análisis y que los cebadores incluyeran dentro de su región parte o totalidad de las regiones comunes.

### 5.5 | Extracción de gDNA y evaluación de cebadores

La extracción de DNA genómico (DNA genómico) de *Tht. C3B1* se efectuó acorde con Abdelsalam *et al.* 2003, con algunas modificaciones.

Como fuente de extracción de DNA, se partió del crecimiento de cultivos de *Tht. C3B1*. Para ello se inocularon con 500  $\mu$ l de esporas suspendidas (ver 5.2), 5 matraces de 250 ml de volumen con 100 ml de medio PDA (papa-dextrosa-agar), previamente esterilizado a 121°C y 15 psi durante 15 minutos, Los matraces se incubaron a 45°C por entre 72 y 96 horas.

Se inició con la recuperación de biomasa de los matraces, raspando con una espátula el micelio en cada uno y depositándolo en un microtubo hasta llenar una tercera parte de su capacidad, cuidando no mezclar con el agar.

Al microtúbulo ya con biomasa se le agregó 500  $\mu$ l de buffer TE (Tris-HCl y EDTA) y se centrifugaron por 10 minutos a 14000 rpm, posteriormente se desechó el sobrenadante, conservando el pellet formado. Después, se añadieron 100  $\mu$ l de buffer de extracción. El micelio se macero con un pistilo y se mezcló con un agitador vortex por cerca de 10 minutos.

Se agregaron 4 µl de RNAsa y se incubó la mezcla por 10 minutos a 65°C. Pasado el tiempo, el microtubo se mezcló por inversión tres veces. Después se agregaron 130 µl de acetato de sodio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, 82.03 g/mol) 3M a pH 5.2 y se incubó por 10 minutos a 0°C. Después se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 15 minutos.

El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo y se agregaron 650 µl de isopropanol frío. Se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 15 minutos. En este paso se observó el DNA precipitar en forma de pellet después de centrifugar.

El pellet formado se lavó con etanol al 70% frío. Se centrifugó por 30 segundos más para formar nuevamente un pellet y decantar el etanol. El DNA se resuspendió en 100 µl de buffer TE.

El buffer TE está compuesto por tris(hidroximetil)aminometano (Tris, 121.14g/mol) 10 Mm a pH 8 (ajustado con HCl) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 292.25g/mol) 1mM. El buffer de extracción se compone de cloruro de sodio (NaCl, 58.44 g/mol) 250 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) al 0.5%, Tris-HCl 200 mM a pH 8.5 y EDTA 25mM. Para la preparación del buffer TE y de extracción se prepararon soluciones de mayor concentración de Tris-HCl, EDTA, NaCl y SDS por separado que, al mezclarse y ajustar su volumen con agua destilada, tuvieran la concentración requerida. Todas las soluciones y todo el material utilizado fueron previamente esterilizado a 121°C y 15 psi durante 15 minutos.

### 5.5.A | Electroforesis de DNA en gel de agarosa

El análisis de la muestra de DNA genómico se realizó por electroforesis con un gel de agarosa al 0.8% como matriz, disolviendo 0.2 g de agarosa en 25 ml de buffer TBE (Tris-ácido bórico-EDTA), y calentando la mezcla en microondas hasta provocar hervor. Posteriormente se vacía la mezcla caliente en el molde de la cámara de electroforesis, se coloca el peine para la formación de los pozos y se espera hasta su polimerización.

El gel se colocó en la cámara de electroforesis con los pozos hacia el sentido negativo del circuito. Se llenó la cámara con buffer TBE hasta llenarla. Se cargaron la muestra de DNA y el marcador

- Marcador: 1 µl marcador + 1 µl buffer de corrida + 4 µl agua libre de RNAsas
- Muestra DNA: 1 µl buffer de corrida + 5 µl muestra DNA

Llenados los pozos, se cerró la cámara y se inició el paso de corriente a 80 voltios por 45 minutos.

Posteriormente se abrió la cámara y el gel se tiñó por 10 minutos en una solución de bromuro de etidio (2.5 µl de bromuro de etidio en 50 ml de agua destilada), y se lavó dos veces en agua destilada por 5 minutos. Finalmente, el gel fue revelado con luz UV.

Para la realización del buffer TBE, primero se realizó una solución stock 5X, compuesta de 54 g de Tris, 27.5 g de ácido bórico y 20 ml de solución 0.5 M de EDTA pH 8, ajustando con agua destilada a un volumen final de 1 litro. De esta solución TBE 5X, se tomó suficiente volumen para ajustar con agua destilada a 1 litro de solución TBE 0.5X. Esta última fue la utilizada para la electroforesis.

### 5.5.B | Amplificación por PCR con cebadores diseñados

Los cebadores diseñados fueron sintetizados y liofilizados por la compañía T4Oligo, para su uso fue necesario rehidratarlos en buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM) para así obtener una concentración final de 100 µM.

Se comprobó la efectividad de los cebadores mediante PCR con un gradiente de temperatura (55.7°C, 58.8°C, 63.0°C, 65.0°C) cercano a su T<sub>m</sub> de diseño (60°C). Estas reacciones se efectuaron utilizando la mezcla de reacción HotStarTaq Master Mix, de Qiagen, según el protocolo de esta (Anexo 1-A). La mezcla de reacción para cada par de cebadores, considerando que estos se encuentren en una solución 10 µM, fue: 12.5 µl HotStarTaq Master Mix + 0.5 µl DNA molde + 1 µl *primer forward* + 1 µl *primer reverse* + 10 agua.

Las condiciones para la PCR fueron: Activación de la HotStarTaq DNA Polymerase; 15 min a 95°C, Desnaturalización: 1 min a 94°C, Alineamiento: 1 min a 55°C - 65°C, Extensión; 1 min a 72°C, Numero de ciclos: 30 y Extensión final: 10 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis con gel de agarosa como matriz a una concentración de 1.8% y siguiendo lo descrito en 5.5.A.

## 5.6 | Extracción de RNA

Siguiendo la misma metodología y condiciones de las cinéticas anteriores, se incubaron 2 matraces por medio de cultivo, de los cuales 1 fue inducido con CuSO<sub>4</sub> 1mM y el otro se mantuvo sin inducir. Para cada cultivo se realizó la medición de actividad enzimática por absorbancia y la extracción de RNA de la biomasa.

La extracción de RNA se inició macerando la biomasa con nitrógeno líquido mediante mortero y maja, para después utilizar el kit Direct-zol RNA Miniprep de Zymo Research, empleando también el reactivo TRIzol y tubos homogeneizadores (*beads tubes*), todo acorde al protocolo del fabricante (Anexo 1-B). Las muestras obtenidas se analizaron mediante electroforesis con gel de agarosa como matriz a una concentración de 1.8% y siguiendo lo descrito en 5.5.A.

Para la preparación de la solución madre del buffer TBE (5X) se empleó agua ultrapura (Mili-Q), mientras que para la dilución de esta para buffer de trabajo (0.5X) se utilizó agua ultrapura tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC – del ingl. *Diethyl pyrocarbonate*). El agua DEPC se preparó al 1%. El gel de agarosa se preparó con buffer TBE 0.5X. Todo el material y soluciones empleadas tanto para la maceración de biomasa, extracción de RNA, purificación de RNA y preparación de buffers se esterilizo cuando menos dos veces a 121°C y 15 psi durante 15 minutos.

## 5.6 | Síntesis de cDNA

Para la síntesis de la primera hebra de cDNA se empleó el kit cDNA RevertAid de Thermo Fisher Scientific, siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo 1-C), obteniendo a partir de 1 µl de RNA un volumen final de 20 µl de cDNA. Se procesaron por duplicado 4 muestras de RNA (ambos medios, con y sin inducción), obteniendo un total de 8 librerías.

## 5.7 | Evaluación de librerías y detección de expresión

Con las librerías realizadas se procedió a su amplificación por PCR con la polimerasa Platinum Taq DNA Polymerase de Thermo Fisher Scientific. La mezcla de reacción incluyó: 2.5 µl Buffer 10X para PCR sin MgCl<sub>2</sub>, 0.75 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.5 µl Mezcla 10mM dNTP, 0.5 µl 10mM cebador *forward*, 0.5 µl 10mM cebador *reverse*, 0.5 µl cDNA, 0.1 µl 10mM Platinum Taq DNA Polymerase y agua libre de nucleasas hasta completar 25 µl como volumen final.

Las condiciones para la PCR fueron: Activación de la Platinum Taq DNA Polymerase; 2 min a 94°C, Desnaturalización: 1 min a 94°C, Alineamiento: 1 min a 60°C, Extensión; 1 min a 72°C, Numero de ciclos: 40 y Extensión final: 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1.5% y siguiendo lo descrito en 5.5.A

## ⑥ RESULTADOS

### 6.1 | Cinéticas

En general, posterior a la determinación de biomasa y actividad enzimática, se observaron discrepancias entre las cinéticas de ambos medios (con y sin inducción), principalmente en las fases de crecimiento y el aspecto morfológico de los cultivos, pudiendo ser indicadores de cambios metabólicos, que a su vez afectasen la producción y actividad de lacasas. Los valores de biomasa y actividad de lacasa para ZMO y ZMM con y sin cobre completos se encuentran en el anexo 2 y 3, respectivamente.

Los cultivos en medio ZMO sin inducir (Figura 6-I-a), presentan un crecimiento exponencial de la biomasa del día 3 al 4, con 1.15 g/l como máximo al 5, seguido de un decrecimiento hasta el día 8, con un ligero repunte al día 9, y una subsecuente caída hasta el término de la evaluación. A esa tendencia le acompaña una contraria, en cuanto a la actividad de lacasa se refiere, donde esta aumenta conforme avanza la cinética, encontrando su máximo (5.82 U/l) al día 14.

En cuanto al medio ZMM sin inducir (Figura 6-I-b), la relación entre la generación de biomasa y la actividad de lacasa tiende más a ser estable, alcanzando para la actividad de lacasa su máximo (3.3 U/l) al día 11 y para biomasa (0.45 g/l) al día 7. Ambos parámetros logran ser estables a partir del día 5 y hasta el día 11, en el caso de la actividad de lacasa se mantiene en variaciones de no más de 0.5 unidades, mientras que para biomasa varía en no más de 0.2 unidades hasta el final de la cinética.

En cuanto a la morfología de la biomasa, a partir del día 3 se observó en ambos medios la formación de micelios en pellets, siendo esto coincidente con el inicio del registro de la actividad enzimática; desde entonces los pellets aumentan de tamaño hasta un aparente lisado al día 13, en el caso de ZMO; o se mantienen en un crecimiento más lento, en el caso de ZMM.

Así mismo se registraron cambios destacables en la coloración de los medios (Figura 6-III), que, si bien ambos medios presentaban coloraciones diferentes desde el inicio, siendo ZMO de color amarillo y ZMM translucido, con el avance de la cinética ZMO se tornó opaco a partir del día 4 y marrón desde el día 10, mientras que ZMM se volvió rojizo desde el día 4, siendo más intenso los días 6 y 7. Estas diferencias pudieran relacionarse con la producción de lacasas.

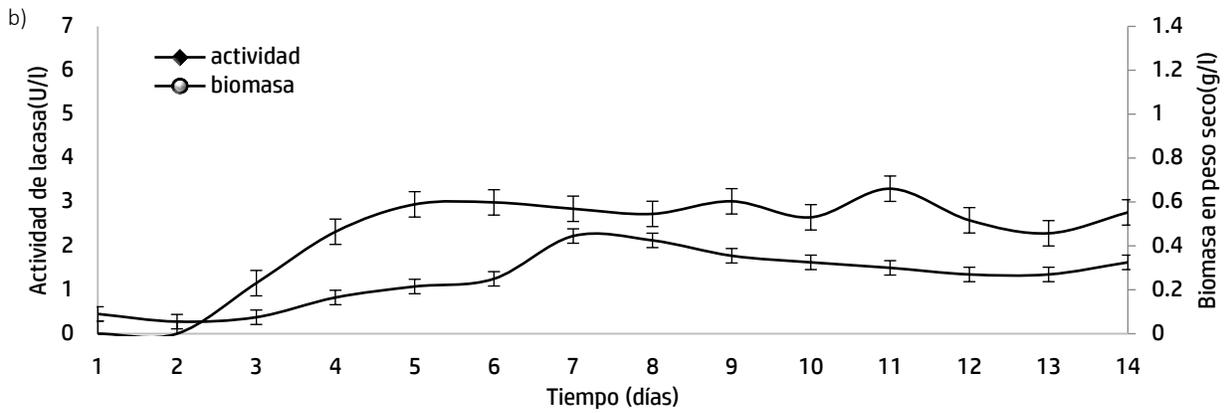
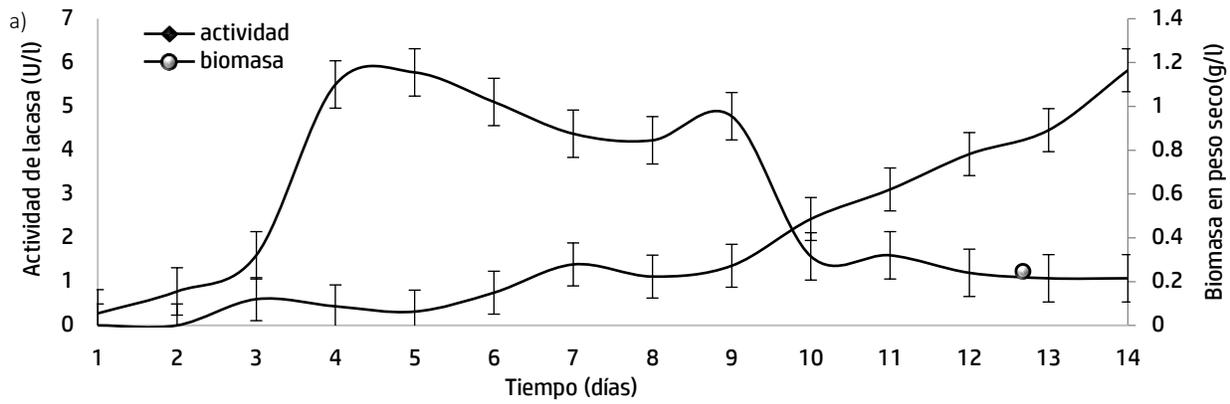


Figura 6-I Cinéticas de crecimiento de *Tht. C3B1* en a) ZMO y b) ZMM.

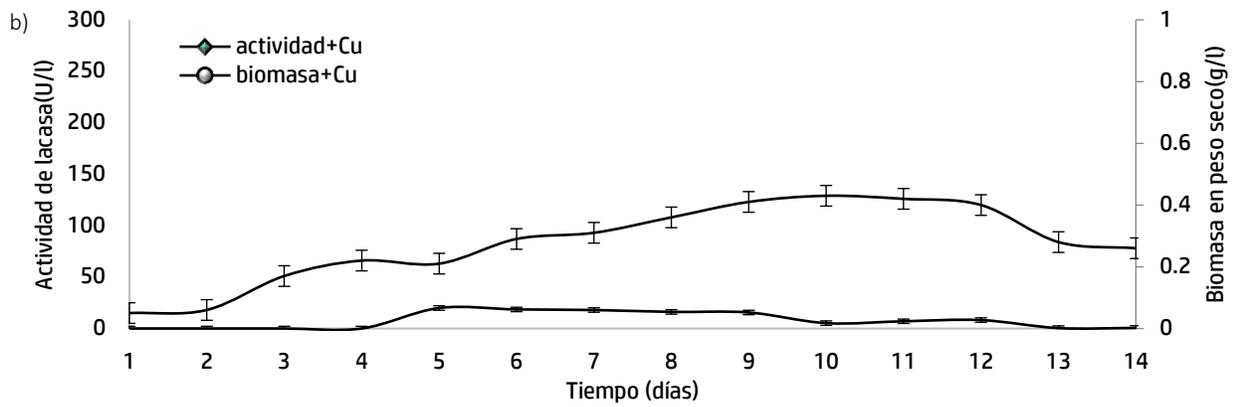
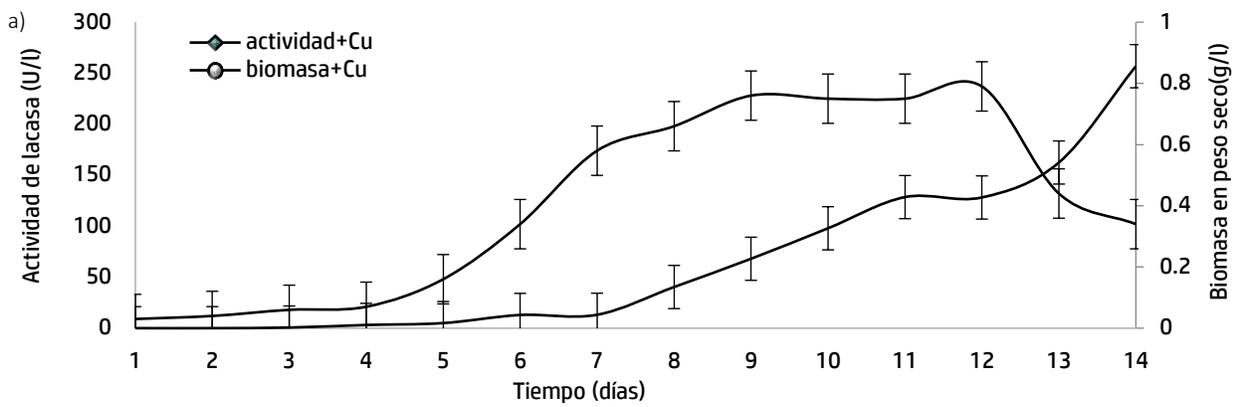


Figura 6-II Cinéticas de crecimiento de *Tht. C3B1* en a) ZMO+Cu y b) ZMM+Cu

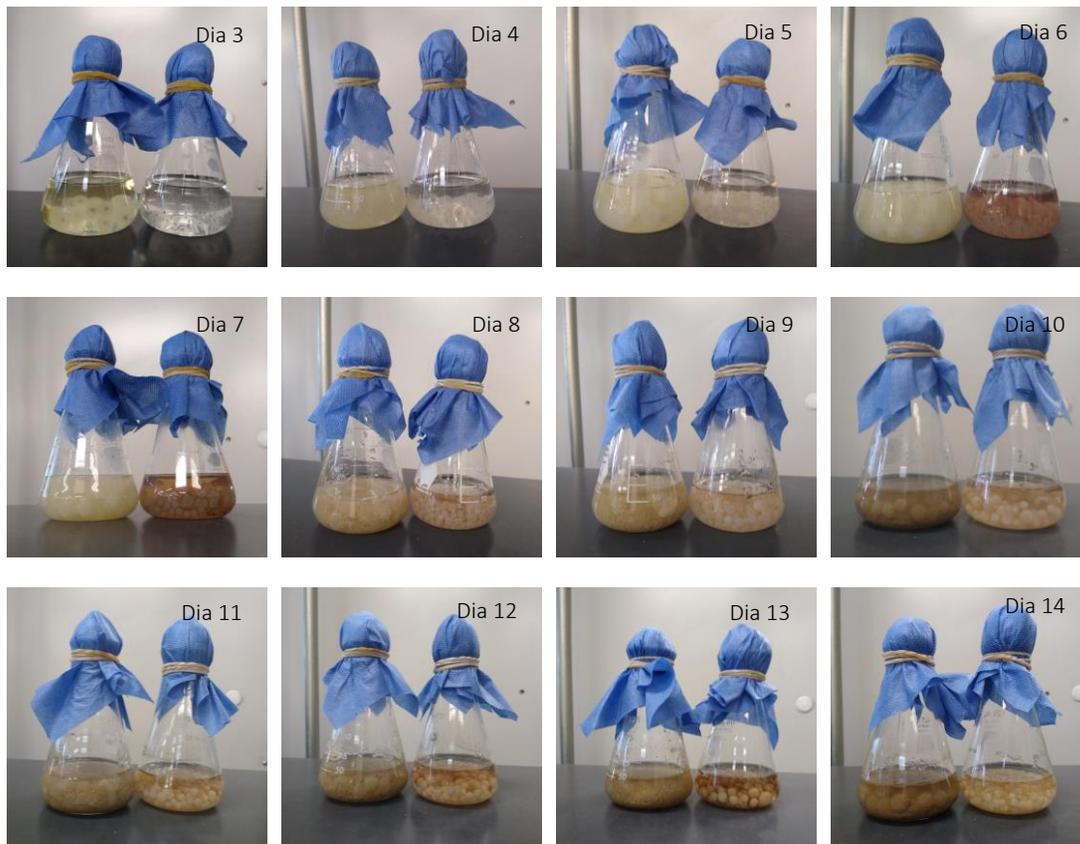


Figura 6-III Crecimiento en matraces desde el día 3 al 14 de la cinética. En cada fotografía el matraz de la derecha corresponde al medio ZMO y el matraz de la izquierda al ZMM.



Figura 6-IV Aspectos de los cultivos de *Tht.* C3B1. a) ZMO, b) ZMO+Cu, c) ZMM, y d) ZMM+Cu.

Bajo el efecto inductivo de  $\text{CuSO}_4$  1mM, agregado al tercer día de incubación, siendo este el inicio del crecimiento exponencial, de acuerdo con las cinéticas sin inducción de ambos medios; en general, se observaron valores mayores de los parámetros evaluados en ZMO+Cu respecto a ZMM+Cu.

En ZMO+Cu (Figura 6-II-a) se observó una tendencia similar a la presentada en la cinética en el mismo medio, pero sin inducción; donde el máximo de actividad de lacasa (25.856 U/l) se registró al final de la cinética, con el descenso de la biomasa, aunque en este caso ocurrió de manera abrupta desde el día 12 al 14. En este sentido, la cinética en general se vio afectada en sus fases respecto a la cinética sin inducción, el crecimiento exponencial de la biomasa inicio desde el día 4 y continuo hasta el día 12, donde alcanzó su máximo (0.79 g/l) y posteriormente descendió.

