



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Expresión heteróloga del gen LACP83 de *Pleurotus
ostreatus*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Amado Israel Grandes Blanco

Director
Dr. Gerardo Díaz Godínez

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2018



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Expresión heteróloga del gen *LACP83* de *Pleurotus*
ostreatus.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Amado Israel Grandes Blanco

Comité Tutorial

Dr. Gerardo Díaz Godínez
Dra. Carmen Sánchez Hernández
Dr. Gerardo Santos López
Dra. Maura Téllez Téllez

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2018

El presente trabajo se llevó a cabo en el posgrado del CTBC de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de beca 241720.



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

Posgrado en Ciencias Biológicas



COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Amado Israel Grandes Blanco** realiza para la obtención del grado de **Doctor en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Expresión heteróloga del gen LACP83 de *Pleurotus ostreatus*”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.


A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., DICIEMBRE 21 DE 2017



DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

Adriana Montoya E.

DRA. ADRIANA MONTOYA ESQUIVEL

~~~~

DR. GERARDO SANTOS LÓPEZ

~~~~

DR. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ



DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070, Tlaxcala, Tlax. Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

Posgrado en Ciencias Biológicas



COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Amado Israel Grandes Blanco** realiza para la obtención del grado de **Doctor en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Expresión heteróloga del gen LACP83 de *Pleurotus ostreatus*”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., DICIEMBRE 21 DE 2017



DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

Adriana Montoya E.

DRA. ADRIANA MONTOYA ESQUIVEL

~~~~

DR. GERARDO SANTOS LÓPEZ

~~~~

DR. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ



DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070, Tlaxcala, Tlax. Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradocbtucat@gmail.com

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado del CTBC y a la Universidad Autónoma de Tlaxcala por su apoyo brindado durante la realización de mi doctorado.

A CONACYT por la beca otorgada que me ha permitido finalizar mis estudios.

Al Dr. Gerardo Díaz Godínez por su apreciable amistad y sobre todo su guía en el transcurso de mi carrera académica.

Al Dr. Gerardo Santos López, por su apoyo incondicional durante mi estancia en el CIBIOR.

A la Dra. Maura Téllez Téllez por su apoyo desde el inicio de mis estudios de posgrado

Al Dr. Rubén Díaz Godínez por su tiempo otorgado para poder retroalimentar mi trabajo

Al Dr. Saúl Tlecuítl Beristain, por su amistad y apoyo durante la estancia de investigación dentro de la Universidad Politécnica de Tlaxcala.

Al Maestro Luis Márquez por su amistad y apoyo en todas las etapas del proyecto.

A la Dra. Lilia Sánchez Minutti por su amistad y apoyo en la etapa académica.

Resumen

Las enzimas lacasas son polifenol oxidasas debido a que son capaces de catalizar la oxidación de una amplia gama de compuestos aromáticos, usando al oxígeno molecular como aceptor de electrones para la formación de moléculas de agua. Son enzimas que han sido ampliamente estudiadas y se han encontrado en diversos organismos como; plantas, bacterias, insectos, arqueas y han sido más ampliamente estudiado en hongos. Debido a la inespecificidad del sustrato, las lacasas están involucradas en diversos procesos biológicos, y debido al hecho de que presentan una gran variabilidad catalítica, se ha hecho evidente la amplia gama en la que se puede llegar a utilizar esta enzima en procesos biotecnológicos como son el desarrollo de medicamentos, la industria alimentaria y vinícola, nanotecnología, la rama textil y la biorremediación. En nuestros días el uso de la biología molecular es una herramienta que nos ayuda entre otras cosas, al diseño y manipulación de proteínas recombinantes, ya sea dentro de la misma especie u otra, con la que se tienen grandes ventajas, entre las que se encuentran la disminución de tiempo de producción y el bajo costo. En el presente trabajo se hizo la expresión heteróloga del gen *lacP83* de *Pleurotus ostreatus* en *Escherichia coli*. Encontrando la expresión del gen en *E. coli* en menor tiempo comparado con la expresión en *P. ostreatus*, además se evaluó su estabilidad ante el almacenamiento, encontrando que la enzima pierde su actividad catalítica después de 30 días a 4 °C. Estos hallazgos presentan datos importantes, ya que es el primer estudio del gen LACP83 expresado en un sistema procarionte.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Las enzimas lacasas	1
1.1.1 Clasificación	1
1.1.2 Estructura	1
1.1.3 Organismos productores de lacasas	4
1.1.4 Función biológica de las lacasas	6
1.1.5 Aplicaciones de la enzima lacasa	11
1.2 Los hongos y la expresión de lacasas	12
1.2.1 Hongos de pudrición blanca	12
1.2.2 El género <i>Pleurotus</i>	13
1.2.3 Isoformas y genes de lacasas	15
1.2.4 Regulación de la expresión de lacasas	18
1.2.5 Expresión heteróloga de Lacasas	20
2. ANTECEDENTES	23
2.1.1 Genes de lacasas	23
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo general	29
5.2. Objetivos particulares	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 Diagrama de trabajo	30
6.2 Material biológico	31
6.3 Plásmidos	31
6.4 Caracterización de fermentación en medio líquido	31
6.4.1 Condiciones de cultivo de <i>P. ostreatus</i>	31
6.4.2 Obtención del extracto enzimático y evaluación de la biomasa	32

6.5 Determinación de la actividad enzimática	32
6.6 Zimografía y geles de electroforesis	33
6.7 Determinación de la concentración de proteína soluble	33
6.8 Determinación del contenido de azúcares	33
6.9 Expresión del gen de lacasa en un sistema heterólogo	34
6.9.1 Condiciones de cultivo de <i>E. coli</i>	34
6.9.2 Obtención y amplificación del gen LACP83	34
6.9.3 Construcción del vector de clonación	35
6.9.4 Construcción del vector de expresión	35
6.9.5 Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 recombinante	35
6.9.6 Determinación de la actividad enzimática de <i>E. coli</i> BL21 recombinante	36
7. RESULTADOS	37
7.1 Caracterización de la fermentación en medio líquido	37
7.2 Expresión del gen de lacasa en un sistema heterólogo	40
7.2.1 Construcción del vector de clonación	40
7.2.2 Construcción del vector de Expresión	41
7.2.3 Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 recombinante	46
7.2.4 Cinética enzimática de lacasa recombinante	47
8. CONCLUSIONES	51
9. PERSPECTIVAS	52
10. REFERENCIAS	53
11. PUBLICACIONES	79

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características de los tipos de cobre de lacasas de los hongos	2
Tabla 2. Lacasas de <i>P. ostreatus</i>	17
Tabla 3. Producción de lacasa heteróloga	22
Tabla 4. Proteínas y genes reportados para lacasas en diferentes organismos	23