Para el medio ZMM+Cu (Figura 6-II-b), se observa que a partir del día 5, donde se presenta el máximo de actividad de lacasa, después de 4 días sin registro de actividad, esta comienza una disminución progresiva hasta el día 9, donde cae abruptamente al día 10 (5.2 U/l), repuntando ligeramente hasta 8.1 U/l y finalmente cae los últimos dos días por niveles más bajos a la unidad. En comparación con la cinética sin inducción, la biomasa presenta valores muy similares, incluso ligeramente mayores y con un crecimiento estable, desde el día 3, donde empieza a incrementarse la biomasa, hasta el día 10, donde se presenta su máximo (0.43 g/l.), para posteriormente disminuir abruptamente. Esto último similar a lo identificado en ZMO+Cu.

Comparando ambas cinéticas, es claro el efecto inductivo del Cu, ya que además de presentarse una generación menor de biomasa en ambos medios respecto a sus símiles sin inducir; en ZMM la actividad en su punto máximo paso de 3.3 U/l sin inducción a 19.9 U/l con cobre, mientras que en ZMO paso de 5.82 U/l a 256.85 U/l. Es decir, en ambos medios el cobre logro incrementar la actividad hasta 6 veces para ZMM+Cu y sorprendentemente hasta 44 veces para ZMO+Cu.

En cuanto a la apariencia y morfología de los cultivos, los realizados en ZMO+Cu iniciaron un crecimiento de tipo pellet, a partir del día de la inducción (Figuras 6-IV-a), lo cual no se había presentado en el mismo medio sin inducción, por lo que quizás sea un efecto de esta. Por su parte en ZMM+Cu el crecimiento en pellets y la presunta generación de pigmentos presentado en el medio sin inducción también se presentó en esta nueva cinética (Figuras 6-IV-c). En ambos medios fue notorio el cambio de coloración del medio posterior a la inducción, no solo por el color azul propio de la solución de  $\text{CuSO}_4$ , sino también por el oscurecimiento tanto del medio como de los pellets (Figuras 6-IV-b y d) y la aparente pérdida de los pigmentos en ZMM+Cu.

## 6.2 | Análisis de secuencias

Por medio de la identificación total o parcial de las secuencias firma L1-L4 dentro del genoma de *Tht*. C3B1 se encontraron 28 posibles secuencias para lacasas. Encontrando a la par, resultado de la búsqueda en UniprotKB, 7 secuencias reportadas para lacasas y otras MCO de *Tht*. N-6 (Tabla 6-I).

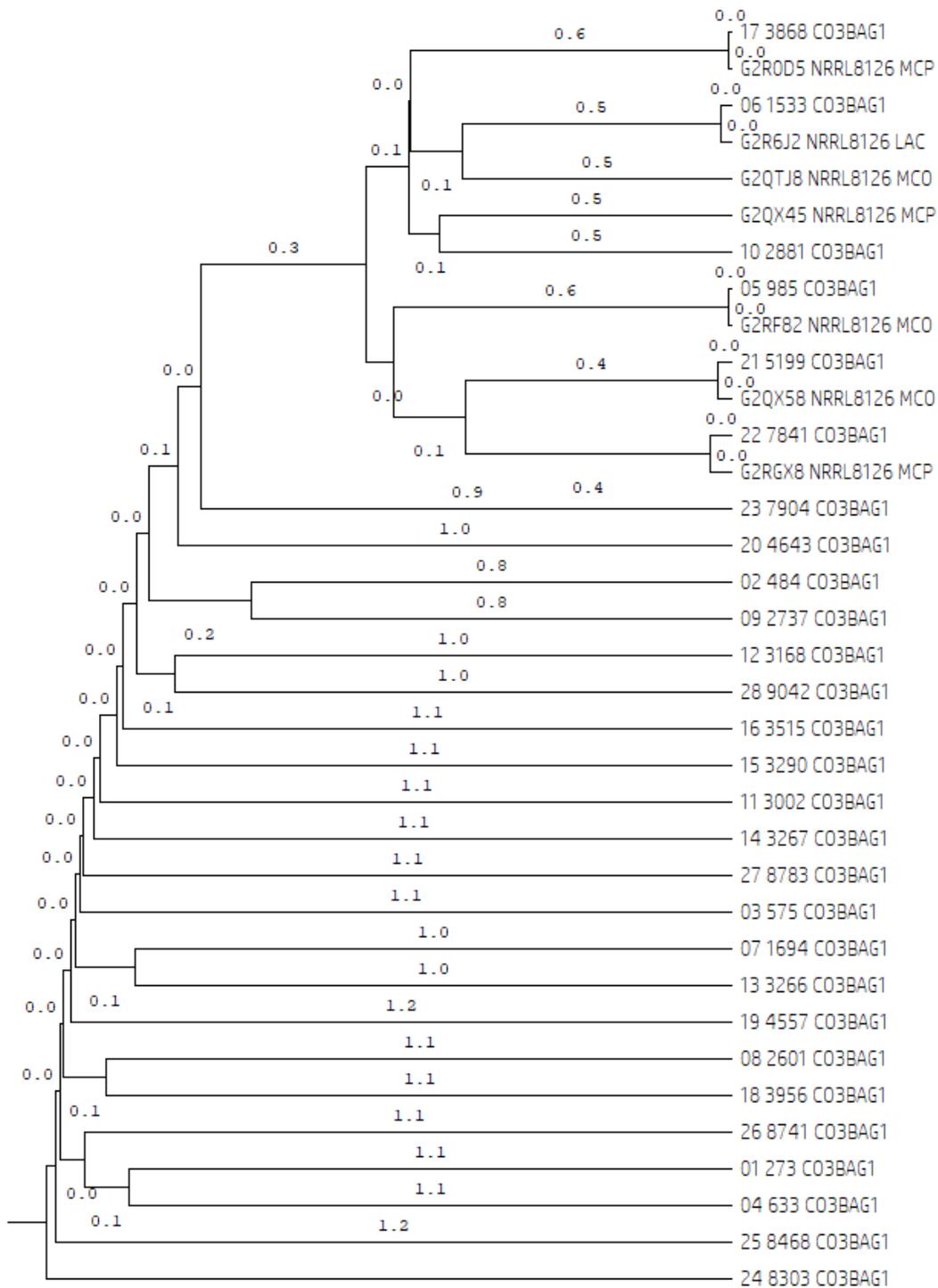
Tabla 6-I Secuencias para lacasa reportadas en UniprotKB

Entrada	Nombre	Gen codificante	Longitud
G2RGX8	Proteína multicobre	THITE_2123164	647
G2QX58	MCO	THITE_2038876	561
G2QTJ8	MCO	THITE_2038446	571
G2QX45	Proteína multicobre	THITE_124055	610
G2R0D5	Proteína multicobre	THITE_2112741	594
G2RF82	Proteína multicobre	THITE_2091867	664
G2R6J2	Lacasa	THITE_124911 (lcc1)	617

Posteriormente, mediante el alineamiento y elaboración de árbol filogenético de estas 35 secuencias (Figura 6-VI), se encontró que solo seis de la cepa Co3Bag1 tienen similitud con las ya reportadas para NRRL8126. Estas seis secuencias, con la numeración 17, 06, 05, 10, 21 y 22, se consideraron putativas para lacasa u otra MCO de *Tht*. C3B1 y se denominaron Lac A, Lac B, Lac C, Lac D, Lac E y Lac N, respectivamente. En la figura 6-V se puede apreciar parte del alineamiento de estas secuencias putativas para lacasa de *Tht*. C3B1 y la ubicación de las firmas L1-L4.



Figura 6-V. Parte del alineamiento entre Lac A, B, C, D, E y N. Secuencias firmas en colores: L1, L2, L3 y L4. Alineamiento completo en el anexo 4.



1.2

Figura 6-VI Árbol filogenético realizado con el software MEGA X y obtenido del alineamiento de todas las secuencias para lacasa y MCO de las cepas NRRL8126 y Co3Bag1 de *T. terrestris*, realizado con el software MUSCLE. En la nomenclatura para Co3Bag1, se indica No. Identificación/No.Gen/CO3BAG1, para NRRL8126, AccesoUNIPROTKB/NRRL8126/TipoMCO, siendo MCO, multicobre oxidasa; MCP, multicobre peroxidasa; LAC, lacasa. Las secuencias de Co3Bag1 con mayor similitud a las de NRRL8126, fueron las identificadas como 17, 06, 05, 10, 21 y 22, y nombradas Lac A, B, C, D, E y N, respectivamente.

Con las secuencias putativas para lacasa ya definidas, se buscó caracterizar cada una de estas mediante herramientas bioinformáticas.

Primero, una búsqueda en el repositorio UniprotKB arrojó que estas secuencias tienen en su mayoría altos índices de identidad con proteínas de ascomicetos, además de las ya reportadas por Berka *et al.* 2011, con otras de propiedades interesantes o no catalogadas como lacasas o MCO.

Lac A mostro identidad con secuencias de proteínas multicobre, oxidorreductasas, lacasas, y policétida sintasa, todas de ascomicetos termófilos y patógenos de plantas (Tabla 6-II).

Tabla 6-II Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac A guarda similitud

Entrada	Nombre	Fuente	Características	Identidad	Expect	Mycobank
G2R0D5_THETT	Proteína multicobre	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termófilo	582/594 (98%)	0.0	324578
AOA3S4AJJ5_9PEZI	Proteína multicobre	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termófilo	582/594 (98%)	0.0	324578
PTAK_PESFW	Policétida sintasa	<i>Pestalotiopsis fici</i>	Ascomiceto	262/552 (47%)	3e-159	282475
OPSS_BEAB2	Oxidorreductasa OpS5	<i>Beauveria bassiana</i>	Ascomiceto patógeno vegetal	205/536 (38%)	3e-92	199430
LAC2_BOTFU	Lacasa	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Ascomiceto patógeno vegetal	204/549 (37%)	4e-89	284645

Lac B y C son las secuencias con mayor similitud con proteínas reportadas como lacasas, principalmente de ascomicetos para Lac B (Tabla 6-III) y basidiomicetos para Lac C (Tabla 6-IV).

Tabla 6-III Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac B guarda similitud

Entrada	Nombre	Fuente	Características	Identidad	Expect	Mycobank
AOA446BP36_9PEZI	Oxidorreductasa	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termófilo	603/619 (97%)	0.0	324578
G2R6J2_THETT	Lacasa	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termófilo	596/619 (96%)	0.0	324578
LAC1_MELAO	Lacasa	<i>Melanocarpus albomyces</i>	Ascomiceto termófilo	440/626 (70%)	0.0	317449
LAC2_PODAS	Lacasa	<i>Podospora anserina</i>	Ascomiceto	385/582 (66%)	0.0	100818
LAC1_NEUCR	Lacasa	<i>Neurospora crassa</i>	Ascomiceto	392/617 (64%)	0.0	262212

Tabla 6-IV Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac C guarda similitud

Entrada	Nombre	Fuente	Características	identidad	Expect	Mycobank
G2RF82_THETT	Proteína multicobre	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termófilo	643/664 (97%)	0.0	324578
A0A446B6U3_9PEZI	Oxidorreductasa	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termófilo	631/653 (97%)	0.0	324578
LAC1_CRYNB	Lacasa	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Basidiomiceto	201/579 (35%)	1e-93	119294
LAC2_CRYNH	Lacasa	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Basidiomiceto	194/580 (33%)	1e-92	119294
LAC1_CRYNH	Lacasa	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Basidiomiceto	202/582 (35%)	6e-92	119294

Lac D presenta identidad en su mayoría con secuencias de oxidorreductasas de ascomicetos tanto termofílicos como patógenos y otras MCO como la dihidrogeodin oxidasa (Tabla 6-V).

Tabla 6-V Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac D guarda similitud

Entrada	Nombre	Fuente	Características	identidad	Expect	Mycobank
A0A3S4AJJ5_9PEZI	Proteína multicobre	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termófilo	582/594 (98%)	0.0	324578
G2QYR1_THETT	Proteína no caracterizada	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termofílico	566/607 (93%)	0.0	324578
PTAE_PESFW	Oxidorreductasa ptaE	<i>Pestalotiopsis fici</i>	Ascomiceto patógeno vegetal	326/598 (55%)	0.0	282475
TPCJ_ASPFU	Oxidorreductasa tpcJ	<i>Neosartorya fumigata</i>	Ascomiceto patógeno	327/590 (55%)	0.0	512563
GEDJ_ASPTN	Dihidrogeodin oxidasa	<i>Aspergillus terreus</i>	Ascomiceto	321/595 (54%)	0.0	191719

Lac E y N, por su parte, se relacionan con secuencias reportadas como MCO transportadoras de hierro provenientes de ascomicetos patógenos vegetales (Tablas 6-VI y 6-VII)

Tabla 6-VI Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac E guarda similitud

Entrada	Nombre	Fuente	Características	Identidad	Expect	Mycobank
A0A446B6U3_9PEZI	Oxidorreductasa	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termófilo	589/600 (98%)	0.0	324578
G2QX58_THETT	MCO	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termófilo	535/553 (97%)	0.0	324578
PFMAD_PESFW	MCO	<i>Pestalotiopsis fici</i>	Ascomiceto patógeno vegetal	292/534 (55%)	0.0	282475
FETC_EPIFE	MCO transportadora de hierro	<i>Epichloe festucae</i>	Ascomiceto	262/546 (48%)	3e-167	363267 627456
FET3_GIBZE	MCO transportadora de hierro	<i>Gibberella zeae</i>	Ascomiceto patógeno vegetal	230/535 (43%)	6e-147	255496

Tabla 6-VII Secuencias de proteínas reportadas con las que Lac N guarda similitud

Entrada	Nombre	Fuente	características	identidad	Expect	Mycobank
G2RGX8_THETT	Proteína multicobre	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termófilo	556/586 (95%)	0.0	324578
AOA3S4AQM5_9PEZI	Oxidorreductasa	<i>Thielavia terrestris</i>	Ascomiceto termófilo	537/583 (92%)	0.0	324578
FET3_GIBZE	MCO transportadora de hierro	<i>Gibberella zeae</i>	Ascomiceto patógeno de plantas	365/557 (66%)	0.0	255496
FETC_EPIFE	MCO transportadora de hierro	<i>Epichloe festucae</i>	Ascomiceto	360/554 (65%)	0.0	363267 627456
FETC_ASPFU	MCO transportadora de hierro	<i>Neosartorya fumigata</i>	Ascomiceto endófito de plantas	344/556 (62%)	0.0	512563

En un segundo análisis, se recurrió a LccED (*Laccase and Multicopper Oxidase Engineering Database*), una base de datos de la Universidad de Stuttgart, específica para lacasas y MCO, utilizando su herramienta *Standard Numbering*, se identificaron en las secuencias, los dominios N- y C-terminal, al compararlas con una secuencia estándar representativa del repositorio. Se encontró en todas las secuencias que las firmas L1 y L2 se localizan dentro del dominio N-terminal, mientras que L3 y L4 se localizan en el dominio C-terminal (Figura 6-VII).

En un posterior análisis, recurriendo a la plataforma *DTU Health Tech* de la Universidad de Dinamarca, se determinaron los sitios de o- y n-glicosilación, mediante sus herramientas *NetOGlyc* y *NetNGlyc*, respectivamente. Resultado de este análisis, Lac C es la secuencia con mayores predicciones de N-glicosilaciones y O-glicosilaciones (principalmente en los aminoácidos S (Ser)), en contraste con Lac A, con el menor número de estas glucosilaciones. En todas las secuencias, las N-glicosilaciones, si bien están distribuidas a lo largo de estas, puede verse cierta cercanía entre estas y destacablemente al menos una se encuentra cercana o dentro de la firma L1 (Figura 6-VII).

Finalmente, gracias a *Phyre2*, del *Imperial College* de Londres, se obtuvieron las predicciones de estructuras tridimensionales de cada proteína teórica a partir del modelado (*ab initio*) por homología (Figura 6-VIII). En un índice de: % de residuos modelados / % de confianza, todos los modelos resultan confiables: Lac A (91%/>90%), Lac B (88%/>90%), Lac C (86%/>90%), Lac D (96%/>90%), Lac E (87%/>90%) y Lac N (85%/>90%). Las áreas de menor confianza son aquellas cercanas al extremo 3' (Lac A-N) y en menor medida también las cercanas al extremo 5' (Lac B, E y N).

<b>LAC A</b>		<b>LAC B</b>	
MGLLRGLLES	VSETLELFYT ATATLTQERT NGLSLLGLTLL APVLPFLFTN 50	MKSLAGAVAL	MLGILAPTIT AAPPATPEQR DLLTPLESRD AAGLPSCNTP 50
NPLPDGFPWG	SLSDTNTNPNY AAYPRTGVVR YYDFTVSRGI IAPDGYQRDV 100	SNRACWTFGF	DINTDYELKT PTNVTIRKYT LVLTEATNWK GPDGFVKERV 100
LLVNGAYPGP	LIEANWGDIT VVTVHNNISN PEDGTTIHHW GFLQRETPWA 150	MLVNNISIVGP	TIFADWGDNL EITVINNLQT NGTSHHHGL RQLNNNLNDG 150
DGAPGISQCP	IPPGRSYTYE FVASLFGTSW YHAHYSAQYA GGVVGPIVVY 200	VNGVTECPIP	PKGGKKLYRF RAVQYGTWY HSHFSAQYGN GVVGGIQTNG 200
GPTHAKYDVD	LGPIMLSDWY HREYFDIVKE LLSPNASPRV LSDNNLIDGK 250	PASLPYDIDL	GVFPITDWIN LTADQLVLYT QNNGPFFSDN VLFNGTGVHP 250
MNFDCSTVAP	GDNTPCTDRA GISKFKFQTG KTHRLRLINS GADGVQRFSI 300	FTGEGKYANV	TLPFGKRHL RLINTSVENH FQVSLVNHMT TIIAADLVVP 300
DQHTLTVIAE	DFVVPKPYNT TVVTLGVGQR TDVLVTANAG PPSLFWMRS 350	NALTVDSLFL	GVGQRYDVTI DASRTPGNWY FNVTFGGSNQ CGGSNNHSPA 350
NLTSCSPARQ	PNALAAVYVD KANISATPSS RPWDVDPGT CANDPLDISE 400	AIFHYAGAPG	GLPTDPGVAP VDHNCLDNMD LTPVVKRSVP ANSFVKKPEN 400
PLYPIPLPKP	AITQTMDIET FKNASNVTLW KFNGVSMRTD YNSPVILLAN 450	TLDVHLDTTG	TPLFVWKVNG SAINIDWNNP VDDYVMKGN SFPSTDNIVA 450
QCNFSYPPEW	NVVNYQQTAA IRIIINNKG PPHMHLHGH NFYVLHEGPG 500	VDAANQWTWY	LIENDPEAVI SLPHMHLHG HDFLVLGKSP VSPAAQVAY 500
EWDGTVRPS	NPMRRDVELV RGNHGLVIQF DGAPGVWAFH CHIAWHSSGG 550	TFDPSDRLAR	LVSNNPVRRD VTMLPAKGWL LLAFKTDNPG AWFHCHIAW 550
FVASLLVQPH	KVQQMHLPRD VEQNCRAWDL WTKHNVVDQI DSGT	HVSGGLSVVF	LERATDLRAQ LAGAAAADK AEFERVCAAW RDYYPANDPF 600
		HKVDSGLQKR	FVEVSEWMTV TGGQLGELWK QTYPPLLPQH CA
<b>LAC C</b>		<b>LAC D</b>	
MSDPQLSPPK	EGTTAAATAA AKSTTRRPSL LLIVGGLVTF VVVALALGLG 50	MLSPSLVLPV	LALGLPSARA AAQETAETVC NGPKTRSCWQ RGFDIHTDYT 50
LGLGLTHRGG	SSASLLEPPA SSSSPLPGSG AAHNASLEDW RLDPSHYVLD 100	ALQAPAGKLV	EYDLTVSQAI VKPDGYEKLA MVVNGQYGP TIEANWGDIT 100
MAWDINAPPT	TRHYDFVITE GRGWPDGVVR DMLFINGKFP GPLIEANMGD 150	RITVHNNFTE	NLNGTGIHHW GIRQYHNNWQ DGVPGVTECP TQGPESRYE 150
RLVINVTNKL	TANATTIHHW GLYQNGTNWF DGTGTIGTCC IPPGQSLVYN 200	FKVTQYGTSW	YHSFMSQYS NGLYGPLVIH GPSSANWDVD LGPWLIADWY 200
FTLEQGTYW	YHSHYGTQYL DGIILGLPIIH APAEADARKL YDSDRVVLIQ 250	HTDVEFLVHQ	GEAFNIPAVP DSTLINGKKG FNCDPARDPR CDGTGGEFFE 250
DWYHDVSQVN	LETYLAPDNE NTEPIPDNGL INGIGYFNCS SYDADSGYTC 300	VLLNHGTTYK	LAIVSTASLL TYNFWIDGHN FTVISTDFVP IKPYTTNFLT 300
YDNSTYSVLS	LEPNTRTRLR FINTGAFTEF DVSVDNHTLS VIEADATLVK 350	VGIGQRFEII	LHANASLANG TNFWIHAQDC RLPKALDWRA GIVRYDASDR 350
PVSVHRFPIH	VAQRYSVVVE TNQSTSTNYW LRGAMITSCF TGNNPVLDTT 400	RDPYTPPEGP	ELDAFRHFY GCADFDTPAI EPVVPKQVDS TSANELTSAD 400
TKAVISYSGN	STVVPDSDGAS VDWDTAIPIH CIDLDDSTLV PTIPDPPAAA 450	YLRIGQVNAT	WPGSAAGSPP LFLWVLDKSP LYANNSQOPTI KTLALDNGTV 450
TKMWRDLFSF	GIGAYQLDRA KFNGTSSWSVL DNTTLLIQAV DGLAAGQAQG 500	SQLPGYAAPI	GLDYDTGAW YVVVTSNYTA ADVAAAQGM RTDVASVHPM 500
SSPSSSSSK	WAVDGPVSAF GSNQFVVGLS ANGSIDVVDI LLYSLDEGSH 550	HLHGHDFVIL	AQGGPFPDPA TVRPKLANPE RRDTLNLPPG SFAWIAFQVD 550
PFHLHGHTFW	ILQAGAGPFN WTAYQTLLYP SGGAA SPLTA NALRRDTFTL 600	SPGAWLLHCH	IQGHAADGLA LQYIEQPSRL RGLMQQAGAL GRVADQCSSF 600
QPYSWTLLRF	VADNAGLWAF HCHIAWHLEA GLMMQFLSRP DVLARTAVPD 650	NKWYSSWGIP	SESGSI
DVRGLCAAAA	GK		
<b>LAC E</b>		<b>LAC N</b>	
MFWSRCELEF	LSPALVIVV RAGTVTYDWN VTWVWAKPDG FGRPVIGINY 50	MAWRANRAA	LPGRGLVWL LCLLWHGLLA SAATVTYDFN ITWVTANPDS 50
KWFCPTLEAT	VGDTVVVNFL NKLGNQTAGL HFHGVSQLQT PEMDGPSTV 100	MADRRTIGIN	GQWPIPTIRV NVGDRLVVNV LNSLGNESVS LHFHGLFMRN 100
QCPVPPDASV	KYQFTADAPG TFWYHSHNMG QYPDGLRGPL IVHDPNDPYK 150	ATHMDGPAGV	TQCPIPPGSR LTYNFTVDQP GTYWHSHIR GOYPDGLRGP 150
SSYDEEVILS	VSDWYHNSL KAVQGMSPS NTRFAPPID SLIVNEGLGS 200	LIVHDPDSSF	RDKYDEELVM TVSDWYHDPM PGLLSQFLNK ANPTGAEPVP 200
HINVTKGKTY	RIRIINFAAF GSAMIHFDH TMNIIANDAA YVKKTDAYQL 250	NSALLNDTON	LTVSVQPGKT YLFRMVNIGA FAGQYVWFEG HNMTILEVDG 250
RIAPAQRVDV	LIAPLDQDSG NYPFLLISLDL NRDWTNSSQK LQWAHNYTGY 300	YTHPAEASM	IYLAAAQRCS FLITAKNDTL ENFPIVASMD TDLFDQIPDG 300
LVLDSKKKLD	KKDVVNKQWP IDESLLEPYD GAPAYSSYDQ LIQLDFKFLC 350	LNWNVGTWLV	YDSAKPLPDP AVVYDAFEPF DDIGLVPWDN QTLLEGPDPQ 350
DQNGYPRSCF	NNITYISQKV PTLYSVATIG DQNTNPVIYG QVNPFIIVFN 400	ITLDRPQSN	KDSAFFNDIT YVAPKVPTLY TALSGDLAT NSAVYGTYTH 400
QTVQIVVNNI	DTATHPFHLH GHHFQVLARP SSGVGTWPGH EGNVYSTPPM 450	PLVLEKQDQV	EILINLDSG KHPFHLHGE FQVIWRSDDD AGTFADSNVT 450
RDTVTVMSPS	YAVLRFRADN PGVWLFHCHI EWHVEMGLTA TIEAPDRLR 500	ADAFPAIPMK	RDTVVRPENG NMVLRFKSDN PGIWLFHCHI EWHIVSGLMA 500
NLTFPDDHID	VCKKSNTPYQ GNAAGNKNV TDTSGFVTV PTTYSGAVWS 550	TFVEAPLDIQ	KSITLPSDHL AVCAAAGVPT AGNAAANTVN FLDLTGQNAP 550
PSSTTKIPAY	GRPTKTARAV ALAIEDQVDD ESLAEILTQA LSAIFSARKD 600	PPPLPAGFTP	RGIVALVFSC VSGILGVAVV SWYGFAGQVG GQGAAPAVLA 600
		RQGEKQQQKQ	QLGGDGRTGS GAENAGADAG VGOQAAGRR SGEAN

Figura 6-VII Resultado de *Standard Numbering* para las secuencias putativas de lacasas: Lac A, B, C, D, E y N. Se resaltan para cada secuencia los dominios N-terminal y C-terminal, las secuencias firma (L1, L2, L3 y L4), y las predicciones realizadas en *NetOGlyc* y *NetNGlyc* para O-glicosilación y N-glicosilación, cuyo aminoácido N es predominantemente glicosilado.

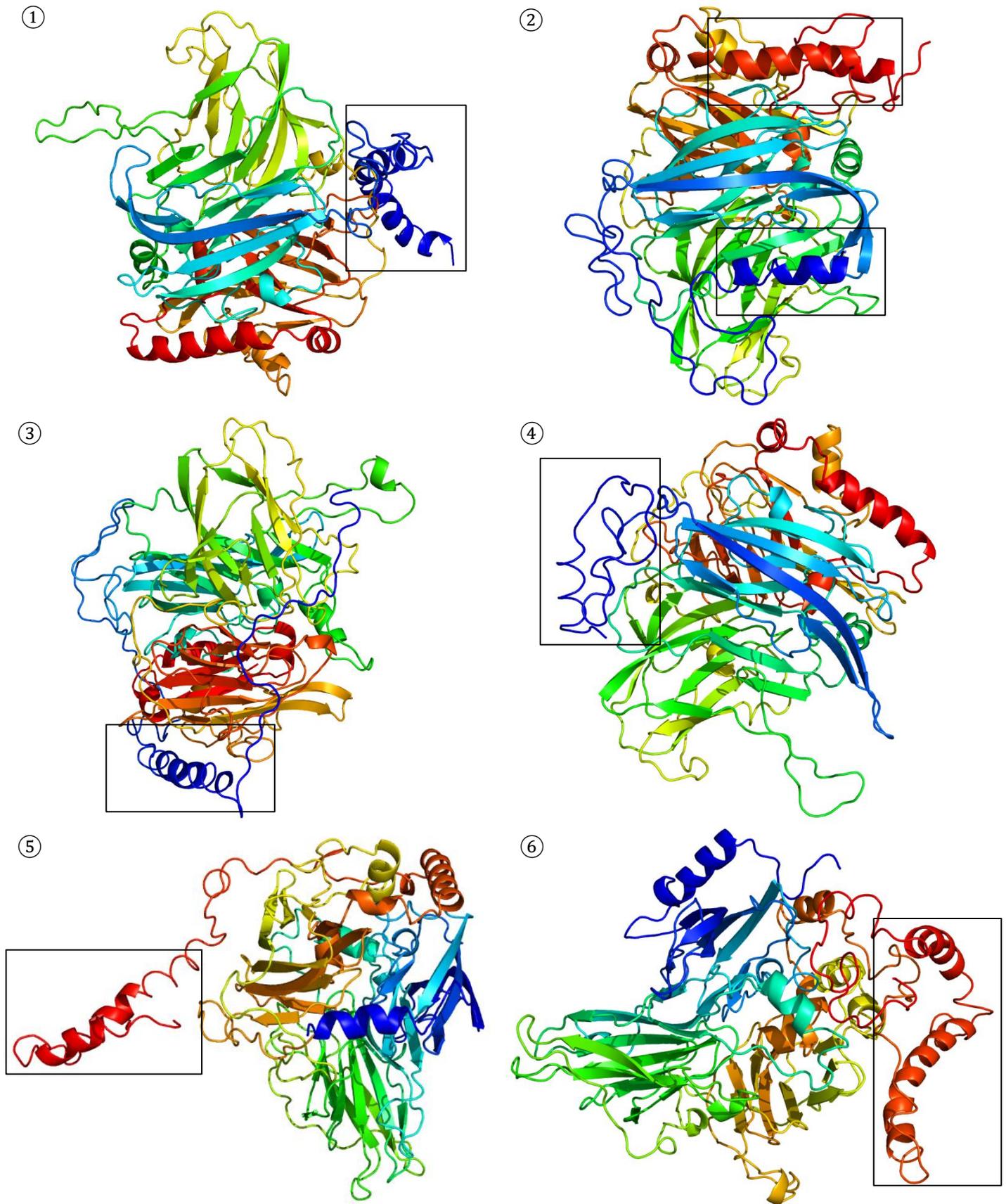


Figura 6-VIII Modelo tridimensional obtenido mediante Phyre2 para ① Lac A, ② Lac B, ③ Lac C, ④ Lac D, ⑤ Lac E y ⑥ Lac N. Se enmarcan las regiones con menor confianza.

Para el establecimiento de los modelos, Lac A, presento identidad (36%) con parte de las estructuras de lacasa de *Thielavia arenaria*, *Melanocarpus albomyces* y *Botrytis aclada*. Lac B mostro una mayor identidad (73-74%) con las mismas estructuras de lacasa de *Thielavia arenaria* y *Melanocarpus albomyces*. Lac C y D mostraron identidad con las mismas estructuras de lacasa que Lac A, en un porcentaje de 30-33% y 36-39%, respectivamente. Lac E muestra identidad (26-38%) con las mismas estructuras que Lac A-D, además de estructuras de lacasa de *Antrodiella faginea* y la enzima fet3p, una MCO con funciones transportadoras de hierro (Fe) de *Saccharomyces cerevisiae*. Lac N mostro identidad (28-48%) con las mismas estructuras que Lac E.

### 6.3 | Diseño de cebadores

Tomando en nucleótidos cada secuencia putativa de lacasa y mediante la herramienta *Primer designing tool* de la plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), se obtuvieron para cada una 5 pares de cebadores. Para su elección se consideró que no incluyeran a las firmas L1-L4 y en lugar incluyeran una región única de cada secuencia putativa (Figura 6-IX). Cumpliendo esto todos cada par fue evaluado con *Oligoanalyzer*, buscando que, de acuerdo con la plataforma IDT, el cambio en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) para la formación tanto de autodímeros, heterodímeros y horquillas fuese mayor a -9 Kcal/mol (Tabla 6-XI). Para Lac D y N, fue necesario considerar más pares de cebadores (Figuras 6-IX-d y f), que las 5 primeras propuestas del software.

Para el diseño de cebadores para  $\beta$ -tubulina de *Tht. C3B1*, se partió primero de la secuencia ya reportada para  $\beta$ -tubulina de *Tht. N-6*, encontrando dentro del genoma de *Tht. C3B1* a la secuencia correspondiente al gen 1494, siendo esta la más idéntica. Esta fue denominada  $\beta$ -tub *Tht C3B1*, y posteriormente, se comparó con otras secuencias reportadas para  $\beta$ -tubulina, encontrando que comparte una alta similitud con secuencias principalmente de ascomicetos (Tabla 6-VIII), además de observarse altamente conservada (Anexo 5).

Considerando esto, los cinco pares de cebadores obtenidos de *Primer designing tool* se compararon con algunos previamente reportados en la literatura, en particular por Einax & Voigt, 2003 (Tabla 6-IX), que proponen dos pares de cebadores para hongos, dos *forward* y dos *reverse*, con cuatro posibles combinaciones, cada uno basado en una región de la secuencia en aminoácidos. La propuesta de estos autores se sustenta, en parte, gracias a trabajos previos donde dichas regiones han sido utilizadas para el diseño de cebadores de  $\beta$ -tubulina con buenos resultados.

Tabla 6-VIII Secuencias de  $\beta$ -tubulina reportadas con las que  $\beta$ -tub Tht C3B1 guarda similitud

Entrada	Fuente	Características	Identidad	Expect	Mycobank
TBB_NEUCR	<i>Neurospora crassa</i>	Ascomiceto	423/428 (99%)	0.0	262212
TBB_EPITY	<i>Epichloe typhina</i>	Ascomiceto	420/428 (98%)	0.0	165057
G2QHT5_MYCTT	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Ascomiceto termofílico	427/428 (99%)	0.0	317955
W8NMT9_9PEZI	<i>Remersonia thermophila</i>	Ascomiceto	427/428 (99%)	0.0	437277
W8NZ29_9PEZI	<i>Mycothermus thermophilus</i>	Ascomiceto termofílico	427/428 (99%)	0.0	807382

Tabla 6-IX Cebadores para  $\beta$ -tubulina fúngica descritos por Einax & Voigt, 2003

Región*	Secuencia del oligonucleótido*	Nombre	Tipo
(Reg1) QA/T GQCGNQ	CARGCYGGTCAR* TGY*GGTAACCA	F- $\beta$ -tub1	F
(Reg2) WAKG H/Y/F YT	TGGGCYAAGGGTY*AYTAYAC	F- $\beta$ -tub3	F
(Reg3) FVEWIP	GGRATCCAYTCRACRAA	F- $\beta$ -tub2r	R
(Reg4) MDEMEFTEA	GCCTCAGTRAA*YTCCATYTCRCCAT	F- $\beta$ -tub4r	R

\*Secuencias y regiones según el código de una letra de IUPAC-IUB, donde R = A o G; Y = C o T.

Es entonces que como criterio de selección para los cebadores de  $\beta$ -tubulina Tht. C3B1 se consideró primero que estos coincidieran total o parcialmente con las regiones 1, 2, 3 o 4, y en un segundo término que tuvieran valores adecuados según *Oligoanalyzer*.

Después del análisis (Tabla X), el par número 1 de cebadores parece ser el más adecuado de acuerdo con su ubicación (Figura 6-IX-g), ya que además de sus valores de  $\Delta G_A$ ,  $\Delta G_H$  y  $\Delta G_\Psi$ , coincide con la región común 2 (Reg2), a partir de la cual se diseñó el oligonucleótido denominado F- $\beta$ -tub3.

Tabla 6-X. Evaluación de cebadores para  $\beta$ -tub C3B1

Par	Secuencias (5'→3')*	Ubicación*	GC*	TP*	Tm*	PM*	$\Delta G_A^{**}$	$\Delta G_H^{**}$	$\Delta G_\Psi^{**}$
1	F CCGCTTTTGGCAGACCATC	53-72	55	140	60.11	6044	-5.02	-6.68	-0.92
	R GACGGCAGAGGGACATAC	192-174	63.16		60.23	5871.9	-3.61		-2.61
2	F GCCTCCGGCAACAAGTATGT	160-179	55	141	60.68	6102	-9.75	-15.35	-1.61
	R GTTGTGGCCAGCACCAGACT	300-281	55		61.10	6093	-5.09		0.67
3	F GTGCCGCTTTTGGCAGAC	50-68	57.89	140	60.66	5810.8	-8.16	-9.5	-2.72
	R GGCACGAGGGACATACTTGT	189-170	55		59.75	6182.1	-3.61		-0.23
5	F CGGCCAATGCGGTAACCAAA	27-46	55	140	61.87	6120	-9.28	-9.28	-0.49
	R CGGAGGCCTCGTTGAAGTAG	166-147	60		60.18	6198.1	-15.62		0.41

\*Obtenido mediante *Primer designing tool*\*\*Obtenido mediante *Olygoanalyzer*. F, forward. R, reverse. GC, cantidad de Guanina/Citosina (%). TP, tamaño de producto esperado (número de nucleótidos). Tm, temperatura de fusión (°C). PM, peso molecular (g/mol).  $\Delta G$ , cambio en la energía libre de Gibbs (kcal/mol) para la formación de: A, autodímero. H, heterodímero.  $\Psi$ , horquilla. Se enmarca el par elegido.

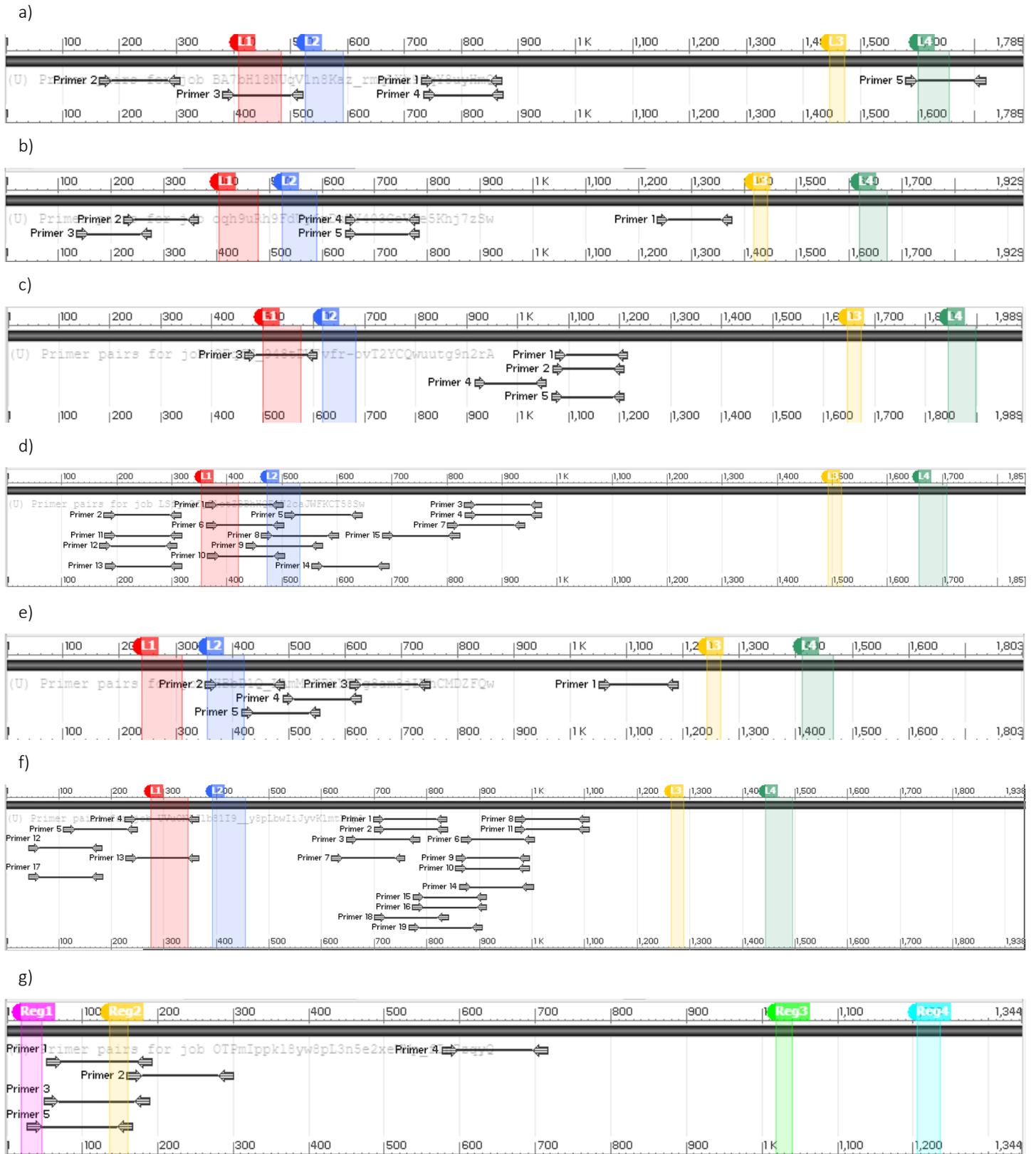


Figura 6-IX Representación gráfica de la posición de los 5 pares de cebadores obtenidos por *Primer designing tool* a lo largo de cada secuencia putativa de lacasa: A) Lac A, B) Lac B, C) Lac C, D) Lac D, E) Lac N y G)  $\beta$ -tubulina. Se resalta también la ubicación de las secuencias firma L1-L4, y las regiones comunes para  $\beta$ -tubulina si fueran retrotranscritas y sobrepuestas sobre las secuencias para lacasas y  $\beta$ -tubulina.