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura de Lacasa de <i>Trametes hirsuta</i>	3
Figura 2. Posible mecanismo de transferencia de electrones	4
Figura 3. Mecanismo de degradación	11
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Pleurotus ostreatus</i>	15
Figura 5. Diagrama general de trabajo	30
Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en medio líquido	37
Figura 7. Concentración de glucosa de la fermentación de <i>P. ostreatus</i>	38
Figura 8. Concentración de proteínas solubles de la fermentación de <i>P. ostreatus</i>	38
Figura 9. Actividad de lacasa durante la fermentación de <i>P. ostreatus</i>	39
Figura 10. Isoformas de lacasas de la fermentación de <i>P. ostreatus</i>	39
Figura 11. Construcción del vector de expresión	40
Figura 12. Gel de agarosa de los productos de PCR	41
Figura 13. PCR de las clonas de TOP10 transformadas con pJETP83-pQ	42
Figura 14. Perfil de restricción del plásmido pJETP83-pQ	43
Figura 15. Perfil de restricción con las dos enzimas BamHI y HindII	43
Figura 16. Producto de PCR del plásmido pJETP83-pQ	44
Figura 17. Gel de agarosa con purificación de plásmido de expresión	45
Figura 18. Gel de agarosa con plásmido pQEP83 y producto de PCR	46
Figura 19. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 recombinante	47
Figura 20. Cinética de lacasa recombinante de <i>E. coli</i> BL21 con IPTG	48
Figura 21. Cinética de lacasa recombinante en diferentes tiempos de almacenamiento .	49
Figura 22. Electroforesis de las fermentaciones de <i>E. coli</i> BL21	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las enzimas lacasas

1.1.1 Clasificación

Las lacasas (p-difenol, oxígeno-óxido reductasas EC 1.10.3.2.) son glicoproteínas que contienen cobre y requieren oxígeno para oxidar un amplio rango de sustancias orgánicas e inorgánicas, reduciendo el oxígeno a agua (Thurston 1994). Pertenecen a un tipo de metaloproteínas denominadas oxidasas multicobre (Solomon y cols. 1996) y fueron descritas por primera vez en el exudado del árbol japonés del barniz *Rhus vernicifera* (Yoshida 1883). Estas enzimas forman parte del grupo de fenol-oxidasas las cuales contienen comúnmente en su sitio activo cuatro átomos de cobre (Edens y cols. 1999).

Se sabe que las lacasas tienen compuestos glucosilaciones de tipo N con un contenido de carbohidratos entre el 10 y 45% (Thurston 1994) y aunque pueden presentarse en forma monomérica, diméricas o tetraméricas, generalmente se presentan en forma monomérica, varían de peso molecular entre 36 y 110 kDa, presentan un pI de 2.6-6.0, así mismo la máxima actividad enzimática varía en un amplio rango de pH que va desde 2.0 a 8.5 (Thurston 1994, Leonowicz y cols. 2001, Saparrat y cols. 2002, Wesenberg y cols. 2003, Díaz y cols. 2013). Dadas estas características hace que éste grupo de enzimas sea ampliamente estudiada teniendo comprendida su estructura general.

1.1.2 Estructura

En las diferentes lacasas estudiadas se han encontrado características estructurales consenso que presentan tres dominios con cuatro átomos de cobre en estado de oxidación (Cu^{2+}) (Reinhammar y Malmström, 1981), éstos son muy conservados junto con residuos de histidina y cisteína (Thurston 1994, Kumar y cols. 2003), así mismo, los átomos de cobre se agrupan en 4 regiones conservadas (L1, L2, L3 y L4) presentando aminoácidos de unión al cobre, distribuidos en tres sitios específicos (T1, T2 y T3) (Yaropolov y cols. 1994, Kumar y cols. 2003), en el caso del

sitio T1 se encuentra la región L1 enlazada a dos átomos de nitrógeno de dos histidinas, un átomo de azufre proveniente de una cisteína y además de una metionina, formando un enlace covalente con el cobre, aunque se ha visto que la metionina puede remplazarse por leucina o fenilalanina (Solomon y cols. 2008), este sitio es el responsable del color azul de la lacasa, identificándose en una absorbancia máxima entre 600-660 nm ($\epsilon=5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Con estas características, el sitio T1 varía su potencial redox entre 460 a 790 mV (Christenson y cols. 2004). La función del sitio T1 es la oxidación del sustrato principalmente de anilina y fenoles, donde inicialmente se genera un radical libre, el electrón extraído se transfiere a través de la enzima por un motivo peptídico conservado (His-Cis-His) hasta el sitio T2, que contiene la región L2, caracterizada por residuos de histidina (Morozova

y cols. 2007), lo que le confiere afinidad a F^- , N^{3-} y CN^- . El sitio T2 no presenta ninguna característica colorimétrica debido a que absorbe ligeramente en la región visible, pero es detectable por resonancia paramagnética nuclear (EPR), sin embargo, éste forma un sitio trinuclear con las regiones L2, L3 y L4. El sitio T3 se compone de dos cationes de Cu^{2+} , este centro binuclear es detectable en espectrofotometría a 330 nm y es conocido como el sitio de reducción, éste tiene acceso a una molécula de oxígeno por dos canales. En el primer canal entra directo al T3 y otro que conduce al L2, donde el electrón que fue extraído en el sitio T1 es transportado al sitio T2-T3 y éste junto con el oxígeno se liberan dos moléculas de agua, por lo que la reacción general consiste en cuatro oxidaciones monoelectrónicas de las moléculas de sustrato con la concomitante reducción de dos moléculas de oxígeno en agua (Thurston 1994, McGuirl y Dooley 1999, Pionteck y cols. 2002, Engüita y cols. 2003, Morozova y cols. 2007, Wong 2008, Román y cols. 2010, Dwivedi y cols. 2011). En la tabla 1 se muestran las características generalizadas de las lacasas.

Tabla 1. Características de los tipos de cobre de lacasas de los hongos (Adaptado de Téllez-Téllez 2008)

Cu	Cu/Prot	Característica	Coordinación	Función
T1	1	Cobre azul, absorbancia de 610 nm (oxidación), potencial de reducción +785 mV.	2 histidinas, 1 cisteína y 1 leucina	Oxidación del sustrato, transferencia de electrones
T2	1	Cobre no azul (afinidad a azida, fluoruro, cianuro)	Centro trinuclear	(Re-oxidación de T1 y activación del oxígeno molecular)

T3	2	Par de cobre, absorbancia a 330 nm (oxidación)	8 histidinas	Captación y reducción del O ₂ por oxidación enzimática.
----	---	--	--------------	--

Las enzimas lacasas han sido ampliamente estudiadas y se han purificado más de 100 tipos a partir de hongos, lo que ha permitido su caracterización y de estos hallazgos se han trazado algunos modelos tridimensionales, tal como se muestra en la figura 1 la estructura tridimensional de una lacasa de *Trametes hirsuta*.