Tabla 6-XI Evaluación de cebadores para Lac A, B, C, D, E y N

Par		Secuencias (5'→3')*	Ubicación*	GC*	TP*	Tm*	PM**	ΔGA**	ΔGH**	ΔGΨ**
1	F	AACAACCTGATCGACGGCAA	730-749	50	141	60.25	6104	-6.76	-8.18	0.17
	R	CGAATTGATCAGACGCAGGC	870-851	55		59.70	6151	-8.53		-0.03
2	F	GGATTCCCATGGGGCTCTTT	166-185	55	140	59.74	6115	-17.66	-6.14	-0.75
	R	AGGAGAACGTCCCCTGGTA	305-286	55		60.54	6182.1	-6.9		-1.84
4	F	ACCTGATCGACGGCAAGATG	734-753	55	140	60.18	6151	-6.76	-8.18	0.22
	R	GCCCCAATTGATCAGACGCA	873-854	55		61.09	6111	-8.53		-0.03
1	F	GCTGTTCGTCTGGAAGGTCA	1236-1255	55	141	59.97	6164	-3.61	-6.6	0.15
	R	TATGTCCACTGGTTAGCCGC	1376-1355	55		59.82	6084	-5.02		-0.04
2	F	CACTCGGAAGTACACCCTGG	225-244	60	141	59.75	6087	-3.65	-6.78	-0.21
	R	ATTTTCGAGATTGTCGCCCA	365-346	50		59.75	6068	-6.76		-1.28
3	F	AGCTGCAACACACCGTCTAA	136-155	50	141	59.89	6055	-7.05	-6.68	0.64
	R	CGGGCCTTCCAGTTGGTAG	276-257	60		60.68	6140	-9.28		-0.76
4	F	CACGGACTGGTACAACCTGA	645-664	55	140	59.32	6111	-4.41	-4.95	-0.92
	R	GCGTCACATTGGCGTACTTG	784-765	55		60.18	6124	-3.65		-1.13
5	F	TCACGGACTGGTACAACCTG	644-663	55	140	59.32	6102	-4.41	-4.95	-0.92
	R	CGTCACATTGGCGTACTTGC	783-764	55		60.18	6084	-3.65		-0.41
1	F	ATTCACGTTGCTCAGCGGTA	1075-1094	50	141	60.04	6108	-6.3	-4.95	-0.77
	R	GATGACGGCTTTCGTTGTTCG	1215-1196	55		59.91	6155	-4.95		-1.63
2	F	TTCCCAATTCACGTTGCTCA	1069-1088	50	140	59.89	5978.9	-6.3	-6.91	1.31
	R	GCTTTCGTTGTCGTGTCGAG	1208-1189	55		59.84	6146	-6.76		-0.8
4	F	TACTCCGTCTTGTGCTGGA	916-935	55	141	60.61	6075	-4.64	-13.37	0.01
	R	TACCGTTCGACAGCGTAG	1056-1037	55		59.76	6133	-12.43		-0.94
5	F	GGTTCACATTCACGTTGCT	1067-1086	55	141	60.89	6034.9	-6.3	-6.91	0.09
	R	CTTTCGTTGTCGTGTCGAGC	1207-1188	55		59.84	6106	-6.76		-0.8
2	F	CGTCGAGTATGACCTCACGG	177-196	60	140	59.97	6118	-6.76	-5.19	-0.57
	R	TGTGGACAGTATTTCGAGA	316-297	50		59.32	6197.1	-3.61		0.01
3	F	GGCCACAACCTCACCGTCAT	832-851	55	140	60.89	6022	-9.28	-10.36	1.41
	R	CAGAAGTTGGTTCCGTTGGC	971-952	55		59.69	6164	-3.61		-0.21
4	F	GCCACAACCTCACCGTCATC	833-852	55	140	59.48	5981.9	-3.61	-10.36	1.58
	R	CCAGAAGTTGGTTCCGTTGG	972-953	55		59.05	6164	-5.02		-0.91
13	F	TCGAGTATGACCTCACGGTCT	479-499	52.38	140	60.07	6397.2	-6.76	-5.19	-2.85
	R	GTTGTGGACAGTATTTCGAG	318-298	52.38		59.8	6517.3	-3.61		0.22
1	F	GACCAGAACGGATAACCCACG	1051-1070	60	141	60.18	6105	-3.61	-7.48	-1.23
	R	GACGATGAACGGGTTGACCT	1191-1172	55		60.04	6182.1	-4.41		-1.6
3	F	GTCACCAAGGGCAAGACGTA	610-629	55	141	59.97	6160.1	-6.31	-6.53	0.54
	R	CAACTGGTAGGCGTCAGTCT	750-731	55		59.4	6133	-4.89		-0.94
4	F	TGGTATCACAAACAGCAGCCT	490-509	50	140	59.31	6086	-3.14	-5.09	0.41
	R	TACGTCTTGCCCTTGGTGAC	629-610	55		59.97	6075	-6.3		0.22
5	F	GCTGATTGTGCACGACCCTA	417-436	55	140	60.39	6093	-9.73	-3.61	0.01
	R	GCGCGAAACGAGTGTAGAG	556-537	55		59.64	6231.1	-10.36		-1.59
1	F	GCAGTACGTCTGGTTCGAGG	699-718	60	140	60.46	6189	-6.76	-5.19	-1.66
	R	AGGTATCGTCTTCGCGGTG	838-819	55		60.18	6155	-10.36		-0.71
2	F	CAGTACGTCTGGTTCGAGGG	700-719	60	140	59.83	6189	-6.76	-5.19	-0.94
	R	AAGGTATCGTCTTCGCGGT	839-820	50		59.47	6139	-10.36		-0.71
3	F	AGCCTGGCAAGACATACCTC	647-666	55	140	59.46	6071	-6.21	-6.21	-0.23
	R	GTAGATCATGCTCGCCTCGG	786-767	60		60.39	6109	-5.38		0.24
5	F	ACGACTTCAACATCACCTGGG	110-130	52.38	141	60.27	6375.2	-3.61	-6.82	-0.03
	R	GCGAGTTGAGCACATTGACG	250-231	55		60.18	6182.1	-3.61		-0.08
19	F	GACACCCAGAACTTGACCGT	766-785	60	140	62.15	6062	-6.21	-6.68	-0.11
	R	GTGTAACGCCGTCGACCT	905-886	55		60.39	6115	-9.75		-0.69

Lac **A, B, C, D, E y N** \*Obtenido mediante *Primer designing tool*\*\*Obtenido mediante *Olygoanalyzer*. F, forward. R, reverse. GC, cantidad de Guanina/Citosina (%). TP, tamaño de producto esperado (número de nucleótidos). Tm, temperatura de fusión (°C). PM, peso molecular (Dalton). ΔG, cambio en la energía libre de Gibbs (kcal/mol) para la formación de: A, autodímero. H, heterodímero. Ψ, horquilla. Se enmarca el par de cebadores seleccionado para cada secuencia.

## 6.4 | Evaluación de cebadores con gDNA

Se obtuvieron 100  $\mu$ l de DNA en buffer TE con buena integridad (Figura 6-X-a). A partir de este, se ejecutó amplificación por PCR con un gradiente térmico de 55°C a 65°C en el alineamiento. Todos los cebadores, excepto los diseñados para Lac D, mostraron efectividad (Figura 6-X-b).

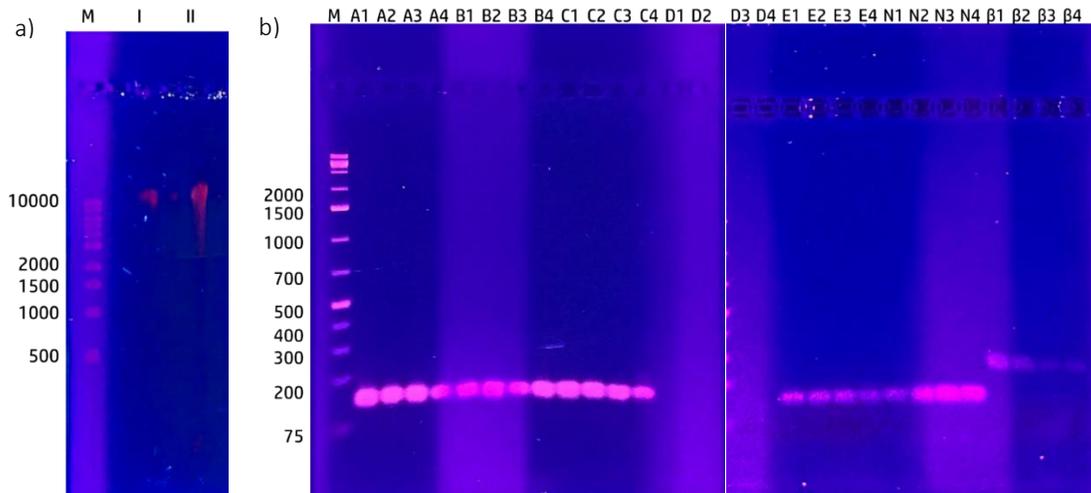


Figura 6-X a) Extracción de gDNA de *Tht. C3B1* a partir de cultivo en PDA de 3-4 días. M, marcador de tamaño molecular. I, muestra de gDNA (1  $\mu$ l), II, muestra de gDNA (5  $\mu$ l). b) PCR con gradiente térmico a 1 (55.7°C), 2 (58.8°C), 3 (63.0°C) y 4 (65.0°C). M, marcador de tamaño molecular, A, cebadores para lac A, B, cebadores para lac B. C, cebadores para lac C, D, cebadores para lac D. E, cebadores para lac E. N, cebadores para lac N.  $\beta$ , cebadores para  $\beta$ -tubulina.

## 6.5 | Extracción de RNA y detección de expresión

Para ZMO y ZMM la extracción se realizó a partir de cultivos con 3 días de incubación, mientras que para ZMO+Cu y ZMM+Cu con 5 días de incubación y 2 en inducción, buscando reproducibilidad con las cinéticas determinadas y un estado integro de la biomasa. Las actividades registradas para ZMO, ZMM, ZMO+Cu y ZMM+Cu fueron de 0.9, 1.8, 6.7 y 2.8 U/l, respectivamente (Figura 6-XI). A partir del RNA extraído, se

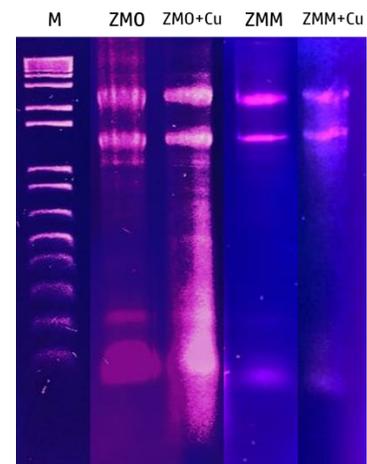


Figura 6-XI Extracción de RNA de cultivos en medios diferenciados ZMO y ZMM con y sin inducción. M, marcador de tamaño molecular.

En el medio ZMO el efecto inductivo es visible a nivel transcripcional, mientras que, en el medio sin inducción, solo se confirma la expresión basal de la  $\beta$ -tubulina. En el medio inducido pareciese que la mayoría

de los genes putativos para lacasa tienen una expresión detectable, y aunque es variable entre replicas, exenta a Lac D. En el caso de ZMM, el efecto inductivo no es claro, aunque si el del medio, pues en ambos casos se confirma la expresión de todos los genes putativos. Estos resultados fueron reproducibles con 27 ciclos (Figura 6-XIII).

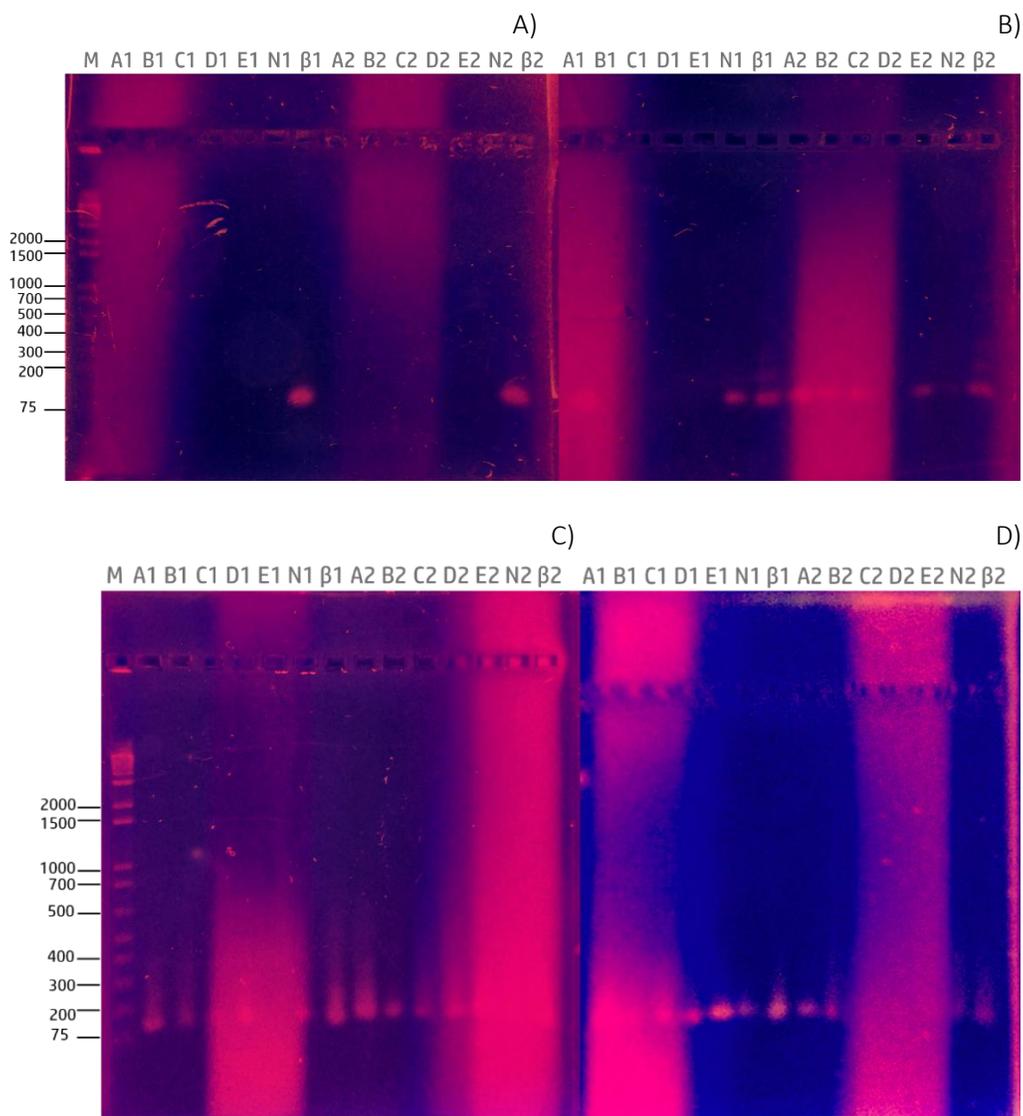


Figura 6-XII Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación por PCR de librerías de cDNA con cebadores para lac A-N. A) Medio ZMO sin inducción, B) Medio ZMO+Cu con inducción. C) Medio ZMM sin inducción y D) Medio ZMM+Cu con inducción. A, Lac a. B, Lac b. C, Lac c. D, Lac d. E, Lac e. N, Lac n. 1, primera librería de cDNA. 2, duplicado de librería de cDNA.

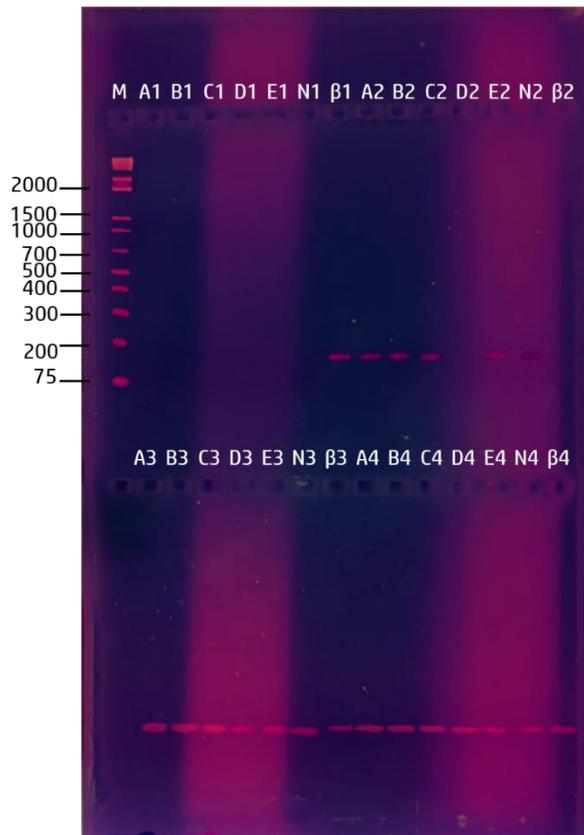


Figura 6-XIII Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de productos de PCR (27 ciclos), M, marcador de tamaño molecular. 1, ZMO, 2, ZMO+Cu. 3, ZMM y 4, ZMM+Cu. A, Lac A, B, Lac B. C, Lac C. D, Lac D. E, Lac E. N, Lac N.  $\beta$ ,  $\beta$ -tubulina.

## 7

## DISCUSIÓN

En este estudio se evidencian distintas respuestas en la producción de lacasas por *Th t.* C3B1 a través de cultivos sumergidos en medios diferenciados en fuentes de C y N (ZMO y ZMM) e inducción por Cu (ZMO+Cu y ZMM+Cu). Considerando en principio, que este tipo de cultivos de hongos filamentosos pueden crecer en forma difusa o corpuscular (pellet), el crecimiento de *Th t.* C3B1 en ZMO resultó más bien mixto, primero en forma de pellets de gran tamaño y después en lisados agregados; mientras que en ZMM se desarrolló en forma de pellets pequeños, así como con la aparente generación de pigmentos rojizos/ocre.

Diferencias en el tipo de crecimiento, como las antes mencionadas, se han relacionado con el contenido de biomoléculas en la biomasa de hongos; en el caso de *Thielavia terrestris*, generalmente una mayor proporción de proteínas y ácidos nucleicos en los cultivos con crecimiento difuso, y de lípidos y metabolitos extracelulares en los cultivos en pellets. Significando además para este último, el predominio de procesos catabólicos sobre anabólicos (Grube *et al.* 1999 Gromosova *et al.* 1991).

Con la evaluación de generación de biomasa y de actividad enzimática se encontró que los cultivos en ZMO tenían un mayor crecimiento y actividad de lacasa en comparación con los cultivos en ZMM. Sin embargo, considerando lo antes descrito y dado que las lacasas son extracelulares en su mayoría, podría esperarse una mayor actividad de lacasa en los cultivos en ZMM. Quizás esto no ocurrió debido a que el crecimiento en forma de pellets se caracteriza también por tener una densidad inversamente proporcional a su porosidad, haciendo al oxígeno un factor limitante, además de depender para su formación de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre las esporas y el medio (Veiter *et al.* 2018). Así los cultivos en ZMM tuvieron una limitada producción de biomasa al quizás limitarse la entrada de oxígeno por la compactación de los pellets. En cambio, en ZMO, una mayor cantidad de biomasa significaría también más proteínas y ácidos nucleicos que podrían haberse reflejado en una mayor actividad enzimática para lacasa.

Las diferencias en el aspecto morfológico y en los valores de biomasa en ambos medios se pueden referir claramente a cambios en las fases de crecimiento, y si se considera que las lacasas se generan principalmente durante el metabolismo secundario, que se suele empatar con la fase estacionaria (Fox & Howlett 2008; Calvo *et al.* 2002), un análisis de los mecanismos de regulación en esta fase podría dar más indicios de los mecanismos en *Th t.* C3B1 para la expresión de lacasas. Cabe

mencionarse entonces, que la regulación de la producción de metabolitos secundarios en hongos responde a varios factores, como las diferentes fuentes de C y N y sus concentraciones, la temperatura, el pH, entre otros; y que son generalmente identificados y transmitidos a través de reguladores, como CreA, encargado de la señalización de carbono y que por tanto afecta los niveles de transcripción de los metabolitos (Shwab & Keller 2008; Elisashvili & Kachlishvili 2009)

En el presente trabajo, se buscó que los nutrientes diferenciados de los medios actuaran como factores de regulación, dado que pueden promover e inhibir cambios metabólicos, así todos los cultivos se incubaron bajo las mismas condiciones de agitación, pH y temperatura. Como se mencionó en el capítulo 5, el medio ZMO corresponde a la formulación original de Zouari-Mechichi *et al.* 2006, misma que en estudios posteriores del mismo grupo de trabajo ha sido utilizada para la obtención de lacasas de *Chaetomium* sp. (Mtibaà *et al.* 2017); sin embargo, previo a estos, se reportaron medios basales con sales minerales y extracto de malta (Arora & Gill 2001), medios con glucosa y tartrato de amonio y enriquecido con sales (Pointing *et al.* 2000; Raghukumar *et al.* 1994). Estos mismos compuestos pueden rastrearse hasta reportes clásicos, donde estos se sustentaban en el aislamiento de fuentes (Law 1955), por lo que todos estos suelen ser comunes en los medios para producción de lacasas por hongos. Analizando la composición de los medios, los elementos más contrastantes sean la fructosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) como fuente de C y el nitrato de sodio ( $NaNO_3$ ) como fuente de N en ZMM.

En este sentido, los estudios de optimización de la producción de lacasas fúngicas a través de medios de cultivo son amplios y diversos, y aunque principalmente enfocados en basidiomicetos; no apuntan a condiciones únicas y exactas de cultivo para obtener niveles altos de actividad, señalando en su lugar que estas son particulares y dependen de la adaptabilidad de cada microorganismo fuente. Así, para las fuentes de C, encontramos reportes de aumento en la actividad de lacasa gracias a la fructosa como única fuente de C en cultivos de *Polyporaceae* sp. (Mansur *et al.* 1997), mientras que en organismos como *Edenia* sp. no se observó un efecto significativo en la actividad de lacasa al utilizar fructosa como fuente de C, pero si la formación de un excelente LMS al provocarse la generación de complejos borato-fructosa (Cheng *et al.* 2015).

Esta selección de una fuente de carbono lo más energéticamente favorable responde a la represión catabólica por carbono (CCR - del ingl. *Carbon catabolite repression*), sustentada en la represión de enzimas para el aprovechamiento de fuentes secundarias, cuando un organismo tiene acceso a una fuente de carbono más fácilmente asimilable; siendo la glucosa, la fuente de carbono

preferencial para la mayoría de los microorganismos, porque rápidamente se metaboliza y genera energía útil para el crecimiento, en comparación con otros azúcares. En los hongos filamentosos este mecanismo parece ser más complejo que en otros como las levaduras, ya que no solo se regula por glucosa sino también por las altas concentraciones de otros monosacáridos, incluidas las pentosas (Ronne 1995; Jones *et al.*, 2017; Adnan *et al.* 2018)

Comparando las concentraciones de las fuentes de carbono en los medios diferenciados, en ZMM se utilizó el doble de azúcares (20g de fructosa) que en ZMO (10g de glucosa), en términos de masa/volumen (1 litro), misma relación que se conserva en términos de molaridad (110 mM en ZMM y 55 mM en ZMO), al tener ambos azúcares pesos moleculares muy similares. Esta concentración de fructosa pudo haber ocasionado represión catabólica en C3B1 que a su vez podría haber ocasionado la represión parcial directa o indirecta de uno o varios promotores y/o genes codificantes para lacasa, como ya ha sido registrado en especies de *Trametes* sp donde altas concentraciones de glucosa inhibieron la transcripción de lacasas (Galhaup *et al.* 2002; Xiao *et al.*, 2005). Probablemente el mecanismo sea similar al mediado por CreA sobre la represión, por ejemplo, de los inductores de los genes codificantes para xilanasas en *Aspergillus nidulans* (Tamayo *et al.* 2008) o de celulasas en el ascomiceto termófilo *Humicola insolens* (Xu *et al.* 2019), ya que esta regulación es esencial para el crecimiento en diversas fuentes de carbono, nitrógeno y lípidos, además, del transporte de aminoácidos y la asimilación de nitrógeno (Ries *et al.* 2016).

En adición a la mediación catabólica, los hongos también pueden presentar niveles de organización de transporte de azúcares, los cuales no parecen estar mediados por CreA y por tanto no se reflejan en la regulación transcripcional del catabolismo de carbono. En cultivos con mezclas de azúcares, *Aspergillus niger*, ha mostrado importar parte de ellos secuencialmente y no simultáneamente, siendo claramente la glucosa la fuente preferencial. (Mäkelä *et al.* 2018).