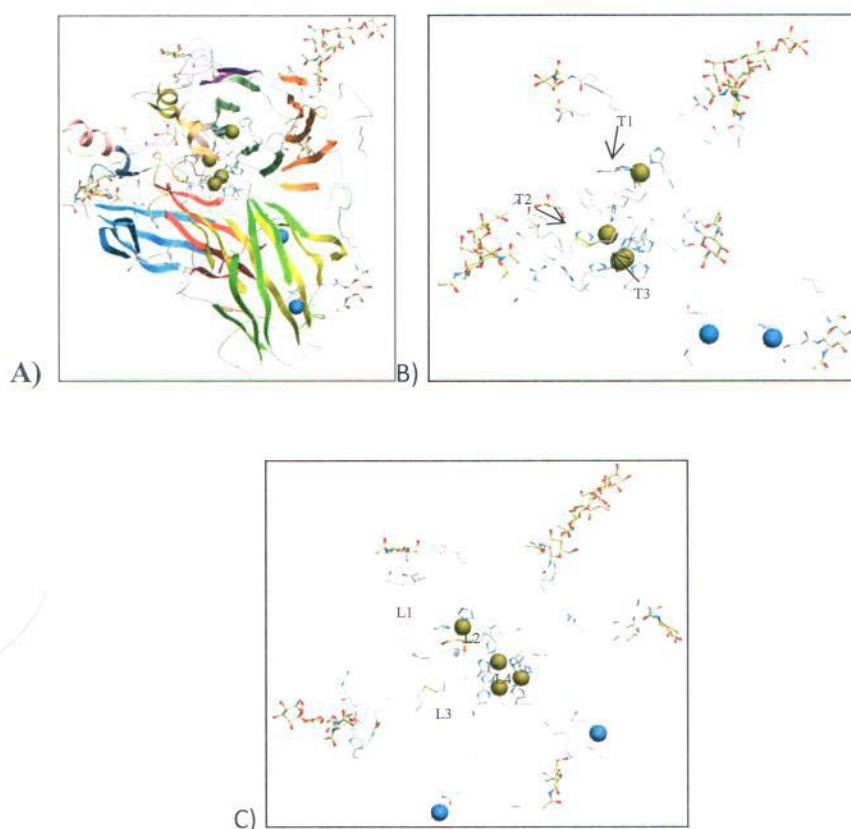


Figura 1. Estructura de lacasa de *Trametes hirsuta*, A) Estructura secundaria, B) Sitios T1, T2 y T3, C) regiones L1, L2, L3 y L4. Adaptado de RCSB PDB número 5LDU.

Del análisis arrojado de las propiedades físico-químicas de las isoformas de lacasa, se ha reportado que el sitio de unión al cobre T1 está involucrado en la eliminación de electrones por la reducción del sustrato (donador de electrones), con la subsecuente transferencia de electrones al sitio T2/T3. El mecanismo de la transferencia de electrones y la reducción del oxígeno a agua

aún no han sido totalmente aclarados, sin embargo, se ha propuesto un esquema (Figura 4) para explicar el mecanismo a partir de los datos cinéticos y estructurales disponibles (Rivera-Hoyos y cols. 2013). En el ciclo catalítico, el sustrato es reducido en el sitio T1, y el electrón es transferido al sitio trinuclear.

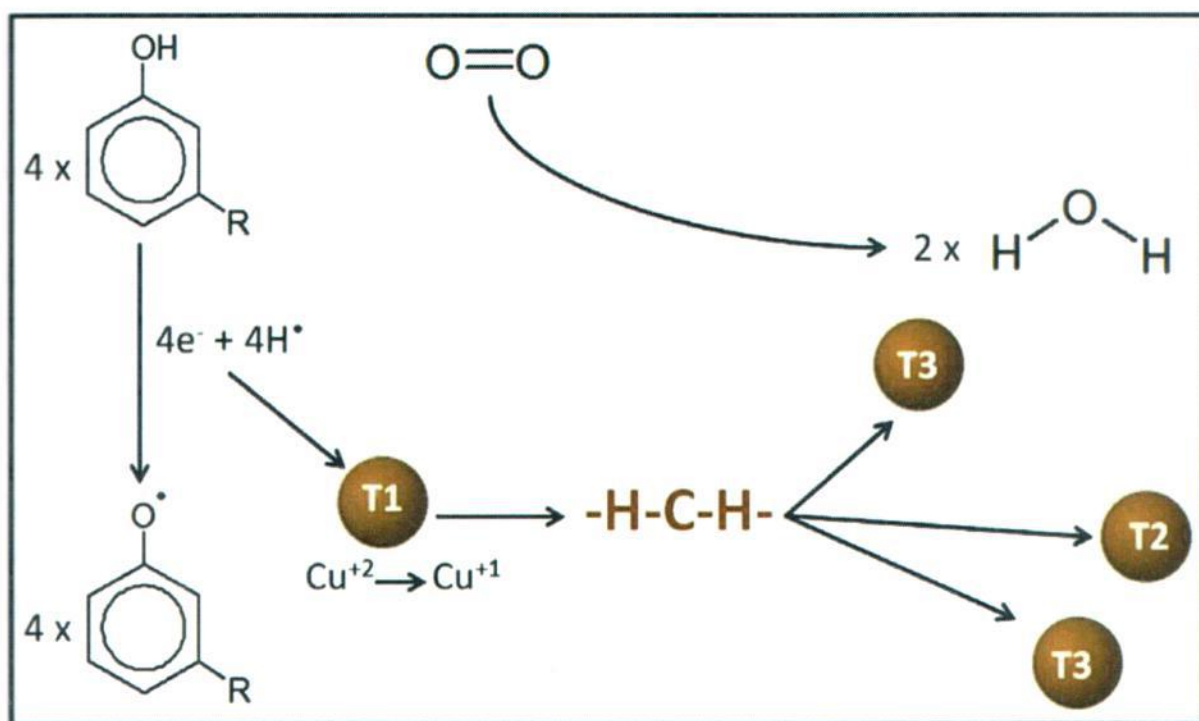


Figura 2. Posible mecanismo de transferencia de electrones. (Adaptado de Rivera-Hoyos y cols. 2013).

Las características físico-químicas descritas anteriormente no son universales para todas las lacasas estudiadas, un ejemplo de ello son las lacasas llamadas blancas, las cuales tienen un solo átomo de cobre, un átomo de hierro y dos átomos de zinc (Palmieri y cols. 1997), además de que se han encontrado lacasas que carecen de la absorbancia en el sitio T1 y estas han sido llamadas lacasas amarillas y han sido extraídas del ascomiceto *Gaeumannomyces graminis* (Edens y cols. 1999) y *Pleurotus ostreatus* (Pozdnyakova y cols. 2004), además de que algunas otras lacasas tienen diferentes características dependiendo del organismo de donde proceda.

1.1.3 Organismos productores de lacasas

Los reportes sobre organismos productores de estas enzimas son amplios, estas enzimas se han encontrado tanto en organismos eucariotas (Hopkins y Kramer 1992, Mayer y Staples 2002, Dittmer y cols. 2004), como en eubacterias (Givaudan y cols. 1993, Sánchez-Amat y cols. 2001, Martins y cols. 2002), actinomicetos (Endo y cols. 2002) e incluso arqueas (Claus 2003) presentando una función muy diversificada dependiendo del tipo de organismo.

En las plantas se ha encontrado que todos los miembros de la familia *Anacardiaceae* presentan lacasa en la resina que secretan (Mayer y Staples 2002). También se han encontrado en la planta del tabaco (Richardson y Mc Dougall 1997), césped (LaFayette y cols. 1999), mango, ciruela, durazno (Mayer y Staples 2002), algodón (Wang y cols. 2004), maíz (Caparróz-Ruiz y cols. 2006), vegetales como nabos y coles (Shraddha y cols. 2011) y algas como *Tetracystis aeria* (Otto y Schlosser 2014).

Por otra parte, también han sido reportadas en insectos como *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cupreina*, *Manduca sexta*, *Sarcophaga bullata*, *Manduca sexta* y *Anopheles gambiae*, *Bombix mori*, *Nephotettix cincticeps*, *Tribolium castaneum* y *Anopheles gambiae* (Dittmer y cols. 2004, Gianfreda y cols. 1999, Yatsu y Asano 2009, Hattori y cols. 2010, Gorman y cols. 2012).

En algunos microorganismos como las bacterias *Azospirillum lipoferum* (Givaudan y cols. 1993, Alexandre y Bally 1999, Diamantidis y cols. 2000), *Bacillus spaericus* (Claus y Filip 1997), *Phormidium valderianum* (Shashirekha y cols. 1997), *Marinomonas mediterranea* (Sánchez-Amat y cols. 2001), *Streptomyces griseus* (Solano y cols. 2001), *Bacillus subtilis* (Hullo y cols. 2001), *Escherichia coli* (Roberts y cols. 2002), *Bacillus licheniformis* (Koschorreck y cols. 2008) y *Bacillus pumilus* (Reiss y cols. 2011) también se han reportado la presencia de estas enzimas.

La mayor parte de las lacasas estudiadas son de origen fúngico y principalmente en hongos de pudrición blanca, por ser eficientes degradadores de lignina. La investigación acerca de las diferentes isoformas de lacasa ha llevado al análisis de los genes que las codifican en diversos hongos (Yaverd y Golightly 1996; Mansur y cols. 1997; Smith y cols. 1998; Giardina y cols. 1999). Otros hongos analizados que tienen la capacidad para producir éste tipo de enzimas son *Trametes villosa* (Yaver y cols. 1996), *Dichomitus squalens* (Périé y cols. 1998), *Panaeolus*

sphinctrinus, *Panaeolus papilionaceus* y *Coprinus friesii* (Heinzkill y cols. 1998), *Chaetomium thermophilum* (Chefetz y cols. 1998), *Coriolus zonatus* (Koroljova y cols. 1999), *Marasmius puercophilus* (Dedeyan y cols. 2000), *Phellinus ribis* (Min y cols. 2001), *Marasmius quercophilus* (Farnet y cols. 2002), *Cerrena unicolor* (Kim y cols. 2002), *Volvariella volvacea* (Chen y cols. 2004), *Perennipora tephropora* (Younes y cols. 2006) y *Cerrena máxima* (Lyashenko y cols. 2006).

Ha sido de importancia en la investigación científica el estudio de los hongos basidiomicetos, los cuales son los principales productores de lacasas, destacando a *Ceriporiopsis subvermispora* (Fukushima y Kirk 1995), *Daedalea quercina* (Baldrian 2005), *Phanerochaete flavido-alba* (Pérez y cols. 1996), *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert y cols. 1996), *P. coccineus* (Oda y cols. 1991), *Trametes* sp. (Xiao y cols. 2003), *T. versicolor* (Ham y cols. 2005), *T. trogii* (Zouari-Mechichi y cols. 2006), *Rigidoporus lignosus*, *Phellinus noxius* (Geiger y cols. 1986) y los géneros de *Schizophyllum*, *Sclerotium*, *Scytalidium*, *Sporotrichum*, *Stagonospora*, *Thermoascus*, *Agaricus*, *Antrodiella*, *Armillaria*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Botrytis*, *Ceriporiopsis*, *Cerrena*, *Chaetomium*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Curvularia*, *Cyathus*, *Fomes*, *Fusarium*, *Halosarpheia*, *Lactarius*, *Lentinus*, *Monocillium*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Phellinus*, *Phlebia*, *Pholiota*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Trichoderma* (Pinzón, 2004), aunque uno de los más estudiados es el hongo *Pleurotus ostreatus* (Palmieri y cols. 1997).

1.1.4 Función biológica de las lacasas

Las lacasas están ampliamente distribuidas en los organismos que habitan diversos nichos en la naturaleza y tienen diversas funciones fisiológicas, aunque todas catalizan las reacciones de polimerización y despolimerización, éstas varían dependiendo del organismo que la produzca y la forma en la que lo haga.

En las plantas se ha estudiado la implicación de las lacasas en la biosíntesis de lignina, la cual forma la pared vegetal mediante la formación de radicales fenoxilo polimerizando ligninas (Sterjiades y cols. 1992, Mayer y Staples 2002, Schmidt 2006), además de esto también se ha

encontrado su participación como respuesta inicial ante lesiones (Oshima y cols. 1985, McCaig y cols. 2005, Dwivedi y cols. 2011) y se ha correlacionado con la pigmentación en semillas gracias a la polimerización de flavonoides (Pourcel y cols. 2005), la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} en la pared celular (Hoopes y Dean 2004), el incremento de la actividad enzimática cuando las hojas están dañadas debido a que la enzima participa en protoplastos regenerativos durante los primeros cuatro días de cultivo, por lo que es muy activa en los primeros estadios de la recuperación (Martínez 2013). Se ha descrito la función de las lacasas en una respuesta primaria a la regeneración de la corteza, la cual, al sufrir un daño mecánico, como respuesta primaria secreta un barniz el cual contiene estas enzimas y al entrar en contacto con el aire se polimeriza formándose una protección en forma de película (Davies y Ducros 2001). Por otra parte, también se ha descrito su función ante hongos fitopatógenos, la cual está relacionada directamente con el ataque inicial al hospedador (Lewis y Yamamoto 1990).