Referente ahora a las fuentes de N, los hongos utilizan preferencialmente amonio y glutamina, y en su ausencia pueden usar nitratos, urea, ácido úrico, aminos, amidas, purinas y pirimidinas (Tudzynski 2014). Las diferencias entre los medios ZMO y ZMM son más notorias que las del C, mientras el primero cuenta con fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas, como tartrato de amonio, peptona y extracto de levadura; el segundo solo cuenta con una fuente inorgánica, nitrato de sodio. La respuesta de los hongos frente a una determinada fuente es muy variable y depende del tipo de fuente y su concentración; en muchos de estos (excepto *Saccharomyces cerevisiae*), el nitrato de sodio como fuente de N es de fácil asimilación mediante su reducción a amonio, requiriendo para

ello del ensamblaje de un cofactor, una permeasa para transportar el nitrato a la célula y una nitrato y nitrito reductasa (Keller & Hohn 1997; Mazluf 1997).

En lo relacionado a lacasas, se ha reportado que *Lentinula edodes* alcanza su máximo de actividad de lacasas en cultivos con altas concentraciones (26 mM) de nitrato de amonio y L-asparagina, mientras que en *Pleurotus sajor-caju* la concentración de estas fuentes de N no parece influenciar la producción y actividad de lacasa, (Buswell *et al.* 1995; Fu *et al.* 1996).

De manera canónica, esta selección de fuentes de N se refiere a la represión metabólica por nitrógeno prefiriendo aquellas fácilmente asimilables o secundarias de acuerdo con una determinada circunstancia o estímulo. En ascomicetos suele estar mediado por factores de transcripción como los genes *areA* en *A. nidulans* y *Nit-2* en *Neurospora crassa*, considerados ortólogos. En las lacasas *lcc1* y *lcc2* del basidiomiceto I62 y *lac4* de *P. sajor-caju* se han encontrado sitios de unión a *Nit-2* en la región aguas arriba (Mansur *et al.* 1998). Existen además otros mecanismos reguladores que relacionan las fuentes de N con otros factores como la temperatura, como el identificado en el basidiomiceto *Cryptococcus neoformans*, donde un gen relacionado con la represión metabólica por nitrógeno, *TAR1*, es responsable de un aumento significativo en el nivel de mRNA de la lacasa *LAC1* a 37 ° C y cuya región promotora contiene repeticiones de TTC / GAA que probablemente sean los sitios de unión del factor de choque térmico (HSF) (Jiang *et al.* 2009).

Así, de manera similar a las fuentes de C, las fuentes de N debieron tener un efecto regulador en la expresión de lacasas en los medios ZMO y ZMM; siendo probablemente más compleja en el primero dado que hay diferentes fuentes de N y estas pudieron interactuar entre sí y a su vez tener efectos en conjunto, mientras que en ZMM el efecto del nitrato de sodio puso ser más directo. Aun con esto, en ambos medios es claro que el efecto de la fuente de N no es aislado al de las fuentes de C, ni otros factores como la temperatura y el pH.

Revisando ahora el efecto inductivo del Cu sobre la producción y actividad de lacasas, este se encuentra muy bien documentado, partiendo de la identificación de este metal como parte de la estructura de las lacasas y su posterior suplementación en los medios de cultivo generalmente como solución de sulfato cúprico (Bocks 1967; Gilbert 1952), apuntando recientemente a nuevas formas de suministro, por ejemplo, en nanopartículas (Ghany *et al.* 2020). En todos los casos de estudio se ha especificado como ciertas concentraciones resultan beneficiosas a través de la inducción, y como otras, generalmente mayores, resultan dañinas volviéndose tóxicas y afectando el crecimiento y estructura del organismo. Como se ha reportado en *Trichoderma virens* y *Rosea clonostachys*, donde

metales como el Cu, disminuyen la tasa de utilización de carbono, afectando en consecuencia al crecimiento (Ramsay et al. 1999 citado en Fomina *et al.* 2003).

Es en nuestro caso, visto el primer efecto, la solución 1 mM de sulfato cúprico logro inducir e incrementar la actividad de lacasas en ambos medios, predominantemente en ZMO que en ZMM, quizás al ser en este último donde se presume CCR. Este efecto inductivo está comprobado a niveles transcripcionales en organismos como *Ceriporiopsis subvermispota* y *Trametes versicolor*, donde la expresión de lacasas es regulada por factores de transcripción de tipo ACE (Alvarez *et al.* 2009; Gralla *et al.* 1991; Collin & Dobson 1997), por lo que podría suponerse que los mecanismos en *Tht.* C3B1 también se regulen por factores similares.

A continuación, se describen los resultados de otros estudios con los que existe cierta perpendicularidad con los resultados antes descritos.

En los hongos termófilos *Thielavia terrestris*, *Malbranchea cinnamomea* y *Scytalidium thermophilum*, se evaluó la generación de L-asparaginasas a partir de diversas fuentes de C y N, entre estas se consideraron glucosa, fructosa, nitrato de sodio y extracto de levadura. En términos de desarrollo de biomasa para *T. terrestris*, la glucosa y la fructosa fueron las mejores fuentes de C, en ese orden; mientras que el extracto de levadura fue la 4ta mejor fuente de N y el nitrato de sodio mostro ser una fuente pobre para el crecimiento (Shanthipriya *et al.* 2015).

En el medio ZMO (citado: Mtibaà *et al.* 2017), se cultivó un hongo identificado como *Thielavia* sp, obteniendo al 8vo día de incubación una actividad específica de 0.26 U/mg (Mtibaà *et al.* 2018).

En *Trichoderma viride* y *Trichoderma longibrachiatum* se obtuvieron como actividades máximas de lacasa, 3 U/ml y 2.25 U/ml, respectivamente; ambas alcanzadas a las 96 horas de incubación (inicio de la fase estacionaria), a partir de la inducción con sulfato cúprico (10 mg/ml) desde el día cero y con 20 g/l de glucosa y 0.5 g/l de glutamina como nutrientes. Concentraciones mayores a 20 g/l de glucosa provocaron CCR. No se observó correlación entre el desarrollo de biomasa y la actividad de lacasa (Krastanov *et al.* 2007).

Se probaron ocho distintos medios de cultivo para la generación de lacasa por *Penicillium martensii* NRC 345, los mejores resultados se obtuvieron con nitrato de sodio (0.2 g/l) como fuente de N, una vez confirmada galactosa (5 g/l) como la mejor fuente de C. La adición de sulfato cúprico no produjo efecto inductivo relevante (Elshafei *et al.* 2012).

Mediante Metodología de Superficie de Respuesta y Diseño de Compuestos Centrales, se mejoró la actividad de lacasa de *Penicillium chrysogenu*, hasta un máximo de 7,9 U/ml, siendo las variables más significativas el pH (5.5), glucosa (17g/l) como fuente de C, extracto de levadura (1.3g/l) como fuente de N y la inducción con sulfato cúprico (0,9986 g/l) (Senthivelan et al. 2019).

De acuerdo con lo anterior, *Tht*, C3B1, al igual que otros hongos, tiene como fuente preferencial de C, a la glucosa y es susceptible de presentar CCR con diversos azúcares, como presuntamente ocurrió en ZMM con la fructosa. El crecimiento de *Tht*, C3B1 fue afectado también por la fuente de N, siendo la menos favorable nitrato de sodio en ZMM, en comparación con ZMO, donde fue mayor el desarrollo de biomasa. La actividad enzimática y el crecimiento se observan relacionados, aunque no directamente. La presencia de Cu 1mM en ambos medios incremento la actividad enzimática. Así ZMO es el mejor medio para el crecimiento y generación de lacasa en *Tht*. C3B1, en contraste a ZMM.

Esta deducción, podría ser válida solo para *T. terrestris* como productor de lacasas en cultivos en medios de composición igual a la de ZMO, pues bien, la respuesta en la producción de lacasas por optimización o mejora de medios se presumía diversa según el organismo y condiciones de estudio, incluso variante aun manteniendo esto homologado. Tal y como ocurre con los resultados reportados por Gutiérrez-Antón, y que son en realidad el origen y antecesor del aquí versado. En este, la actividad de lacasa de *Tht*. C3B1 obtenida en el medio (ZMM) con fructosa (20 g/l) como fuente de C y nitrato de sodio (5 g/l) como fuente de N, alcanzó su máximo (25.28 U/i) en el día 12 de cultivo, comparado con el medio (ZMO) con glucosa y tartrato de amonio donde se detectó una actividad máxima de lacasa de 3.27 U/l en el día 13 de cultivo.

Por otra parte, lo que pudiese ser más concluyente es el efecto del Cu (sulfato cúprico), que en ambos estudios hizo que la actividad de lacasa se viese incrementada, en el caso de Gutiérrez-Antón, los mejores resultados se generaron al inducir al 4to día de incubación con una concentración 1 mM de Cu en el medio ZMM con una actividad máxima de lacasa de 862.76 U/l en el décimo día de cultivo, 34 veces más que el obtenido en medio sin Cu (25.28 U/l).

Con la detección de expresión, se corrobora que en *Tht*. C3B1 cultivado en ZMM se expresan todos los genes putativos de lacasa, mientras que en ZMO solo se expresan algunos a excepción de Lac D, como ocurrió en las pruebas preliminares con gDNA, debido probablemente a la presencia de un intrón o parte de este en el cebador, lo cual es resuelto con la síntesis de cDNA. Sin embargo

también sería válido suponerse que para la expresión de Lac D se requiere del estrés nutricional provocado por ZMM.

La presencia de las bandas correspondientes a  $\beta$ -tubulina en todas las condiciones y la ausencia total de bandas correspondientes a lacasas en ZMO, corrobora que todos los genes codificantes para lacasa considerados son inducibles, pese a que todos se hayan confirmado en ZMM, así como también existen reportes de genes para lacasa constitutivos en *Pleurotus sajor-caju*, aun cuando la actividad de lacasa se ve afectada por los nutrientes nitrógeno y carbono, y por la adición de cobre y manganeso al medio de crecimiento. (Solen & Dobson 2001). Es importante aunar que, dependiendo del agente inductor, se puede presentar una regulación a nivel transcripcional, postranscripcional y postraducciona, y por tanto la actividad de lacasa en el medio comienza a aumentar después de determinado tiempo superada la regulación (Linden *et al.* 1991).

Pero ¿Porque si pareciese que ZMM logra inducir la expresión de todos los genes putativos de lacasa, esta expresión no se ve reflejada en los niveles de actividad enzimática?, lo cierto es que se requeriría de cuantificación de dichos niveles de expresión, así quizás, aunque ZMM induzca más genes que ZMO, este último puede inducir menos genes, pero en un mayor nivel transcripcional. Otra consideración, aunque menos probable, es la presencia de lacasas de acumulación en cuerpos fructíferos, que hasta ahora solo se han reportado en *Lentinula edodes* (Yano *et al.* 2009)

Por otra parte, aunque en principio se partió del trabajo de Gutiérrez-Antón, el crecimiento de los cultivos en ZMM obtenidos entre el trabajo antes citado y el presente, fueron distintos. En el primero se obtuvo poca generación de biomasa, siendo compacta y oscura, en contraposición al segundo, donde se incrementó considerablemente la generación de biomasa, lo que permitió la extracción de RNA. Este cambio morfológico, parece explicarse con la modificación del volumen del cultivo (75ml de medio líquido contenido en matraz de 125ml), lo que quizás pudo generar anoxia en los cultivos, condición que se asocia con el metabolismo anóxico de nitratos y que produce un aumento de la biomasa (Zhou *et al.* 2001).

Es también contrastante la generación de pigmentos rojizos en nuestros cultivos y dado que en muchas especies fúngicas se han asociado a las lacasas con la polimerización de pigmentos (Chang *et al.* 2020), pudiese ocurrir que la mayoría de estas enzimas presentes en el extracto de ZMM se encuentren reaccionando con algún compuesto a fin de generar pigmentos y por tanto no sean detectables por reacción con ABTS. Siendo este caso, una de las causas de variaciones en la medición de actividad enzimática de lacasa (Baltierra-Trejo *et al.* 2015).

La generación de pigmentos en cultivos de hongos, es bien conocida, principalmente en hongos ascomicetos filamentosos y en un amplio rango de colores (Gmoser *et al.* 2017), las lacasas se han relacionado con la generación de un pigmento verde resultado de la conversión de una naftopirona (un pigmento amarillo) generado por una policétido sintasa en *Aspergillus nidulans* (Keller *et al.* 2005), mientras que en *Metarhizium anisopliae* y *Cryptococcus neoformans*, se han relacionado algunas vías del metabolismo secundario a lacasas exclusivas en la generación de catecolaminas por reacciones de polimerización oxidativa de dihidroxifenoles, y que son propiciadas solo durante el crecimiento isotrópico, es decir, posterior a la conidiación, y que es indicativo de condiciones ambientales adversas (García-Rivera *et al.* 2005; Fang *et al.*, 2010). De ser cierta, esta síntesis de pigmentos, por ejemplo, melanina, también puede ser inducida por adición de cobre en bajas concentraciones (0.01 mM) (Caesar-Tonthat *et al.* 1995).

En este sentido, también puede suponerse un efecto nocivo del sulfato cúprico (1 mM) sobre los cultivos en ZMM, que tras tres días de crecimiento ya se encuentran bajo estrés, con sulfato cúprico 1mM se pueden alcanzar niveles tóxicos, ocasionando retraso en el crecimiento y cuya regulación es dependiente de factores propios de la homeostasis de este ion metálico (Fonseca *et al.* 2010; Park *et al.* 2017)

De esta manera se puede relacionar también la adición de sulfato cúprico con la generación de lacasas y cambios morfológicos en el crecimiento fúngico. Sakamoto *et al.* 2018, reportaron en *Lentinula edodes*, estructuras de hifas anormal y una pared celular más delgada en el micelio de cepas con genes codificantes silenciados.

Puede añadirse, de acuerdo con la metodología para la medición de actividad enzimática, que esta depende de la capacidad de reacción de la enzima y esta en parte esta dada por su potencial de oxido reducción, originado inherentemente por características estructurales de las lacasa, como son los residuos presentes en los dominios N y C terminal, que se ha comprobado afectan las propiedades catalíticas y de estabilidad de las lacasas afectando sus actividades específicas para sustratos como ABTS y guayacol (Hu *et al.* 2014). La glicosilación en las mismas regiones puede afectar la afinidad de unión a los sustratos, la velocidad catalítica y estabilidad térmica (Xu *et al.* 2019)

El efecto inductivo de la adición de Cu a los medios de cultivo volvió a ser corroborado, ahora a nivel transcripcional en ZMO+Cu, donde se indujo la expresión de varios genes de lacasa en comparación con ZMO, mientras que en ZMM+Cu se requiere de cuantificación para confirmar un aumento posterior a la adición de cobre. Sin embargo, en ambos casos puede presumirse efecto

particular sobre lacasas, pues en ambos medios se identificó la expresión de Lac B, secuencia con mayor identidad a la reportada como lacasa de *Tht.* N-6

Este efecto fue también identificado en especies como *Trametes hirsuta* y *Botrytis cinérea*, con 5 (*lac A – lac E*) y tres (BcLCC1, BcLCC2, BcLCC3) genes codificantes para lacasas, respectivamente; a partir de cultivos con y sin inducción por CuSO<sub>4</sub>, mostrando que la inducción por Cu aumentó los niveles transcripcionales de algunos de los genes codificantes, mientras que los niveles de otros genes se mantuvieron muy similares, pero en ningún caso mostró disminuir su transcripción (Vasina *et al.* 2017; Buddhika *et al.* 2020) A este respecto, el número de genes codificantes de lacasa varía entre especies, siendo algunos putativos, por lo que en *Tht.* C3B1 seguramente habrá aún más genes no estudiados en este trabajo.

De acuerdo con los análisis de identidad, llaman la atención las secuencias putativas para Lac E y N, que comparten mayor identidad con proteínas multicobre oxidasas transportadoras de hierro. La expresión de estos genes quedó confirmada en ZMO, ZMM y ZMM+Cu. Genes codificantes para transportadores de hierro, como FET 3, han sido reportados en múltiples especies fúngicas y también han mostrado codependencia de los iones metálicos de cobre, como elemento estructural, y hierro, como elemento objetivo (Askwith *et al.* 1994; Spizzo *et al.* 1997).

Así como esta probable función, la más probable, acorde a los índices de identidad, la mayoría de las secuencias se relacionan con otras implicadas en la infección de plantas, donde los hongos al adaptar su metabolismo a diversas fuentes de carbono y nitrógeno producen un arsenal de enzimas extracelulares, el secretoma, que permite una degradación eficiente de las lignocelulosas y otros biopolímeros. (Bouws *et al.* 2008). Esta función *in vivo* parece ser muy común, por ejemplo, en *Heterobasidion annosum*, con 18 genes codificantes para lacasa, 8 de estos están relacionados en la infección de pino silvestre, donde el efecto de la glucosa como fuente de C es significativo en la regulación positiva de estos genes y una mayor actividad de lacasa (Yakovlev *et al.* 2012)

## ⑧ CONCLUSIÓN

El cobre ( $\text{CuSO}_4$  1mM) tiene un efecto inductivo significativo en la actividad enzimática de lacasas de *Thielavia terrestris* Co3Bag1 cultivado en los medios de cultivo ZMO y ZMM, en el primero también es identificable a nivel transcripcional.

Los genes correspondientes a todas las secuencias putativas para lacasa parecen expresarse bajo el efecto inductivo del cobre y/o bajo estrés nutricional en fuentes de C y N (ZMM).

La expresión de los genes putativos de lacasa puede no verse directamente reflejada en los niveles de actividad enzimática.

*In silico*, todas las secuencias putativas para lacasa, poseen una o varias propiedades descritas de lacasas identificadas experimentalmente y reportadas en bases de datos.

El diseño de cebadores fue certero para la amplificación de transcritos correspondientes a los genes putativos de lacasa: Lac A, B, C, D, E y N.

## 9 ANEXOS

### ANEXO 1-A PCR con HotStarTaq Master Mix de Qiagen

1. Descongele las soluciones de cebadores.

Mezclar bien antes de usar. Opcional: prepare una mezcla de cebadores de una concentración adecuada (consulte la Tabla AI-1) utilizando el agua proporcionada. Esto se recomienda si se van a realizar varias reacciones de amplificación utilizando el mismo par de cebadores. El volumen de mezcla de cebadores añadido a cada reacción de 50 µl es de 25 µl menos el volumen de DNA molde.

2. Mezcle la HotStarTaq Master Mix agitando brevemente en vórtex y dispense 25 µl en cada tubo de PCR de acuerdo con la Tabla AI-1. Es importante mezclar la HotStarTaq Master Mix antes de usarla para evitar concentraciones localizadas de sal. HotStarTaq Master Mix se proporciona como un concentrado 2x (es decir, se requiere un volumen de 25 µl de HotStarTaq Master Mix para reacciones de amplificación con un volumen final de 50 µl). Para volúmenes inferiores a 50 µl, la proporción 1:1 de HotStarTaq Master Mix a la mezcla de cebadores diluida y la plantilla debe mantenerse como se define en la Tabla AI-1. Siempre debe incluirse un control negativo (sin plantilla de DNA). No es necesario mantener los recipientes de reacción en hielo ya que la HotStarTaq DNA Polymerase está inactiva a temperatura ambiente.

3. Distribuya el volumen apropiado de mezcla de cebador diluida en los tubos de PCR que contienen la mezcla maestra.

4. Añada DNA molde (<1 µg / 50 µl de reacción) a los tubos de PCR individuales. Para RT-PCR, agregue una alícuota de la reacción de transcriptasa inversa. El volumen agregado no debe exceder el 10% del volumen final de PCR.

5. Cuando utilice un termociclador con tapa térmica, no utilice aceite mineral. Continúe directamente con el paso 6. De lo contrario, cubra con aproximadamente 100 µl de aceite mineral.

6. Programe el termociclador de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Nota: Cada programa de PCR debe comenzar con un paso inicial de activación por calor a 95 °C durante 15 min. En la Tabla AI-2 se describe un programa típico de ciclos de PCR. Para obtener el máximo rendimiento y especificidad, las temperaturas y los tiempos de ciclo deben optimizarse para cada nuevo modelo de objetivo o par de cebadores. Coloque los tubos de PCR en el termociclador e inicie el programa de ciclos. Nota: Después de la amplificación, las muestras se pueden almacenar durante la noche a 2-8 °C o a -20 °C para un almacenamiento más prolongado.

Tabla AI-1 Composición de la reacción

Componente	Vol. Rn.	Concentración final
HotStarTaq Master Mix	25 µl	2.5 u HotStarTaq DNA Polymerase 1X PCR buffer (1.5 mM MgCl <sub>2</sub> ) 200 µM de cada dNTP
Mezcla diluida de oligos (25 µl – volumen de DNA molde)		
Primer A	variable	0.1–0.5 µM
Primer B	variable	0.1–0.5 µM
Agua libre de RNAsa	variable	-
DNA molde	variable	<1 µg/50 µl
Volumen total	50 µl	

Tabla AI-2 Ciclos de PCR

Activación inicial	15 min 95°C	HotStarTaq DNA Polymerase
Desnaturalización	0.1-1 min 94°C	
Alineamiento	0.1-1 min 50-68°C	5°C por debajo de la T <sub>m</sub>
Extensión	1 min 72°C	+1min por kb en DNA > 1Kb
Numero de ciclos	25-35	
Extensión final	10 min 72°C	

Anexo 1 Protocolos (traducidos) para (I-A) amplificación de gDNA, (I-B) extracción de RNA y (I-C) Síntesis de primera hebra de cDNA, según fabricante (Qiagen, Zymo Research y Thermo Scientific, respectivamente).

T

### ANEXO 1-B Extracción de RNA con Direct-zol RNA Miniprep de Zymo Research (I) Preparación de muestras

Las muestras difíciles de lisar (es decir, bacterias grampositivas, levaduras, hongos, tejido animal, plantas, etc.) se pueden homogeneizar en TRI Reagent con un mortero / maja, triturador de tejidos o batido de perlas con un homogeneizador de alta velocidad.

#### (II) Purificación de RNA

1. Agregue un volumen igual de etanol (95-100%) a una muestra lisada en TRI Reagent o similar y mezcle bien.

2. Transfiera la mezcla a una Columna IIC2 Zymo-Spin en un tubo de recolección y centrifugue. Transfiera la columna a un nuevo tubo de recolección y deseche el eluyente.

3. Añada 400 µl de Direct-zol RNA PreWash a la columna y centrifugue. Deseche el eluyente y repita este paso.

4. Añada 700 µl de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugue durante 2 minutos para asegurar la eliminación completa del tampón de lavado. Transfiera la columna con cuidado a un tubo sin RNAsa.

5. Para eluir el RNA, agregue 50 µl de agua libre de DNAsa / RNAsa directamente a la matriz de la columna y centrifugue. Alternativamente, para RNA altamente concentrado use ≥25 µl de elución. El RNA puede usarse inmediatamente o almacenarse congelado a ≤ -70 °C.

### ANEXO 1-C Síntesis de la primera hebra de cDNA con RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit de Thermo Scientific

Después de descongelar, mezclar y centrifugar brevemente los componentes del kit. Almacenar en hielo.

1. Agregue los siguientes reactivos en un tubo estéril sin nucleasas en hielo en el orden indicado:

RNA total o poly(A) mRNA o RNA específico	0.1 ng - 5 µg, 10 pg - 0.5 µg, 0.01 pg - 0.5 µg
Oligo (dT) o cebador hexámero aleatorio o cebador específico de gen	1 µL, 1 µL, 15-20 pmol
Agua libre de nucleasas	hasta 12 µL
Volumen total	12 µL

2. Opcional. Si la plantilla de RNA es rica en GC o contiene estructuras secundarias, mezcle suavemente, centrifugue brevemente e incube a 65 °C durante 5 min. Enfríe en hielo, centrifugue y vuelva a colocar el vial en hielo.

3. Agregue los siguientes componentes en el orden indicado:

Buffer de reacción 5X	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20U/µL)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µl
Volumen total	20 µl

4. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente.

5. Para la síntesis de cDNA cebado con oligo (dT) 18 o gen específico, incubar durante 60 min a 42 °C. Para la síntesis cebada con hexámero aleatorio, incube durante 5 min a 25 °C seguido de 60 min a 42 °C.

Nota. Para las plantillas de ARN ricas en GC, la temperatura de reacción se puede aumentar hasta 45 °C.

6. Termine la reacción calentando a 70 °C durante 5 min.

El producto de la reacción de transcripción inversa puede usarse directamente en aplicaciones de PCR o almacenarse a -20 °C durante menos de una semana. Para un almacenamiento más prolongado, se recomienda -70 °C

DIAS

(min)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CINETICA SIN INDUCCIÓN (absorbancia a 420 nm)												
0.00	0.0002	0.0008	0.0013	0.0072	0.0062	0.0067	0.0082	0.0180	0.0215	0.0112	0.0288	0.0297
0.25	0.0012	0.0008	0.0020	0.0080	0.0070	0.0085	0.0095	0.0207	0.0247	0.0148	0.0327	0.0350
0.50	0.0017	0.0012	0.0023	0.0090	0.0067	0.0090	0.0110	0.0230	0.0280	0.0330	0.0373	0.0412
0.75	0.0022	0.0017	0.0025	0.0095	0.0093	0.0102	0.0125	0.0260	0.0313	0.0253	0.0412	0.0470
1.00	0.0028	0.0023	0.0030	0.0102	0.0107	0.0112	0.0135	0.0280	0.0338	0.0290	0.0452	0.0527
1.25	0.0032	0.0027	0.0032	0.0110	0.0192	0.0122	0.0147	0.0298	0.0316	0.0325	0.0493	0.0570
1.50	0.0038	0.0030	0.0033	0.0113	0.0127	0.0132	0.0158	0.0322	0.0400	0.0357	0.0535	0.0620
1.75	0.0042	0.0033	0.0037	0.0118	0.0137	0.0140	0.0172	0.0337	0.0420	0.0395	0.0572	0.0668
2.00	0.0047	0.0037	0.0037	0.0128	0.0145	0.0150	0.0178	0.0355	0.0443	0.0423	0.0605	0.0715
R	0.9940	0.9901	0.9761	0.9948	0.7929	0.9967	0.9973	0.9963	0.9769	0.9126	0.9995	0.9987
m	0.0022	0.0016	0.0011	0.0027	0.0050	0.0040	0.0049	0.0087	0.0112	0.0141	0.0160	0.0210
U/l	0.60	0.44	0.31	0.75	1.39	1.11	1.36	2.43	3.10	3.91	4.46	5.82
CINETICA CON INDUCCIÓN (absorbancia a 420 nm)												
0.00	0.0680	0.1300	0.2400	0.1300	0.1600	0.2800	0.3850	0.8400	1.0500	1.2300	0.2500	0.3000
0.25	0.0700	0.1300	0.2400	0.1400	0.1700	0.3200	0.4700	0.9400	1.1600	1.3400	0.3550	0.4300
0.50	0.0710	0.1400	0.2500	0.1500	0.1800	0.3600	0.5450	1.0300	1.2700	1.4500	0.4650	0.6100
0.75	0.0710	0.1400	0.2500	0.1600	0.1900	0.4000	0.6200	1.1200	1.3800	1.5600	0.6100	0.8200
1.00	0.0710	0.1400	0.2500	0.1700	0.2000	0.4400	0.6800	1.2200	1.5100	1.6900	0.7500	1.0500
1.25	0.0720	0.1500	0.2700	0.1900	0.2100	0.4800	0.7400	1.3000	1.6200	1.8000	0.9050	1.2900
1.50	0.0730	0.1500	0.2700	0.2000	0.2200	0.5000	0.7850	1.3800	1.7300	1.9000	1.0750	1.5500
1.75	0.0730	0.1500	0.2700	0.2100	0.2400	0.5400	0.8350	1.4500	1.8200	2.0000	1.2200	1.8300
2.00	0.0730	0.1500	0.2700	0.2200	0.2600	0.5700	0.8800	1.5600	2.0000	2.1800	1.4150	2.1300
R	0.9358	0.9311	0.9316	0.9966	0.9884	0.9978	0.9936	0.9991	0.9986	0.9984	0.9969	0.9946
m	0.0023	0.0113	0.0180	0.0467	0.0473	0.1453	0.2450	0.3527	0.4627	0.4613	0.5847	0.9247
U/l	0.62	3.14	5.00	12.96	13.14	40.37	68.055	97.96	128.51	128.14	162.40	256.85

T (DIAS)	ZMO		ZMO+Cu	
	BIOMASA (g/l)	ACTIVIDAD (U/l)	BIOMASA (g/l)	ACTIVIDAD (U/l)
1	0.06	0.00	0.03	0.00
2	0.16	0.00	0.04	0.00
3	0.32	0.60	0.06	0.63
4	1.10	0.44	0.07	3.15
5	1.16	0.31	0.16	5.00
6	1.02	0.75	0.34	12.96
7	0.88	1.39	0.58	13.15
8	0.85	1.11	0.66	40.37
9	0.96	1.36	0.76	68.06
10	0.32	2.43	0.75	97.96
11	0.32	3.10	0.75	128.52
12	0.24	3.91	0.79	128.15
13	0.22	4.46	0.44	162.41
14	0.22	5.82	0.34	256.85

Anexo 2 Recopilación de datos a partir de los cuales se determinó biomasa y actividad de lacasa para los cultivos en ZMO con y sin inducción por cobre.

T (min)	DIAS											
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CINETICA SIN INDUCCIÓN (absorbancia a 420 nm)												
0	0.0025	0.0048	0.0065	0.0195	0.0123	0.0050	0.0144	0.0037	0.0087	0.0073	0.0068	0.0097
0.25	0.0033	0.0072	0.0100	0.0250	0.0163	0.0075	0.0212	0.0067	0.0197	0.0100	0.0101	0.0135
0.50	0.0045	0.0088	0.0137	0.0288	0.0198	0.0108	0.0242	0.0091	0.0225	0.0125	0.0123	0.0165
0.75	0.0053	0.0110	0.0133	0.0322	0.0228	0.0133	0.0256	0.0104	0.0227	0.0150	0.0148	0.0192
1.00	0.0065	0.0132	0.0180	0.0343	0.0249	0.0155	0.0297	0.0146	0.0288	0.0175	0.0146	0.0220
1.25	0.0072	0.0150	0.0213	0.0363	0.0270	0.0180	0.0320	0.0168	0.0308	0.0200	0.0188	0.0242
1.50	0.0085	0.0174	0.0240	0.0367	0.0285	0.0203	0.0334	0.0183	0.0313	0.0220	0.0206	0.0262
1.75	0.0097	0.0198	0.0251	0.0400	0.0313	0.0225	0.0357	0.0206	0.0338	0.0238	0.0222	0.0280
2.00	0.0108	0.0214	0.0278	0.0437	0.0340	0.0247	0.0380	0.0228	0.0362	0.0258	0.0235	0.0300
R	0.9983	0.9993	0.9907	0.9792	0.9919	0.9983	0.9812	0.9961	0.9491	0.9981	0.9902	0.9931
m	0.0041	0.0084	0.0106	0.0108	0.0102	0.0098	0.0109	0.0095	0.0119	0.0093	0.0082	0.0099
U/l	1.15	2.32	2.94	2.99	2.84	2.72	3.01	2.6514	3.30	2.58	2.28	2.76

CINETICA CON INDUCCIÓN (absorbancia a 420 nm)												
0	0	0	0.1000	0.1750	0.1700	0.1200	0.1200	0.1200	0.1400	0.1100	0.0150	0.0190
0.25	0	0	0.1150	0.2000	0.1800	0.1300	0.1400	0.1300	0.1400	0.1100	0.0160	0.0200
0.50	0	0	0.1350	0.2200	0.1900	0.1400	0.1400	0.1400	0.1500	0.1200	0.0160	0.0200
0.75	0	0	0.1550	0.2350	0.2100	0.1500	0.1500	0.1400	0.1500	0.1400	0.0160	0.0200
1.00	0	0	0.1700	0.2500	0.2200	0.1600	0.1600	0.1400	0.1600	0.1500	0.0170	0.0210
1.25	0	0	0.1850	0.2700	0.2400	0.1700	0.1700	0.1500	0.1700	0.1500	0.0170	0.0210
1.50	0	0	0.2250	0.2800	0.2500	0.2100	0.2100	0.1500	0.1700	0.1600	0.0170	0.0220
1.75	0	0	0.2300	0.2950	0.2800	0.2200	0.2200	0.1600	0.1800	0.1600	0.0180	0.0230
2.00	0	0	0.2300	0.3150	0.3000	0.2300	0.2300	0.1600	0.1900	0.1600	0.0180	0.0230
R	-	-	0.9863	0.9964	0.9900	0.9776	0.9704	0.9661	0.9833	0.9467	0.9585	0.9682
m	-	-	0.0717	0.0667	0.0647	0.0580	0.0560	0.0187	0.0253	0.0293	0.0014	0.0020
U/l	0	0	19.90	18.51	17.96	16.11	15.55	5.18	7.03	8.15	0.39	0.55

T (DIAS)	ZMM		ZMM+Cu	
	BIOMASA (g/l)	ACTIVIDAD (U/l)	BIOMASA (g/l)	ACTIVIDAD (U/l)
1	0.09	0.00	0.05	0.00
2	0.05	0.00	0.06	0.00
3	0.07	1.15	0.17	0.00
4	0.17	2.32	0.22	0.00
5	0.22	2.95	0.21	19.91
6	0.25	2.99	0.29	18.52
7	0.45	2.85	0.31	17.96
8	0.43	2.73	0.36	16.11
9	0.36	3.02	0.41	15.56
10	0.33	2.65	0.43	5.19
11	0.30	3.30	0.42	7.04
12	0.27	2.58	0.40	8.15
13	0.27	2.29	0.28	0.39
14	0.33	2.76	0.26	0.56

Anexo 3 Recopilación de datos a partir de los cuales se determinó biomasa y actividad de lacasa para los cultivos en ZMM con y sin inducción por cobre.

Lac_A	1	MGLLRGLLESVSETLELFYTATATLTQERTNGLSLLG-----TLLAPVLPFLFTNNPLPD	55
Lac_B	1	MKSLAGAVALLMGLIAPTITAAPPATPEQRDLTLE-----SRDAAGLP---SCNTPSN	52
Lac_C	1	MSDPQ--LSPKKEGTTAAATAAAKSTTRRPSLLLVGGLVTFVVVALALGLGLGLGTHRGSSSALLPPASSSSPLPG	78
Lac_D	1	-----MLSPSL---VLPVLALGLPSA-----RAAAQETAETCVNGPKT	35
Lac_E	1	M-----FWSRC-----LELFSL-----LPALVIVVRAG-----	23
Lac_N	1	M-----AWRTANRAALPGRLGLVWLLC-----LLWHGLLASAA-----	33
Lac_A	56	GFPW--GSLSDTNTNP-----YAAYPRTGVVRYDYFTVSRGI--IAPDGYQ-RDVLVNGAYPGPLIEANWGDITV	121
Lac_B	53	RACW--TTGFDINTDY-----ELKPTTNTVTRKYTLVLTTEATNWKGPDGFKERVMLVNSIVGPTIFADWGDNLE	121
Lac_C	79	SGAAHNASLEDWRDLPSHYVLDMAWDINAPPT--TRHYDFVITEGR--GWPDPGVV-RDMLFINGKFPGLIEANMGDRLV	153
Lac_D	36	RSCWQ--RGFDIHTDYT-----ALQAPAGKLVVEYDLTVSQAI--VKPDGYE-KLAMVVNGQYPGPTIEANWGDITR	101
Lac_E	24	-----TVTYDWNVTWVW--AKPDGFG-RPVIGINYKWPCPTLEATVGDITV	66
Lac_N	34	-----TVTYDFNITWVT--ANPDSMADRRTIGINGQWPIPTIRVNVGDRLV	77
Lac_A	122	VTVHNHNSNPEDGTTI <b>HWHG</b> FLQRETPWAD <b>AGAPGISQCPI</b> PP-GRSPTYEFVASF <b>GT</b> S <b>WYH</b> AHYSA <b>QYAG</b> GVV <b>GFIV</b> VY	200
Lac_B	122	ITVINNLQT--NGTSI <b>HWHG</b> LQRQLNLLND <b>DGVNGVTECP</b> IPKGGKLYRFRVAVQ <b>GT</b> T <b>WYHSH</b> FSA <b>QYNG</b> GVV <b>GGIQ</b> IN	199
Lac_C	154	INVTNKLTA--NATTI <b>HWHG</b> LQNGTNW <b>DGTTGITQCI</b> PP-GQSLVYNFTLEQ <b>GT</b> S <b>WYHSH</b> YGT <b>QYLDGIL</b> GLPIIH	230
Lac_D	102	ITVHNFTENLNGTGI <b>HWHG</b> IRQYHNNW <b>DGVPGVTECP</b> QP-GESRTYEFKVTQ <b>GT</b> S <b>WYHSH</b> FSM <b>QY</b> SNGLY <b>GPLVI</b> H	180
Lac_E	67	VNFLNKLGN--QTAGL <b>HFHG</b> VSQLQTP <b>DG</b> PSGVT <b>QCP</b> VPP-DASVKYQFTADAP <b>GT</b> F <b>WYHSH</b> NMG <b>QY</b> PDGL <b>RGLVI</b> H	143
Lac_N	78	VNVLSLGN--ESVSL <b>HFHG</b> LFRNATH <b>DG</b> PAGVT <b>QCP</b> IP-GRSLTYNFTVDQ <b>GT</b> S <b>WYHSH</b> IR <b>QY</b> PDGL <b>RGLVI</b> H	154
Lac_A	201	GPTHAK---YDVDLGPIMLSDWYH-REYFDIVKELLSQPNASPRV--LSDNNLIDGKMNFDCSTVAPGDNTPCTDRAGIS	273
Lac_B	200	GPASLP---YDIDLGVFPITDWYN-LTA-QDLVLYTQNNQNP---FSDNVLFNGTGVHPFT--GEGKYA-----	258
Lac_C	231	APAEDARKLYSD-RVVLIQDWYHDSVQNLNLEYLAPDNTEP--IPDNGLINGIGYFNCSSYDAGSCTCYDNSTYS	307
Lac_D	181	GPSSAN---WDVDLGPWLIADWYH-----TDVFLVHQGEAFNIPAVPDSTLINGKGFNCDP--ARDPRCDGTGGEFF	249
Lac_E	144	DPNDPYKSS-YDEE-VILSVSDWYH-NSSLKAVQMLSPNTRFAPPIPDSLIVNEGLG-----S	200
Lac_N	155	DPDSPFRDK-YDEE-LVMTVSDWYH-DMPGLLSQFLNKANPTGAEPVNSALLNDTQN-----L	211
Lac_A	274	KFKFQTGKTHRLRLINSGADGVQRFSIDQHTLTVIAEDFVVPKPYNTTVTLVGVGQRTDVLVTANAG-PPDSLFWMRSNL	352
Lac_B	259	NVTLTPGKRHRLRLINTSVENHFQVSLVNHTMTIIAADLVPVNLATVDSLFLVGVGQRYDVTIDASRT-P--GNYWFNVTF	335
Lac_C	308	VLSLEPNTRTRLRINTGAFTEFDVSDNHTLSVIEADATLVKPVSVHRFPPIHVAQRYSVVVETNQS-T-STNYWLRGAM	385
Lac_D	250	EVLLNHGTTYKLAIVSTASLLTYNFWIDGHNFYISTDFVPIKPYTTNFLTAVGIGORFEIILHANASLANGTNFWIHAQ-	328
Lac_E	201	HINVTGKGYRIRIINFAAFSGSAMIHFDSDHTMNIANDAAVVKKTDAYQLRIAPAQRVDVLIAPLDQ--DSGNYPFLISL	278
Lac_N	212	TVSVQPGKTYLFRMVNIGAFAGQYVWFEGHNMTILEVDGVYTHPAEASMIYLAAQRCSFLITAKND--TLENFPIVASM	289
Lac_A	353	-----TSCSPARQP-----NALAAVYDKAN---ISATPSSRPWD---VPDPGTCANDPLDISEPLYPIPLPKPAIT	413
Lac_B	336	GGs--NQCGGSNNH-----FPAAIFHYAGA-----PGGLPTDPGVAPVDHNCNLDNMDLT-PVVKRVPANSFV	395
Lac_C	386	ITSCPTGNNEPVLDT-----TTKAVISYSGNS---TVVPSDGASVD-WTDAIPIHCI--DLDDSTLVPTIPDPPPAAT	451
Lac_D	329	-----DCRLPKALD---W---RAGIVRYDASDRRDPYTPPEGPELD-AFRHFEYGCA--DFDTPAIEPVVPKQVDSTS	392
Lac_E	279	DL-----NRDWTNSQKLQWAHNYTGVLVLDSSK---K-L-DKKDVVN-----KWQPIDESLLEPYDGAPAYSSY	338
Lac_N	290	DTDLFDQIPDGLNW-----NVTGWLVDYSAK---P-LPDPVAVYD-----AFEPFDDIGLVPWQNTLGEPE	347
Lac_A	414	Q---TMDI---ETFKNAS-----NVTLWKFNGVSMRTDYNSPVI--LLANQG-----NFSYPPEWN-----	461
Lac_B	396	KKPENTLDV---HLDTGT-----PLFVWKVNGSAINIDWNNPVD-DYVMKG-----NSSFPTSND-----	447
Lac_C	452	KMWR--LDF--SFGIGAY-----QLDRAKFNGTSSWVLDNTTTL-IQAVDGLAAGQAQSSPSSSSSKWAVDGP	516
Lac_D	393	ANELTSADYLR-IGQVNAWPGSAAGSPPLFLWLVDKSPLYANWSQPTIKTLALDNGTVSQ---LPGYAA-----P	459
Lac_E	339	DQLI-QLDFKFC-LDQNGY-----PR---SCFNNTITYISQKVPTLYSVATTDGQNTN-PVIYQG-VN-----	393
Lac_N	348	DQTI-TLDPDPR---QSNTK-----DS---AFFNDITYVAPKVPTLYTALSAGDLATN-SAVYGTYTH-----	400
Lac_A	462	-----VVNYQQTAIRIINNKGGP-----P <b>HPMHLHG</b> HNFYVLHEGP-----GEWDGT----IVRPSN	511
Lac_B	448	-----IVAVDAANQWTYWLIENDPEAVISL <b>HPMHLHG</b> HDFVLVKGSPVSPPAQVAYTFDPSTDLARLVSN	515
Lac_C	517	VSAFGSNQFVVGLSANGSIDVVDILLYSLDEG---S <b>HPFHLHG</b> HFWILQAGAGPFNWTAYQTTLYPSGGAASPLTAN	591
Lac_D	460	IGLDYDTGAWVYVVVTSNYTAADVAAAQGMPTDVASV <b>HPMHLHG</b> HDFVILAQQGPGPFDA-----TVRPKLAN	528
Lac_E	394	-----PFIVNFNQTVQIVVNNIDTA---T <b>HPFHLHG</b> HFFQVLARPSG-----VGTWPGH---EGNYVST	447
Lac_N	401	-----PLVLEKDQVVEILINLDSG---K <b>HPFHLHG</b> HEFQVIWRSDDD-----AGTFADSNVTADAFPAI	457
Lac_A	512	PMRRDVELVRGNGLVLIQFD-GAP <b>GVAFHCHIAW</b> HSSG <b>GF</b> VASLL-----VQPHKVQMMHLPRDVEQNC-----	575
Lac_B	516	PVRRDVTMLPAKGWLLAFKTDNP <b>GAWLFHCHIAW</b> HVSG <b>GL</b> SVVFLERATDLRAQLNGAAAAADKAEFERVC-----	587
Lac_C	592	ALRRDTFTLQPYSWTLRLRFVADN <b>AGLWAFHCHIAW</b> HLEAG <b>GLMMQ</b> FLSR-----PDVLARTAVPDDVRGLC-----	656
Lac_D	529	PPRDRTLNLPPGSFAWIAFQVDSP <b>GAWLFHCHIAW</b> HAA <b>GLALQ</b> YIEQP-----SRLRGLMQQAGA--L	590
Lac_E	448	PPMRDVTVMFNYSYAVLRFRADNP <b>GVLWFHCHIEW</b> HVEM <b>GL</b> TATIEAP-----DRLRNLTFPDHIDVCKKSNTPYQ	520
Lac_N	458	PMKRDTVVVRPNGNMVLRFKSDNP <b>GIWLFHCHIEW</b> HIVS <b>GL</b> MATFVEAP-----LDIQKSITLPSDHLAVCAAGVPTA	531
Lac_A	576	-----RAW-DLWTKHNVDQIDSGT-----	594
Lac_B	588	-----AAWRDYYPANDPFHKVDSGLKQRFVEVSEWMTVTG-----	622
Lac_C	657	-----AAA-----AGK-----	662
Lac_D	591	GRVADQCSSFNKWSWGIPSE-GSGI-----	616
Lac_E	521	GNAAGNTKNVTDTSGFVTVPTTYSG-----AVWSPSS---TTKIPAYGRPTKTA-RAVALAI----EDQVDDDES	582
Lac_N	532	GNAANTVNFLLDTGQNAAPPPLPAGFTPRGIVALVFCVSGILGVAVVSWYGFAGQVGGQGAAPAVLARQGEKQQKQQ	611
Lac_A		-----	
Lac_B	623	-----GQLGELWKQTYPPLLPQHCA	642
Lac_C		-----	
Lac_D		-----	
Lac_E	583	L-----AEILTQALSASFARKD	600
Lac_N	612	LGGDGRGTGSGAENAGADAGVQQAAGRRSSEAN	645

Anexo 4 Alineamiento entre las secuencias putativas para lacasa, Lac A, B, C, D, E y N. Se resaltan las secuencias firmas L1, L2, L3 y L4.