En los insectos se ha encontrado que las lacasas están directamente relacionadas con la síntesis de la cutícula, consolidando un entrecruzamiento de proteína-quitina en el proceso llamado esclerotización, durante el cual se desarrolla la formación de orto y para quinonas con radicales metilo debido a la oxidación de dopamina y dihidroxifeniletanol, dando lugar a reacciones altamente activas, posteriormente las proteínas se unen mediante enlaces covalentes y esto le da un aumento en la rigidez para el ensamblaje de la cutícula (Suderman y cols. 2006). Aunado a esto, se ha reportado el papel de las lacasas en la síntesis de pigmentos de los diferentes insectos, entre los que destacan el gusano de seda (*Bombix mori*) y el gorgojo (*Tribolium castaneum*) (Thomas y cols. 1989, Andersen y cols. 1996, Arakane y cols. 2005, Yatsu y Asano 2009). Las enzimas lacasas, se han encontrado en la saliva y glándulas salivales de la langosta verde (*Nephotettix cincticeps*), donde probablemente participan en la detoxificación de compuestos fenólicos provenientes de las plantas de las que se alimentan (Hattori y cols. 2010).

En las bacterias se ha reportado que algunas enzimas presentan afinidad por el mismo sustrato que las lacasas, el cual es oxidado para la obtención de nutrientes y precursores metabólicos. Ejemplo de ello es *Marinomonas mediterranea* que produce una fenoloxidasa similar a la tirosinasa con un potencial redox de 900 mV y además es altamente activa a pH alcalino, esta enzima está implicada en la síntesis de melanina (Sánchez-Amat y cols. 1997, Sánchez-Amat

y Solano 2001, Lucas-Elio y cols. 2002). En el caso de *Escherichia coli* se ha reportado que es capaz de producir una oxidasa multicobre (PcoA), la cual utiliza para la resistencia al cobre (Brown y cols. 1995), en *Aquifex aelicus* la lacasa presenta un papel importante en la división celular (Deckert y cols. 1998). Cabe señalar que entre las bacterias más estudiadas está *Bacillus subtilis*, ya que en la fase esporulada secreta una lacasa termoestable involucrada en la formación de un pigmento que sirve como protección frente a los rayos UV y el peróxido de hidrógeno (Hullo y cols. 2001, Martins y cols. 2002, Driks 2004). Aunado a esto otro género ampliamente estudiado es *Streptomyces*, en el cual se ha reportado que sus enzimas lacasas presentan diferencias estructurales en diferentes especies, las cuales son termoestables a 70° C (Suzuki y cols. 2003), entre estas enzimas, la EpoA tiene un papel importante durante la morfogénesis (Endo y cols. 2003), teniendo actividad en condiciones extremas de alcalinidad (Niladevi y cols. 2008).

En los hongos se ha encontrado que las enzimas actúan en secuencias organizadas catalizando reacciones para la obtención de nutrientes degradando los componentes de la pared vegetal como la lignina, así mismo se ha analizado su participación en la esporulación, producción de pigmentos (melaninas de dihidroxinaftaleno/alomelaninas), fitopatogénesis, detoxificación, morfogénesis, respuesta ante estrés, protección ante patógenos fúngicos de fitoalexinas y taninos tóxicos y la formación de rizomorfos y el cuerpo fructífero del hongo (Galhaup y cols. 2002, Guo-Quing y cols. 2009, Minussi y cols. 2007, Dwivedi y cols. 2011). En *Agaricus bisporus* las lacasas se acumulan durante el crecimiento vegetativo, en forma paralela con el micelio y se inactivan rápidamente al iniciar la formación del cuerpo fructífero, por ello se les han involucrado con el crecimiento invasivo del hongo para la hidrólisis de la lignina, y así dejar disponible la celulosa y hemicelulosa (Ainsworth y Rayner, 1991). También se ha demostrado que en *Trametes versicolor* y *Pycnoporus cinnabarinus* la lacasa participa en la degradación de la lignina, donde estas oxidan las subunidades fenólicas (Thurston 1994). En cuanto a los factores de virulencia se ha reportado que la lacasa funciona como defensa contra metabolitos tóxicos en *Botrytis cinerea* (moho gris de la uva) que son producidos por la misma planta como defensa (Rigling y Van Alfen 1993)

Uno de los campos más investigados con respecto a la función de las lacasas es en la degradación de lignina, donde se han reportado que algunos organismos capaces de degradarla, entre los que se encuentran los procariotas del grupo de los actinomicetos, principalmente del género *Streptomyces*, y bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* y *Xantomonas* (Buswell y Odier 1987, Vicuña 1988). También algunos hongos ascomicetos como *Chrysonilia sitophyla* (Rodríguez y cols. 1997) y deuteromicetos como *Fusarium proliferatum* (Regalado y cols. 1997) llevan a cabo la degradación denominada podredumbre blanda, que generalmente tiene lugar en angiospermas con un alto porcentaje de humedad y sobre materiales que ya han comenzado a ser degradados por otros microorganismos (Blanchette 1995). Cuando el contenido en lignina en estos materiales supera el 20%, sólo algunos hongos de tipo basidiomiceto son capaces de iniciar el ataque a la lignina.

Otro ejemplo de la importancia de estas enzimas en hongos patógenos es *Cryptococcus neoformans*, causante de la criptococosis y uno de los principales patógenos oportunistas en enfermos inmunodeprimidos, donde la actividad lacasa aparece como uno de los principales factores de virulencia (Zhu y Williamson 2004). Se sabe que la lacasa está involucrada en la producción de pigmentos de la cubierta de la espora de *Bacillus subtilis*, protegiéndola de la radiación UV y otros factores de estrés tales como el peróxido de hidrógeno (Martins y cols. 2002). Se tiene otros reportes dónde las bacterias podrían usar la lacasa para poder resistir en ambientes tóxicos o dañinos para estas células (Solano y cols. 1997, Diamantidis y cols. 2000).

En los hongos de pudrición parda la función biológica de las lacasas está asociada con la degradación del material lignocelulósico (D'Souza y cols. 1996, Lee y cols. 2004, Wei y cols. 2010). En el caso de *Aspergillus nidulans* la producción de lacasas, está directamente relacionada con la pigmentación y los procesos oxidativos de polimerización (Law y Timberlake 1980), en *Volvariella volvacea* con la formación de cuerpos fructíferos (de Vries y cols. 1986, Chen y cols. 2004), en *Botrytis cinerea* (microorganismo que afecta las uvas) las lacasas son utilizadas como los principales factores de virulencia (Viterbo y cols. 1994) de la misma manera que *Ophiostoma novoulmi* el cual parasita a los olmos (Binz y Canevascini 1997). Mención especial merecen *Fusarium proliferatum* (Regalado y cols. 1999) y *Cryptococcus neoformans* cuyo hospedero es el hombre y la función biológica de la lacasa está relacionada con la síntesis

de melanina, la cual se ha encontrado en la pared celular del hongo lo cual es conveniente para bloquear el sistema inmunitario, atacando principalmente pacientes con VIH (Williamson 1997, Liu y cols. 1999, Zhu y cols. 2001, Mayer y Staples 2002).

En los hongos de pudrición blanca como *Lentinula edodes*, se ha encontrado una alta actividad de la lacasa en el micelio vegetativo, cuerpo fructífero y durante la síntesis de melanina de lamelas y la polimerización oxidativa de los componentes de la pared celular (Bu'Lock 1967, Leathman y Stahmann 1981, Thurston 1994, Nagai y cols. 2003). Durante el crecimiento y formación de cuerpo fructífero, es importante analizar las principales enzimas y su participación en la ruta metabólica, en la figura 2 se muestra la ruta propuesta por Glazer y Nikaido (1998) donde participan diferentes enzimas, entre las que se encuentran la Lignina peroxidasa (LiP), Manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa.

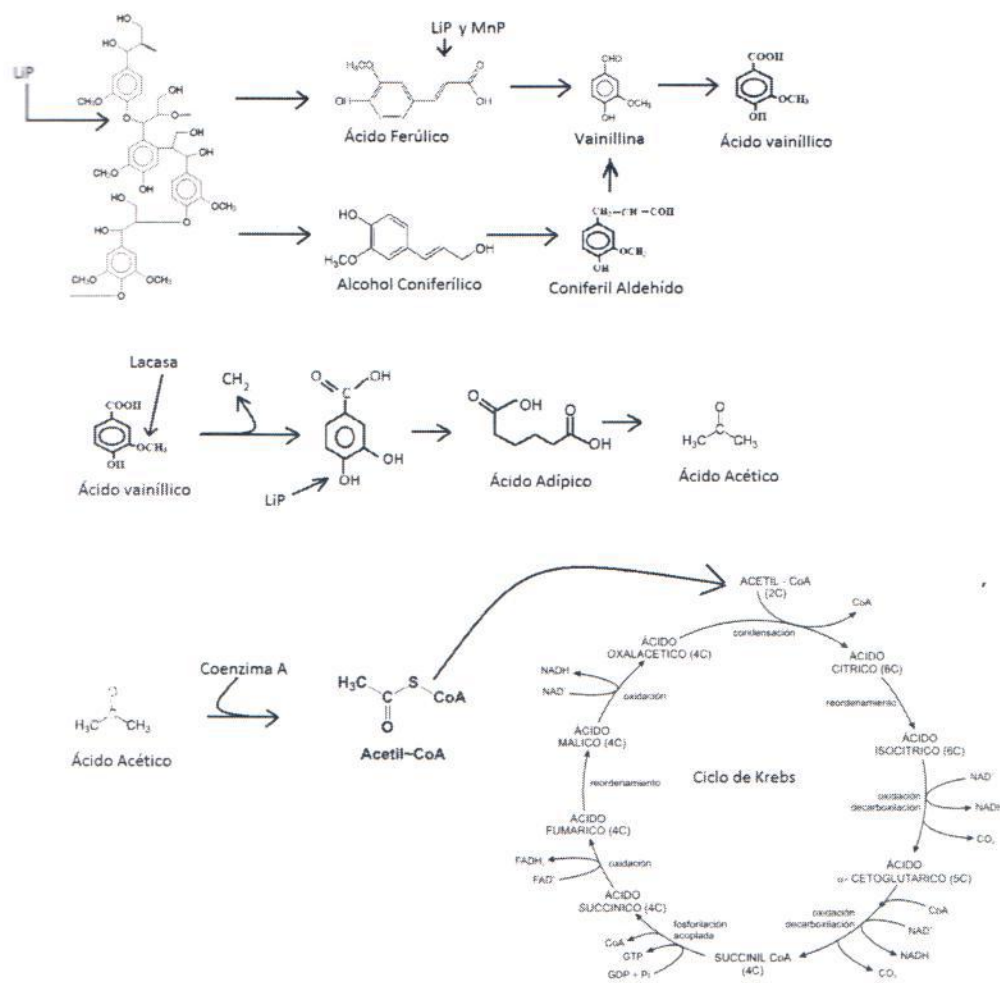


Figura 3. Mecanismo de degradación propuesto por Glazen y Nikaido en 1998 (Adaptado de Cabrera 2011). RCSB PDB número 5LDU.

1.1.5 Aplicaciones de la enzima lacasa

Las enzimas lacasas se han utilizado en procesos de biorremediación, ya sea para la decoloración de efluentes textiles, degradación de cloroligninas en las industrias del papel, remoción de compuestos fenólicos, derivados de insecticidas, entre otros. Además de esto, se ha reportado que las lacasas son eficientes en la oxidación de compuestos fenólicos, entre ellos colorantes

tipo azo, antraquinona y triarilmetano (Hublik y Schinner 2000, Máximo y cols. 2003, Jauregui y cols. 2003).

El uso de estas enzimas es muy amplio, destacando su uso en el bioblanqueo enzimático de pastas de papel, el cual consiste en la eliminación de la lignina residual presente, con la finalidad de mejorar su apariencia. En este sentido, el proceso de utilización de las lacasas se basa en la combinación de la enzima con un mediador redox que, una vez oxidado, es capaz de reaccionar inespecíficamente con compuestos que no son sustratos naturales de la enzima (Monteiro y de Carvalho 1998, García y cols. 2003, Arias y cols. 2003, Camarero y cols. 2004, Sigoillot y cols. 2005).

El uso de las lacasas se ha extendido a la degradación de colorantes, los cuales son muy estables y difícilmente degradables por los organismos dado su estructura química, ampliando con ello la rama de investigación y uso de estas enzimas (Wong y Yu 1999). Su uso se ha reportado en presencia o no de mediadores pudiendo lograr la degradación de diferentes tipos de colorantes (Rodríguez y cols. 1999, Almansa y cols. 2004, Camarero y cols. 2005).

Las enzimas ligninolíticas han sido de gran importancia en la industria, debido a que han revolucionado el mercado, desplazando compuestos químicos que pueden llegar a ser tóxicos, todo esto por la conciencia del cuidado del medio ambiente. Además, en determinadas industrias (como la alimentaria) los compuestos químicos presentan cierto rechazo por los consumidores, esto ha permitido que estas enzimas puedan ser aplicadas a diferentes industrias como la textil, alimenticia, médica, biorremediación de suelos o degradación de pesticidas, procesos de blanqueamiento en la industria papelera y formulación de cosméticos (Kunamneni y cols. 2008).