## 10 FUENTES

### Artículos

- Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y., Wang, Z., & Lu, G. (2017). *Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi. International Journal of Molecular Sciences*, 19(1).
- Antošová, Z., & Sychrová, H. (2015). *Yeast Hosts for the Production of Recombinant Laccases: A Review. Molecular Biotechnology*, 58(2), 93–116. doi:10.1007/s12033-015-9910-1
- Antotegi-Uskola, M., Markina-Iñarrairaegui, A., & Ugalde, U. (2019). New insights into copper homeostasis in filamentous fungi. *International Microbiology*, 1-9.
- Arikan, E. B., Isik, Z., Bouras, H. D., & Dizge, N. (2019). Investigation of immobilized filamentous fungi for treatment of real textile industry wastewater using up flow packed bed bioreactor. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100197.
- Ariste, A. F., Batista-García, R. A., Vaidyanathan, V. K., Raman, N., Vaithyanathan, V. K., Folch-Mallol, J. L., Jackson S.A., Dobson A. D. W., Cabana, H. (2019). *Mycoremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons from a biorefinery wastewater and concomitant production of lignin modifying enzymes. Journal of Cleaner Production*, 119810. doi:10.1016/j.jclepro.2019.119810
- Baldrian, P. (2006). *Fungal laccases – occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 215–242. doi:10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x
- Baltierra-Trejo, E., Márquez-Benavides, L., & Sánchez-Yáñez, J. M. (2015). *Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. Journal of Microbiological Methods*, 119, 126–131. doi:10.1016/j.mimet.2015.10.007
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., & Pesquet, E. (2015). *The cell biology of lignification in higher plants. Annals of Botany*, 115(7), 1053–1074. doi:10.1093/aob/mcv046
- Bebić, J., Banjanac, K., Čorović, M., Milivojević, A., Simović, M., Marinković, A., & Bezbradica, D. (2020). *Immobilization of laccase from Myceliophthora thermophila on functionalized silica nanoparticles: Optimization and application in lindane degradation. Chinese Journal of Chemical Engineering*. doi:10.1016/j.cjche.2019.12.025
- Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., & Pfaffl, M. W. (2010). *mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. Methods*, 50(4), 237–243.
- Berka, R. M., Grigoriev, I. V., Otilar, R., Salamov, A., Grimwood, J., Reid, I., Ishmael, N., John, T., Darmond, C., Moisan, M.-C., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Lombard, V., O Natvig, D., Lindquist, E., Schmutz, J., Lucas, S., Harris, P., Powlowski, J., Bellemare, A., Taylor, D., Butler, G., de Vries, R.P., Allijn, I.E., van den Brink, J., Ushinsky, S., Storms, R., Powell, A.J., Paulsen, I.T., Elbourne, L.D.H., Baker, S.E., Magnuson, J., LaBoissiere, S., Clutterbuck, A.J., Martinez, D., Wogulis, M., Lopez de Leon, A., Rey, M.W., Tsang, A. (2011). Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nature Biotechnology*, 29(10), 922–927. doi:10.1038/nbt.1976
- Bhattacharya, S. S., Garlapati, V. K., & Banerjee, R. (2011). *Optimization of laccase production using response surface methodology coupled with differential evolution. New Biotechnology*, 28(1), 31–39. doi:10.1016/j.nbt.2010.06.001
- Birhanli, E., & Yesilada, O. (2010). *Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of Funalia trogii and Trametes versicolor. Biochemical Engineering Journal*, 52(1), 33–37. doi:10.1016/j.bej.2010.06.019
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). *LIGNINBIOSYNTHESIS. Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519–546. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938
- Bonugli-Santos, R. C., Durrant, L. R., da Silva, M., & Sette, L. D. (2010). *Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. Enzyme and Microbial Technology*, 46(1), 32–37. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.07.014 .
- Bourbonnais, R., & Paice, M. G. (1990). *Oxidation of non-phenolic substrates. FEBS Letters*, 267(1), 99–102. doi:10.1016/0014-5793(90)80298-w
- Burton, S. (2003). *Laccases and Phenol Oxidases in Organic Synthesis - a Review. Current Organic Chemistry*, 7(13), 1317–1331. doi:10.2174/1385272033486477
- Buswell, J. A., Cai, Y., & Chang, S. (1995). *Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by Lentinula (Lentinus) edodes. FEMS Microbiology Letters*, 128(1), 81–87. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07504.x
- Call, H. P., & Mücke, I. (1997). *History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). Journal of Biotechnology*, 53(2-3), 163–202. doi:10.1016/s0168-1656(97)01683-0
- Cannatelli, M. D., & Ragauskas, A. J. (2016). *Two Decades of Laccases: Advancing Sustainability in the Chemical Industry. The Chemical Record*, 17(1), 122–140. doi:10.1002/tcr.201600033
- Cardoso, B. K., Linde, G. A., Colauto, N. B., & do Valle, J. S. (2018). *Panus strigellus laccase decolorizes anthraquinone, azo, and triphenylmethane dyes. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. doi:10.1016/j.bcab.2018.09.026
- Cázares-García, S. V., Vázquez-Garcidueñas, M. S., & Vázquez-Marrufo, G. (2013). *Structural and phylogenetic analysis of laccases from Trichoderma: a bioinformatic approach. PLoS one*, 8(1), e55295.
- Chen, M., Waigi, M. G., Li, S., Sun, K., & Si, Y. (2019). *Fungal laccase-mediated humification of estrogens in aquatic ecosystems. Water research*, 115040.
- Chenthamarakshan, A., Parambayil, N., Miziriya, N., Soumya, P. S., Lakshmi, M. S. K., Ramgopal, A., Dileep A., Nambisan, P. (2017). *Optimization of laccase production from Marasmiellus palmivorus LA1 by Taguchi method of Design of experiments. BMC Biotechnology*, 17(1). doi:10.1186/s12896-017-0333-x
- Christopher, L. P., Yao, B., & Ji, Y. (2014). *Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. Frontiers in Energy Research*, 2. doi:10.3389/fenrg.2014.00012
- Claus, H. (2004). *Laccases: structure, reactions, distribution. Micron*, 35(1-2), 93-96.
- Claus, H., & Mojsos, K. (2018). *Enzymes for wine fermentation: Current and perspective applications. Fermentation*, 4(3), 52.

- Collins, P. J., & Dobson, A. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9), 3444-3450.
- Couto, S. R., & Toca-Herrera, J. L. (2007). *Laccase production at reactor scale by filamentous fungi*. *Biotechnology Advances*, 25(6), 558-569. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.07.002
- Criquet, S. (1999). *Laccase activity of forest litter*. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(9), 1239-1244. doi:10.1016/s0038-0717(99)00038-3
- Datta, R., Kelkar, A., Baraniya, D., Molaei, A., Moulick, A., Meena, R., & Formanek, P. (2017). *Enzymatic Degradation of Lignin in Soil: A Review*. *Sustainability*, 9(7), 1163. doi:10.3390/su9071163
- Dawson, C. R., & Mallette, M. F. (1945). *The Copper Proteins*. *Advances in Protein Chemistry*, 179-248. doi:10.1016/s0065-3233(08)60625-7
- De Oliveira, T. B., & Rodrigues, A. (2019). *Ecology of Thermophilic Fungi*. *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance*, 39-57. doi:10.1007/978-3-030-19030-9\_3
- Dean, J. F. D., & Eriksson, K.-E. L. (1994). *Laccase and the Deposition of Lignin in Vascular Plants*. *Holzforschung*, 48(s1), 21-33. doi:10.1515/hfsg.1994.48.s1.21
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR methods appl*, 3(3), S30-S37.
- Dittmer, N. T., & Kanost, M. R. (2010). *Insect multicopper oxidases: Diversity, properties, and physiological roles*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3), 179-188. doi:10.1016/j.ibmb.2010.02.006
- D'Souza, D. T., 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 Technology*, 38(3-4), 504-511. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.07.005
- Dhakar, K., & Pandey, A. (2013). Laccase production from a temperature and pH tolerant fungal strain of *Trametes hirsuta* (MTCC 11397). *Enzyme Research*, 2013.
- Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P., & Kumar, A. (2011). *Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 117-128. doi:10.1016/j.molcatb.2010.11.002
- Einax, E., & Voigt, K. (2003). Oligonucleotide primers for the universal amplification of  $\beta$ -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organisms Diversity & Evolution*, 3(3), 185-194.
- Eggeling, L. (1983). *Lignin — an exceptional biopolymer ... and a rich resource?* *Trends in Biotechnology*, 1(4), 123-127. doi:10.1016/0167-7799(83)90036-7
- El-Batal, A. I., ElKenawy, N. M., Yassin, A. S., & Amin, M. A. (2015). *Laccase production by Pleurotus ostreatus and its application in synthesis of gold nanoparticles*. *Biotechnology Reports*, 5, 31-39. doi:10.1016/j.btre.2014.11.001
- Elfstrand, M., Fossdal, C.G., Sitbon, F., Olsson, O., Lönneborg, A. & von Arnold, S. (2001). *Overexpression of the endogenous peroxidase-like gene spi 2 in transgenic Norway spruce plants results in increased total peroxidase activity and reduced growth*. *Plant Cell Reports*, 20(7), 596-603. doi:10.1007/s002990100360
- Elisashvili, V., & Kachlishvili, E. (2009). *Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes*. *Journal of Biotechnology*, 144(1), 37-42. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.06.020
- Elshafei, A. M., Hassan, M. M., Haroun, B. M., Elsayed, M. A., & Othman, A. M. (2012). Optimization of laccase production from *Penicillium martensii* NRC 345. *Advances in life Sciences*, 2(1), 31-37.
- Enguita, F. J., Martins, L. O., Henriques, A. O., & Carrondo, M. A. (2003). *Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19416-19425. doi:10.1074/jbc.m301251200
- Fang, W., Fernandes, É. K. K., Roberts, D. W., Bidochka, M. J., & St. Leger, R. J. (2010). *A laccase exclusively expressed by Metarhizium anisopliae during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(7), 602-607.
- Fawzi, E. M. (2011). Comparative study of two purified inulinases from thermophile *Thielavia terrestris* NRRL 8126 and mesophile *Aspergillus foetidus* NRRL 337 grown on *Cichorium intybus* l. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 633-649.
- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. Á., & Moldes, D. (2013). *Recent developments and applications of immobilized laccase*. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1808-1825. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.013
- Frasconi, M., Favero, G., Boer, H., Koivula, A., & Mazzei, F. (2010). *Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(4), 899-908. doi:10.1016/j.bbapap.2009.12.018
- Froehner, S. C., & Eriksson, K. E. (1974). Induction of *Neurospora crassa* laccase with protein synthesis inhibitors. *Journal of bacteriology*, 120(1), 450-457.
- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J., & Haltrich, D. (2002). *Characterization of the major laccase isoenzyme from Trametes pubescens and regulation of its synthesis by metal ions*. *Microbiology*, 148(7), 2159-2169. doi:10.1099/00221287-148-7-2159
- Gilbert, M., Breuil, C., & Saddler, J. N. (1992). *Characterization of the enzymes present in the cellulase system of Thielavia terrestris 255B*. *Bioresource Technology*, 39(2), 147-153. doi:10.1016/0960-8524(92)90134-j
- Gilbert, M., Yaguchi, M., Watson, D. C., Wong, K. K. Y., Breuil, C., & Saddler, J. N. (1993). A comparison of two xylanases from the thermophilic fungi *Thielavia terrestris* and *Thermoascus crustaceus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 40(4), 508-514.
- Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M., & Gold, M. H. (1983). *An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 114(3), 1077-1083. doi:10.1016/0006-291x(83)90672-1
- Glykys, D. J., Szilvay, G. R., Tortosa, P., Suárez Diez, M., Jaramillo, A., & Banta, S. (2011). *Pushing the limits of automatic computational protein design: design, expression, and characterization of a large synthetic protein based on a fungal laccase scaffold*. *Systems and Synthetic Biology*, 5(1-2), 45-58. doi:10.1007/s11693-011-9080-9
- Gochev, V. K., & Krastanov, A. I. (2007). Fungal laccases. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13(1), 75.
- Guest, T. C., & Rashid, S. (2016). Anticancer laccases: a review. *J Clin Exp Oncol* 5, 1, 2.
- Guimarães, L. R. C., Woiciechowski, A. L., Karp, S. G., Coral, J. D., Zandoná Filho, A., & Soccol, C. R. (2017). *Laccases*. *Current*

- Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 199–216. doi:10.1016/b978-0-444-63662-1.00009-9
- Gutiérrez Suárez, A., & Martínez, Á. T. (1996). Mecanismos de biodegradación de la lignina.
- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 89(1), 17-34.
- Hakulinen, N., Kiiskinen, L.-L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., & Rouvinen, J. (2002). *Crystal structure of a laccase from Melanocarpus albomyces with an intact trinuclear copper site. Nature Structural Biology*. doi:10.1038/nsb823
- Hakulinen, N., Andberg, M., Kallio, J., Koivula, A., Kruus, K., & Rouvinen, J. (2008). A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccase. *Journal of Structural Biology*, 162(1), 29–39. doi:10.1016/j.jsb.2007.12.003
- Hildén, K., Hakala, T. K., & Lundell, T. (2009). *Thermotolerant and thermostable laccases. Biotechnology Letters*, 31(8), 1117–1128. doi:10.1007/s10529-009-9998-0
- Hopkins, T. L., & Kramer, K. J. (1992). *Insect Cuticle Sclerotization. Annual Review of Entomology*, 37(1), 273–302. doi:10.1146/annurev.en.37.010192.001
- Hullo, M.-F., Moszer, I., Danchin, A., & Martin-Verstraete, I. (2001). *CotA of Bacillus subtilis Is a Copper-Dependent Laccase. Journal of Bacteriology*, 183(18), 5426–5430. doi:10.1128/jb.183.18.5426-5430.2001
- Imura, Y., Sonoki, T., & Habe, H. (2018). *Heterologous expression of Trametes versicolor laccase in Saccharomyces cerevisiae. Protein Expression and Purification*, 141, 39–43. doi:10.1016/j.pep.2017.09.004
- Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M., & Paszczyński, A. J. (2013). *Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. Enzyme and Microbial Technology*, 52(1), 1–12. doi:10.1016/j.enzmictec.2012.10.003
- Janusz, Pawlik, Świdarska-Burek, Polak, Sulej, Jarosz-Wilkołazka, & Paszczyński. (2020). Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 966. doi:10.3390/ijms21030966
- Jones, S. M., & Solomon, E. I. (2015). *Electron transfer and reaction mechanism of laccases. Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 869–883. doi:10.1007/s00018-014-1826-6
- Kallio, J. P., Gasparetti, C., Andberg, M., Boer, H., Koivula, A., Kruus, K., Rouvinen, J. & Hakulinen, N. (2011). *Crystal structure of an ascomycete fungal laccase from Thielavia arenaria - common structural features of asco-laccases. FEBS Journal*, 278(13), 2283–2295. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08146.x
- Kant, R. (2012) Textile dyeing industry an environmental hazard. *Natural Science*, 4, 22-26. doi: 10.4236/ns.2012.41004.
- Keilin, D., & Mann, T. (1939). *Laccase, a Blue Copper-Protein Oxidase from the Latex of Rhus succedanea. Nature*, 143(3610), 23–24. doi:10.1038/143023b0
- Kiiskinen, L. L., Viikari, L., & Kruus, K. (2002). Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 198-204
- Kiiskinen, L. L., Kruus, K., Bailey, M., Ylösmäki, E., Siika-aho, M., & Saloheimo, M. (2004). Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology*, 150(9), 3065-3074.
- Kramer, K. J., Kanost, M. R., Hopkins, T. L., Jiang, H., Zhu, Y. C., Xu, R., J.K., L, Turecek, F. (2001). *Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. Tetrahedron*, 57(2), 385–392. doi:10.1016/s0040-4020(00)00949-2
- Kües, U., & Rühl, M. (2011). *Multiple Multi-Copper Oxidase Gene Families in Basidiomycetes – What for? Current Genomics*, 12(2), 72–94. doi:10.2174/138920211795564377
- Kumar, S. V. S., Phale, P. S., Durani, S., & Wangikar, P. P. (2003). *Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. Biotechnology and Bioengineering*, 83(4), 386–394. doi:10.1002/bit.10681
- Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2007). *Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*: 233-245.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008 a). *Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. Microbial Cell Factories*, 7(1), 32. doi:10.1186/1475-2859-7-32
- Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008 b). *Laccases and Their Applications: A Patent Review. Recent Patents on Biotechnology*, 2(1), 10–24. doi:10.2174/187220808783330965
- Kwiatos, N., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Krzemińska, A., Delavari, A., Paneth, P., & Bielecki, S. (2020). *Evolved Fusarium oxysporum laccase expressed in Saccharomyces cerevisiae. Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-60204-1
- Larrondo, L. F., Salas, L., Melo, F., Vicuna, R., & Cullen, D. (2003). *A Novel Extracellular Multicopper Oxidase from Phanerochaete chrysosporium with Ferroxidase Activity. Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 6257–6263. doi:10.1128/aem.69.10.6257-6263.2003
- Lee, I.-Y., Jung, K.-H., Lee, C.-H., & Park, Y.-H. (1999). *Biotechnology Letters*, 21(11), 965–968. doi:10.1023/a:1005646812381
- Li, H., Webb, S. P., Ivanic, J., & Jensen, J. H. (2004). *Determinants of the Relative Reduction Potentials of Type-1 Copper Sites in Proteins. Journal of the American Chemical Society*, 126(25), 8010–8019. doi:10.1021/ja049345y
- Li, W., Yu, J., Li, Z., & Yin, W. B. (2019). Rational design for fungal laccase production in the model host *Aspergillus nidulans*. *Science China Life Sciences*, 62(1), 84-94.
- Liu, Y., Luo, G., Hao Ngo, H., Guo, W., & Zhang, S. (2019). *Advances in thermostable laccase and its current application in lignin-first biorefinery: a review. Bioresource Technology*, 122511. doi:10.1016/j.biortech.2019.122511
- Liu, J., Cai, Y., Liao, X., Huang, Q., Hao, Z., Hu, M., ... & Li, Z. (2013). Efficiency of laccase production in a 65-L air-lift reactor for potential green industrial and environmental application. *Journal of Cleaner Production*, 39, 154-160.
- Loi, M., Quintieri, L., De Angelis, E., Monaci, L., Logrieco, A. F., Caputo, L., & Mulè, G. (2020). Yield improvement of the Italian fresh Giuncata cheese by laccase-induced protein crosslink. *International Dairy Journal*, 100, 104555. doi:10.1016/j.idairyj.2019.104555
- Luis, P., Walther, G., Kellner, H., Martin, F., & Buscot, F. (2004). *Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. Soil Biology and Biochemistry*, 36(7), 1025–1036. doi:10.1016/j.soilbio.2004.02.017
- Lundell, T. K., Mäkelä, M. R., & Hildén, K. (2010). *Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - ecological, functional and*

- phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology*, 50(1), 5–20. doi:10.1002/jobm.200900338
- Luo, L., Meng, H., & Gu, J.-D. (2017). *Microbial extracellular enzymes in biogeochemical cycling of ecosystems. Journal of Environmental Management*, 197, 539–549. doi:10.1016/j.jenvman.2017.04.023
- Madhavi, V & Lele S. S. (2009). *Laccase: Properties and applications. BioResources* 4 (4): 1694-1717.
- Magyar, I., & Soós, J. (2016). *Botrytized wines – current perspectives. International Journal of Wine Research, Volume 8, 29–39.* doi:10.2147/ijwr.s100653
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., & Bhat, M. K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 64(3), 461–488. doi:10.1128/mubr.64.3.461-488.2000
- Majjala, P., Mattinen, M.-L., Nousiainen, P., Kontro, J., Asikkala, J., Sipilä, J., & Viikari, L. (2012). *Action of fungal laccases on lignin model compounds in organic solvents. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 76, 59–67. doi:10.1016/j.molcatb.2011.12.009
- Malinowski, S., Wardak, C., Jaroszyńska-Wolińska, J., Herbert, P. A. F., & Pietrzak, K. (2020). New electrochemical laccase-based biosensor for dihydroxybenzene isomers determination in real water samples. *Journal of Water Process Engineering*, 34, 101150.
- Malloch, D., & Cain, R. F. (1973). *The Genus Thielavia. Mycologia*, 65(5), 1055–1077. doi:10.1080/00275514.1973.12019527
- Martins, L. O., Durão, P., Brissos, V., & Lindley, P. F. (2015). *Laccases of prokaryotic origin: enzymes at the interface of protein science and protein technology. Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 911–922. doi:10.1007/s00018-014-1822-x
- Mate, D. M., & Alcalde, M. (2017). Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial biotechnology*, 10(6), 1457-1467.
- Mayer, A. M. (1986). *Polyphenol oxidases in plants-recent progress. Phytochemistry*, 26(1), 11–20. doi:10.1016/s0031-9422(00)81472-7
- Mayer, A. & Staples, R. (2002). *Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry*, 60(6), 551–565. doi:10.1016/s0031-9422(02)00171-1
- Mazur, I., Rola, B., Stolarczyk, K., Nazaruk, E., Bilewicz, R., Rogalski, J., & Ohga, S. (2015). The large scale production of cerrena unicolor laccase on waste agricultural based media. *J Fac Agric Kyushu Univ*, 60, 297-302.
- Mehra, R., Muschiol, J., Meyer, A. S., & Kepp, K. P. (2018). *A structural-chemical explanation of fungal laccase activity. Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-35633-8
- Messerschmidt, A., & Huber, R. (1990). *The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin Modelling and structural relationships. European Journal of Biochemistry*, 187(2), 341–352. doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15311.x
- Momeni, M. H., Bollella, P., Ortiz, R., Thormann, E., Gorton, L., & Abou Hachem, M. (2019). A novel starch-binding laccase from the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* highlights the functional diversity of ascomycete laccases. *BMC biotechnology*, 19(1), 1–12.
- Moreno, A. D., Ibarra, D., Eugenio, M. E., & Tomás-Pejó, E. (2020). Laccases as versatile enzymes: from industrial uses to novel applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(3), 481-494.
- Moreno, L. F., Feng, P., Weiss, V. A., Vicente, V. A., Stielow, J. B., & de Hoog, S. (2017). *Phylogenomic analyses reveal the diversity of laccase-coding genes in Fonsecaea genomes. PLOS ONE*, 12(2), e0171291. doi:10.1371/journal.pone.0171291
- Morgan-Jones, G. (1974). *Notes on Hyphomycetes. V. A new thermophilic species of Acremonium. Canadian Journal of Botany*, 52(2), 429–431. doi:10.1139/b74-054
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V., & Yaropolov, Y. I. (2007 a). *Laccase-mediator systems and their applications: A review. Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5), 523–535. doi:10.1134/s0003683807050055
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., & Yaropolov, A. I. (2007 b). “Blue” laccases. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10), 1136-1150.
- Mot, A. C., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2012). *Laccases: Complex architectures for one-electron oxidations. Biochemistry (Moscow)*, 77(12), 1395–1407. doi:10.1134/s0006297912120085
- Mougin, C., Kollmann, A., & Jolival, C. (2002). *Biotechnology Letters*, 24(2), 139–142. doi:10.1023/a:1013802713266
- Mtibaà, R., Barriuso, J., de Eugenio, L., Aranda, E., Belbahri, L., Nasri, M., Martínez M.J. & Mechichi, T. (2018). *Purification and characterization of a fungal laccase from the ascomycete Thielavia sp. and its role in the decolorization of a recalcitrant dye. International Journal of Biological Macromolecules.* doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.175
- Mtibaà, R., Ezzanad, A., Aranda, E., Pozo, C., Ghariani, B., Moraga, J., Nasri M., Cantoral J.M., Garrido C. & Mechichi, T. (2019). *Biodegradation and toxicity reduction of nonylphenol, 4-tert-octylphenol and 2,4-dichlorophenol by the ascomycetous fungus Thielavia sp HJ22: Identification of fungal metabolites and proposal of a putative pathway. Science of The Total Environment*, 135129. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135129
- Muthukumarasamy, N. P., & Murugan, S. (2014). Production, Purification and Application of Bacterial Laccase: A Review. *Biotechnology*, 13(5), 196-205.
- O’Malley, D. M., Whetten, R., Bao, W., Chen, C.-L., & Sederoff, R. R. (1993). The role of laccase in lignification. *The Plant Journal*, 4(5), 751–757. doi:10.1046/j.1365-313x.1993.04050751.x
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J., & Rodríguez-Couto, S. (2010). Review Article Uses of Laccases in the Food Industry. *Enzyme Research Volume*.
- Otto, B., Schlosser, D., & Reisser, W. (2010). *First description of a laccase-like enzyme in soil algae. Archives of Microbiology*, 192(9), 759–768. doi:10.1007/s00203-010-0603-7
- Otto, B., & Schlosser, D. (2014). *First laccase in green algae: purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from Tetracystis aerea. Planta*, 240(6), 1225–1236. doi:10.1007/s00425-014-2144-9
- Otto, B., Beuchel, C., Liers, C., Reisser, W., Harms, H., & Schlosser, D. (2015). *Laccase-like enzyme activities from chlorophycean green algae with potential for bioconversion of phenolic pollutants. FEMS Microbiology Letters*, 362(11). doi:10.1093/femsle/fnv072
- Palvannan, T., & Sathishkumar, P. (2010). *Production of laccase from Pleurotus florida NCIM 1243 using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. Journal of Basic Microbiology*, 50(4), 325–335. doi:10.1002/jobm.200900333
- Partavian, A., Mikkelsen, T. N., & Vestergård, M. (2015). *Plants increase laccase activity in soil with long-term elevated CO<sub>2</sub> legacy. European Journal of Soil Biology*, 70, 97–103. doi:10.1016/j.ejsobi.2015.08.002

- Pezzella, C., Guarino, L., & Piscitelli, A. (2015). How to enjoy laccases. *Cellular and molecular life sciences*, 72(5), 923-940.
- Piscitelli, A., Pezzella, C., Giardina, P., Faraco, V., & Sannia, G. (2010). *Heterologous laccase production and its role in industrial applications*. *Bioengineered Bugs*, 1(4), 254–264. doi:10.4161/bbug.1.4.11438
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., & Faraco, V. (2011). *Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi*. *Current Genomics*, 12(2), 104–112. doi:10.2174/138920211795564331
- Prakash, O., Mahabare, K., Yadav, K. K., & Sharma, R. (2019). Fungi from Extreme Environments: A Potential Source of Laccases Group of Extremozymes. In *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance* (pp. 441-462). Springer, Cham.
- Ravalason, H., Bertaud, F., Herpoël-Gimbert, I., Meyer, V., Ruel, K., Joseleau, J.-P., ... Petit-Conil, M. (2012). *Laccase/HBT and laccase-CBM/HBT treatment of softwood kraft pulp: Impact on pulp bleachability and physical properties*. *Bioresource Technology*, 121, 68–75. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.077
- Raymo, F. M., & Stoddart, J. F. (1996). *Second-Sphere Coordination*. *Chemische Berichte*, 129(9), 981–990. doi:10.1002/cber.19961290902
- Renders, T., Van den Bosch, S., Koelewijn, S.-F., Schutyser, W., & Sels, B. F. (2017). *Lignin-first biomass fractionation: the advent of active stabilisation strategies*. *Energy & Environmental Science*, 10(7), 1551–1557. doi:10.1039/c7ee01298e
- Rey, M. W., Brown, K. M., Golightly, E. J., Fuglsang, C. C., Nielsen, B. R., Hendriksen, H. V., ... Xu, F. (2003). *Cloning, Heterologous Expression, and Characterization of Thielavia terrestris Glucoamylase*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 111(3), 153–166. doi:10.1385/abab:111:3:153
- Robert, V., Mekmouche, Y., R. Pailley, P., & Tron, T. (2011). *Engineering Laccases: In Search for Novel Catalysts*. *Current Genomics*, 12(2), 123–129. doi:10.2174/138920211795564340
- Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). *Industrial and biotechnological applications of laccases: A review*. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500–513. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.04.003
- Rodríguez, C. S., Santoro, R., Cameselle, C., & Sanroman, A. (1997). *Laccase production in semi-solid cultures of Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology letters*, 19(10), 995-998.
- Rodríguez, R. D., Heredia, G., Siles, J. A., Jurado, M., Saparrat, M. C. N., García-Romera, I., & Sampedro, I. (2019). *Enhancing laccase production by white-rot fungus Funalia floccosa LPSC 232 in co-culture with Penicillium commune GHAI86*. *Folia microbiologica*, 64(1), 91-99.
- Rosgaard, L., Pedersen, S., Cherry, J. R., Harris, P., & Meyer, A. (2006). *Efficiency of New Fungal Cellulase Systems in Boosting Enzymatic Degradation of Barley Straw Lignocellulose*. *Biotechnology Progress*, 22(2), 493–498. doi:10.1021/bp050361o
- Ruggiero, P., & Radogna, V. M. (1984). *Properties of laccase in humus-enzyme complexes*. *Soil Science*, 138(1), 74–87. doi:10.1097/00010694-198407000-00011
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., ... Kirk, P. M. (2015). *A Higher-Level Classification of All Living Organisms*. *PLOS ONE*, 10(4), e0119248. doi:10.1371/journal.pone.0119248
- Salar, R. K. and Aneja, K.R. (2007) *Thermophilic Fungi: Taxonomy and Biogeography*. *Journal of Agricultural Technology* 3(1): 77-107
- Saloheimo, M., & Niku-Paavola, M. L. (1991). *Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the Phlebia radiata laccase gene in Trichoderma reesei*. *Bio/Technology*, 9(10), 987-990.
- Samson, R. A., Jack Crisman, M., & Tansey, M. R. (1977). *Observations on the thermophilous ascomycete Thielavia terrestris*. *Transactions of the British Mycological Society*, 69(3), 417–423. doi:10.1016/s0007-1536(77)80080-6
- Sandhu, D. K., & Arora, D. S. (1984). *Laccase production by polyporus versicolor on different substrates*. *Acta Biotechnologica*, 4(1), 49–57. doi:10.1002/abio.370040109
- Santiago, G., de Salas, F., Lucas, M. F., Monza, E., Acebes, S., Martinez, Á. T., ... Guallar, V. (2016). *Computer-Aided Laccase Engineering: Toward Biological Oxidation of Arylamines*. *ACS Catalysis*, 6(8), 5415–5423. doi:10.1021/acscatal.6b01460
- Savoie, J.-M., Mata, G., & Billette, C. (1998). *Extracellular laccase production during hyphal interactions between Trichoderma sp. and Shiitake, Lentinula edodes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(5), 589–593. doi:10.1007/s002530051218
- Sekretaryova, A., Jones, S. M., & Solomon, E. I. (2019). *O<sub>2</sub> Reduction to Water by High Potential Multicopper Oxidases: Contributions of the T1 Copper Site Potential and the Local Environment of the Trinuclear Copper Cluster*. *Journal of the American Chemical Society*, 141(28), 11304–11314. doi:10.1021/jacs.9b05230
- Senthivelan, T., Kanagaraj, J., & Panda, R. C. (2016). *Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(1), 19–38. doi:10.1007/s12257-015-0278-7
- Sharma, P., Goel, R., & Capalash, N. (2006). *Bacterial laccases*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 823–832. doi:10.1007/s11274-006-9305-3
- Sharma, A., Sharma, A., Singh, S., Kuhad, R. C., & Nain, L. (2019). *Thermophilic Fungi and Their Enzymes for Biorefineries*. *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance*, 479–502. doi:10.1007/978-3-030-19030-9\_24
- Shwab, E. K., & Keller, N. P. (2008). *Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes*. *Mycological Research*, 112(2), 225–230.
- Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N., & Sharma, P. (2011). *Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme*. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10(4), 309–326. doi:10.1007/s11157-011-9257-4
- Singh, G., & Arya, S. K. (2019). *Utility of laccase in pulp and paper industry: A progressive step towards the green technology*. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.168
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996). *Multicopper Oxidases and Oxygenases*. *Chemical Reviews*, 96(7), 2563–2606. doi:10.1021/cr950046o
- Solomon, E. I., Augustine, A. J., & Yoon, J. (2008). *O<sub>2</sub> Reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases*. *Dalton Transactions*, (30), 3921. doi:10.1039/b800799c
- Spitzer, P., Wunderli, S., Maksymiuk, K., Michalska, A., Kisiel, A., Galus, Z., & Tauber, G. (2013). *Reference Electrodes for Aqueous Solutions*. *Handbook of Reference Electrodes*, 77–143. doi:10.1007/978-3-642-36188-3\_5
- Stanzione, I., Pezzella, C., Giardina, P., Sannia, G., & Piscitelli, A. (2020). *Beyond natural laccases: extension of their potential*

applications by protein engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(3), 915-924.

Stoll, M. (2007). *Donald G. Cooney u. Ralph Emerson, Thermophilic Fungi. An Account of their Biology, Activities, and Classification. XII, 188 S., 74 Abb., 8 Tab, 6 Taf. San Francisco u. London 1964: W. H. Freeman & Comp. sh 36.-. Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*, 6(2), 137-137. doi:10.1002/jobm.19660060212

Strong, P. J., & Burgess, J. E. (2007). *Bioremediation of a wine distillery wastewater using white rot fungi and the subsequent production of laccase. Water Science and Technology*, 56(2), 179-186. doi:10.2166/wst.2007.487

Tamayo, E. N., Villanueva, A., Hasper, A. A., Graaff, L. H. de, Ramón, D., & Orejas, M. (2008). *CreA mediates repression of the regulatory gene xlnR which controls the production of xylanolytic enzymes in Aspergillus nidulans. Fungal Genetics and Biology*, 45(6), 984-993.

Tang, J., Long, L., Cao, Y., & Ding, S. (2019). *Expression and characterization of two glucuronoyl esterases from Thielavia terrestris and their application in enzymatic hydrolysis of corn bran. Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-019-09662-w

Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends in biotechnology*, 37(7), 761-774.

Tudzynski, B. (2014). *Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. Frontiers in Microbiology*, 5.

Theuerl, S., & Buscot, F. (2010). *Laccases: toward disentangling their diversity and functions in relation to soil organic matter cycling. Biology and Fertility of Soils*, 46(3), 215-225. doi:10.1007/s00374-010-0440-5

Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140(1), 19-26.

Tien, M., & Kirk, T. K. (1983). *Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete Phanerochaete chrysosporium Burds. Science*, 221(4611), 661-663. doi:10.1126/science.221.4611.661

Tien, M., & Kirk, T. K. (1988). *Lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium. Biomass Part B: Lignin, Pectin, and Chitin*, 238-249. doi:10.1016/0076-6879(88)61025-1

Tissières, A. (1948). *Reconstruction of Laccase from its Protein and Copper. Nature*, 162(4113), 340-341. doi:10.1038/162340a0

Unuofin, J. O., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2019). *Aptitude of Oxidative Enzymes for Treatment of Wastewater Pollutants: A Laccase Perspective. Molecules*, 24(11), 2064. doi:10.3390/molecules24112064

Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Agrawal, P. K. (2016). *Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. 3 Biotech*, 6(1). doi:10.1007/s13205-015-0316-3

van de Pas, D., Hickson, A., Donaldson, L., Lloyd-Jones, G., Tamminen, T., Fernyhough, A., & Mattinen, M. L. (2011). Characterization of fractionated lignins polymerized by fungal laccases. *BioResources*, 6(2), 1105-1121.

VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5), 619-626.

Vrsanska, M., Voberkova, S., Langer, V., Palovcikova, D., Moullick, A., Adam, V., & Kopel, P. (2016). *Induction of Laccase, Lignin Peroxidase and Manganese Peroxidase Activities in White-Rot Fungi Using Copper Complexes. Molecules*, 21(11), 1553. doi:10.3390/molecules21111553

Widsten, P., & Kandelbauer, A. (2008). *Laccase applications in the forest products industry: A review. Enzyme and Microbial Technology*, 42(4), 293-307. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.12.003

Xiao, Y. Z., Hong, Y. Z., Li, J. F., Hang, J., Tong, P. G., Fang, W., & Zhou, C. Z. (2005). *Cloning of novel laccase isozyme genes from Trametes sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 493-501. doi:10.1007/s00253-005-0188-

Yang, J., Li, W., Ng, T. B., Deng, X., Lin, J., & Ye, X. (2017). *Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00832

Yang, S., Xu, H., Yan, Q., Liu, Y., Zhou, P., & Jiang, Z. (2012). *A low molecular mass cutinase of Thielavia terrestris efficiently hydrolyzes poly(esters). Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(2), 217-226. doi:10.1007/s10295-012-1222-x

Yatsu, J., & Asano, T. (2009). *Cuticle laccase of the silkworm, Bombyx mori: Purification, gene identification and presence of its inactive precursor in the cuticle. Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(4), 254-262. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.12.005

Yoshida, H. (1883). *LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. J. Chem. Soc., Trans., 43(0), 472-486. doi:10.1039/ct8834300472*

Zhang, R., Wang, L., Han, J., Wu, J., Li, C., Ni, L., & Wang, Y. (2019). *Improving laccase activity and stability by HKUST-1 with cofactor via one-pot encapsulation and its application for degradation of bisphenol A. Journal of Hazardous Materials*, 121130. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121130

Zhou, Z., Takaya, N., Nakamura, A., Yamaguchi, M., Takeo, K., & Shoun, H. (2002). *Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 1892-1896.

Zhu, Z., Li, N., Li, W., Li, J., Li, Z., Wang, J., & Tang, X. (2019). *Laser Mutagenesis of Phellinus igniarius Protoplasts for the Selective Breeding of Strains with High Laccase Activity. Applied Biochemistry and Biotechnology*. doi:10.1007/s12010-019-03097-9

Zille, A., Munteanu, F.-D., Gübitz, G. M., & Cavaco-Paulo, A. (2005). *Laccase kinetics of degradation and coupling reactions. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 33(1-2), 23-28. doi:10.1016/j.molcatb.2005.01.005

Zouari-Mechichi, H., Mechichi, T., Dhoub, A., Sayadi, S., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (2006). *Laccase purification and characterization from Trametes trogii isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. Enzyme and Microbial Technology*, 39(1), 141-148.

## Artículos en línea

Bertrand, B., Martínez-Morales, F., & Trejo-Hernández, M. R.. (2013). *Fungal laccases: induction and production. Revista mexicana de ingeniería química*, 12(3), 473-488. Recuperado en 31 de marzo de 2020, de

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-27382013000300010&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382013000300010&lng=es&tlng=en)

Wisniak, Jaime., *Gabriel Bertrand*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas [en línea]. 2014, 45(3), 230-245 [fecha de Consulta 10 de septiembre de 2019]. ISSN: 0253-5688. Disponible en:

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181232136009>

Fawzi, Eman Mohamed. (2011). Comparative study of two purified inulinases from thermophile *Thielavia Terrestris* NRRL 8126 and mesophile *Aspergillus Foetidus* NRRL 337 grown on *Cichorium Intybus* l. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 633-649. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000200028>

Yashas S. R, Shivakumara B. P, Udayashankara T. H, Krishna B. M. Laccase Biosensor: Green Technique for Quantification of Phenols in Wastewater (A Review). *Orient J Chem* 2018;34(2). <http://www.orientchem.org/?p=44705>

## Imágenes

Rose et al. (2018) NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*

doi:10.1093/bioinformatics/bty419), and RCSB PDB.

Huang, H. (2017). *THE PLANTS OF JOHN BRADBY BLAKE*. *Curtis's Botanical Magazine*, 34(4), 359–378. doi:10.1111/curt.12209

## Libros

Libros completos

Salar, R.K., (2018). *Thermophilic Fungi: Basic Concepts and Biotechnological Applications*, CRC Press Boca Raton, FL.

Capítulos de libros

Farver, O. & I. Pecht. (1984). *The reactivity of copper sites in the "blue" copper proteins*. In: R. Lontie (Ed.), *Copper Proteins and Copper Enzymes*, Vol. 1, pp. 183-214. CRC Press, Boca Raton, FL.

Prakash, O., Mahabare, K., Yadav, K. K., & Sharma, R. (2019). *Fungi from Extreme Environments: A Potential Source of Laccases Group of Extremozymes*. *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance*, 441–462. doi:10.1007/978-3-030-19030-9\_22

Kyritsis P., Dennison C., Sykes A.G. (1995) Structure and Reactivity of the Blue Copper Proteins. In: Kessissoglou D.P. (eds) *Bioinorganic Chemistry*. NATO ASI Series (Series C: Mathematical and Physical Sciences), vol 459. Springer, Dordrecht

## Libros en línea

Kumanotani, J. (1988). The Chemistry of Oriental Lacquer (*Rhus vernicifera*) In Brommelle, N. S. & Smith, Perry (eds.), *Urushi: Proceedings of the Urushi Study Group, June 10–27, 1985, Tokyo*. (pp. 243-252) Los Angeles: Getty Publications. Consultado 10 de septiembre de 2019 en <http://bit.do/e8fiU>

Reynolds Green, J. (2014). *The Soluble Ferments and Fermentation*. (pp. 331-312). Nueva York: Cambridge University Press. Consultado 10 de septiembre de 2019 en <http://bit.do/e8fjo>

Braus, G. H., Krappmann, S., & Eckert, S. E. (2002). Sexual development in ascomycetes: fruit body formation of *Aspergillus nidulans*. *Mycology Series*, 15, 215-244.

## Sitios web

EMBL-EBI. (2016) Functional genomics (II): Common technologies and data analysis methods. Consultado el 26 de julio de 2020 en <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/functional-genomics-ii-common-technologies-and-data-analysis-methods>

Luley, Christopher. (2006) *Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en árboles urbanos* (Llorens, Jacobo, trad.) Consultado 17 de septiembre de 2019 en <https://www.isahispana.com/treecare/articles/decay-fungi>

Zopf W. (1872). "Thielavia basicola Zopf. Genus novum Perisporiacearum". *Verhandlungen des Botanischen Vereins für die Provinz Brandenburg und die Angrenzenden Länder*. 18: 101–5.

## Software y plataformas

Primer designing tool - NCBI - NIH

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(1), 134.

Phyre2

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.