1.2 Los hongos y la expresión de lacasas

1.2.1 Hongos de pudrición blanca

El término “hongos de pudrición blanca” ha sido asignado a los hongos de apariencia blanquecina que generan en la madera al remover la lignina, celulosa y hemicelulosa (Schwarze y cols. 2000). Estos organismos son aerobios obligados, su nutrición es por medio de la combustión biológica de la madera y materiales asociados y tienen la capacidad de usar oxígeno molecular como aceptor final de electrones. La ruta metabólica para la producción de energía

interna es a partir de la glucólisis llevada a cabo en el citoplasma y el ciclo de Krebs el cual se realiza en la mitocondria, estos organismos siguen la misma ruta metabólica que la mayoría de los organismos aerobios (Kirk y Cullens 1998).

La pudrición blanca la realizan principalmente los hongos basidiomicetos y ascomicetos, comenzando por la rápida invasión de las hifas a la madera y secreción de enzimas y metabolitos que provocan la depolimerización de la hemicelulosa y la fragmentación de la lignina, estos hongos rompen la lignina por un proceso oxidativo con ayuda de fenoloxidasas que son formadas y liberadas por la hifa, tales como las lacasas, manganeso peroxidasas, lignina peroxidasas, tirosinasas y peroxidasas (Schwarze y cols. 2000).

Los basidiomicetos de pudrición blanca son considerados como los organismos más eficaces en la degradación de la lignina (Kirk y Farrell, 1987). Además de ser los únicos organismos capaces de mineralizar este polímero (Crawford 1981; Hammel 1997), estos organismos invaden los tejidos vegetales a través del lumen del sistema vascular, secretando una serie de enzimas capaces de degradar la lignina y otros componentes de la madera (Kirk y Farrell, 1987). Esta maquinaria enzimática versátil coopera con metabolitos secundarios secretados por los mismos hongos, permitiéndoles atacar eficientemente la barrera que constituye la lignina (Kirk y Farrell 1987).

Dentro de los denominados hongos de podredumbre blanca se encuentran una gran variedad de especies, entre ellos está *Phanerochaete chrysosporium*, el cual es considerado el organismo modelo en los estudios de biodegradación de la lignina (Schoemaker y cols. 1991). Entre otros hongos capaces de degradar la lignina eficientemente se encuentra *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Phlebia radiata* y hongos pertenecientes al género *Pleurotus*.

1.2.2 El género *Pleurotus*

De las 250,000 especies de hongos conocidas, 10,000 producen cuerpos fructíferos y solamente el 10 % son comestibles, dentro de los que se encuentra el género *Pleurotus*. Estos organismos presentan un gran potencial nutricional, en base seca, proporcionando proteínas, algunas vitaminas como: A, B1, B2, B6, C, D2, D3, niacina, algunos minerales como hierro, potasio,

fosforo, fosforo, cobre, selenio, calcio, magnesio, manganeso, zinc, además de fibra dietética (Martínez-Carrera y cols. 2010), aunado a esto se le atribuyen propiedades anticancerígenas, antivirales, antibacterianas y antiparasitarias. Este hongo es frecuentemente utilizado como auxiliar en el tratamiento de la reducción del colesterol e hipertensión (Chang y Miles 2004), presenta características probióticas (López 2002) y sus propiedades funcionales se han demostrado tanto en micelio como en cuerpo fructífero.

El género de *Pleurotus* se caracteriza porque algunas de sus especies son de color blanco, amarillento o rosado a veces grisáceo o de color oscuro. La forma de este hongo puede variar teniendo forma de embudo, pétalo de flor o concha de ostra. El estípite puede ser lateral o excéntrico y puede ser corto, mediano o largo, incluso puede llegar a carecer de éste. Con respecto a las laminillas, estas son longitudinalmente decurrentes sobre la base del estípite, con frecuencia anastomosadas transversalmente al nivel de la inserción del pie. Las esporas son de color blanco, crema o lila pálido, presentan una forma cilíndrica (raramente elipsoides) y son lisas (Rai, 2008).

El ciclo vital del hongo inicia con una espora conocida como basidiospora, éstas son originadas mediante la meiosis, por lo que contienen un solo núcleo haploide. Si las condiciones de pH, temperatura, humedad y sobre todo de nutrientes son adecuadas, esta basidiospora germina generando la hifa, la cual es una célula haploide monocariótica que va dividiéndose formando septos (células uninucleadas), invadiendo el sustrato en forma de micelio para la adquisición de nutrientes mediante la secreción de enzimas, además de invadir el sustrato para la adquisición de nutrientes, el micelio se expande para buscar la fusión con otro micelio, una vez que se fusionan los citoplasmas de ambos micelios en un proceso conocido como plasmogamia, el núcleo de cada hifa fluye a la otra logrando de esta manera un intercambio de núcleos, resultando una recombinación de núcleos formando células dicarióticas ($n+n$), esta condición es bastante estable, por lo que la célula comienza a generar cambios morfogénéticos, formando la basidioma (cuerpo fructífero), que posee los basidios. Los dos núcleos haploides llevan a cabo la cariogamia (fusión de los dos núcleos) produciendo un nuevo núcleo diploide ($2n$), que al entrar en meiosis, da lugar a cuatro células haploides (basidiosporas), que nuevamente comienzan el ciclo como se muestra en la figura 4.

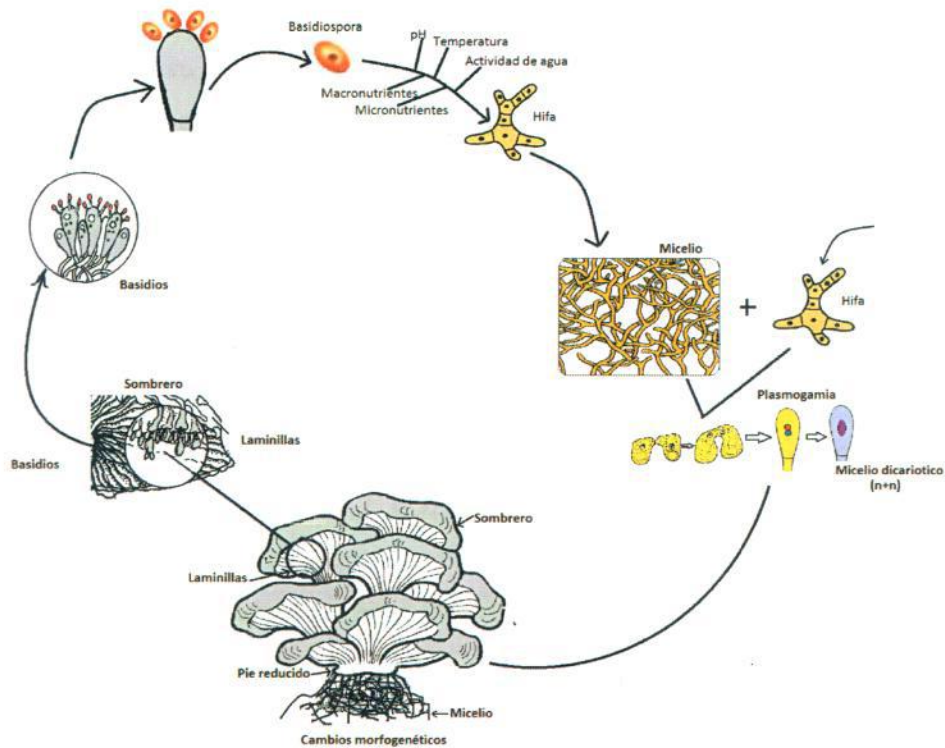


Figura 4. Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*. Adaptado de Sarasola (2014).

1.2.3 Isoformas y genes de lacasas

German y Lerch (1986) describieron por primera vez la secuencia de ADNc de un gen de lacasa en el hongo *Neurospora crassa* y a partir de este suceso se han descrito numerosas secuencias, tanto en procariontes como en eucariotes (en el Banco de Genes se tiene reportado más de 1200 entradas y alrededor de la mitad pertenecen a hongos). Todas estas secuencias muestran un patrón común, es decir, muestran una cadena peptídica aproximadamente de 520-550 aminoácidos (Thurston 1994). Al hacer el análisis de alineamiento de secuencias, se ha encontrado que los dominios de unión al cobre, están altamente conservados (Kumar y cols. 2002), dentro de estos dominios conservados se sitúan diez residuos de histidina y un residuo de cisteína implicados en la coordinación de los átomos de cobre (Rodríguez 2006). A pesar de su amplia variedad, las oxidasas multicobre presentan un plegamiento común constituido por tres bloques, que probablemente evolucionaron de un antecesor único (Murphy y cols. 2000).

Es importante mencionar que algunas secuencias de isoenzimas aún no han sido caracterizadas debido a su complejidad, sin embargo, en algunos estudios como los realizados por Pezella y cols. (2009) se logró su secuenciación, estos autores reportaron un fragmento genómico de 150 kpb con 7 genes de lacasa. Giardina y cols. (2010) reportaron en base a un análisis genómico, un tentativo de 12 genes de lacasa dentro de esa secuencia analizada, esto pudo deberse a las diferentes funciones biológicas que presentan las lacasas dentro de *P. ostreatus* a lo largo de su ciclo vital. Téllez-Téllez y cols. (2012) reportaron la secuencia de una isoforma de lacasa, la cual fue observada solamente en fermentación líquida en todas las etapas de crecimiento mostrando una gran actividad enzimática.

En el hongo *P. ostreatus* se han reportado varias isoenzimas de lacasa extracelulares la cuales incluye POXA1b, POXA1w, POXA2, POXB1, POXB2, POXA3a, POXA3b y POXC, siendo la más abundante POXC ó POX2, que se produce bajo diferentes condiciones. (Giardina y cols. 2006). La amplia diversidad de enzimas lacasa que se han reportado se debe a las diferentes propiedades físico-químicas que presentan (Gianfreda y cols. 1999; Mayer y Staples 2002).

Aunado a estos estudios, se han realizado varios trabajos con la finalidad de aislar y purificar las isoformas de lacasas. Palmieri y cols. (1997) describieron POXA2 como una lacasa de 67 kDa, un pI de 4; esta isoforma mostró baja estabilidad a la temperatura de 25-35 °C y presentó cuatro átomos de cobre por molécula. Giardina y cols. (1999) purificaron otra isoforma de lacasa en un cultivo suplementado con sulfato de cobre, denominada POXA1b, con una masa molecular de 62 kDa, un pI de 6.9 y cuatro átomos de cobre por molécula; además la enzima mostró una alta estabilidad al pH alcalino. Hublik y Schinner (2000) purificaron otra isoforma de *P. ostreatus* (cepa RK 36) en un cultivo en presencia de ácido ferúlico; esta isoforma presentó una masa molecular de 67 kDa, un pI de 3.6 y una temperatura óptima de 50 °C. Palmieri y cols. (2003), encontraron otras dos isoformas de lacasa en un cultivo suplementado con cobre, denominadas POXA3a y POXA3b. Ambas isoenzimas están constituidas por una subunidad grande de 67 kDa y una subunidad pequeña de 18 ó 16 kDa (esta heterogeneidad es debida la presencia o ausencia de una parte glucosídica), con un pI de 4.1 y 4.3, respectivamente. Tlecuitl-Beristain y cols. (2008) purificaron una isoforma de lacasa de la cepa ATCC-32783 con una masa molecular de aproximadamente 43.7 kDa y un pI de 2.27, con un rango amplio de actividad

a diferentes valores de pH (2 a 8) y temperatura (20-60 °C). Se ha reportado que este hongo carece de lignina peroxidasa, indicando que probablemente la presencia de varias isoformas de lacasas se debe a que son las involucradas en la biodegradación de la lignina y que cada una de esas lacasas tiene un papel importante (Gochev y Krastanov 2007).

Otro tipo de lacasas que han sido reportadas en *P. ostreatus* son las denominadas lacasas blancas (Palmieri y cols. 1997). La isoenzima POXA1w es una enzima neutra que muestra alta estabilidad a pH y temperatura. Esta lacasa contiene un átomo de cobre, dos de zinc y uno de hierro por molécula de proteína.

A pesar de que las lacasas de *P. ostreatus* han sido ampliamente estudiadas, solamente se ha reportado la caracterización (con la secuencia de proteína y/o la secuencia de los genes) de algunas isoenzimas como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 2. Lacasas de *P. ostreatus*.

Gen	Lacasa que codifica	No. De Accesoión en GenBank	Característica	Referencia
Lacc12			Solamente encontrada en el cuerpo fructífero.	Lettera y cols. 2010
Lacc 1	Pox4	B5MAF5	El promotor de Pox4 Presenta un sitio de regulación por metales.	Pezzella y cols. 2009
Lacc4	pox3	FM202672	Presenta cinco sitios de regulación por metales	Pezzella y cols. 2009
sspoxa3			Subunidad menor de Lacc2 involucrada en la estabilización del complejo	Faraco y cols. 2008
Lacc2	Poxa3	AJ344434	Lacasa Atípica Heterodimérica, constituida por una subunidad mayor similar a las otras	Palmieri y cols. 2003; Giardina y cols. 2007; Faraco y cols. 2008

			lacasas y una subunidad menor llamada sspxa3	
Lac1b	pox1b	AJ005017	Conocida como lacasa azul, es muy estable a pH alcalino. Además, presenta un alto potencial Redox	Giardina y cols. 1999 Garzillo y cols. 2001
Lac10	Pox 1	Z34847	Es una isoenzima relacionada secuencialmente con Lac10 mostrando hasta un 84 % de identidad	Giardina y cols. 1995
Lac20	Pox2	Z49075	Abundantemente producida bajo condiciones controladas de crecimiento (pH, Temperatura y sólidos solubles)	Palmieri y cols. 1993
LACP83	LacP83	JF719064	Enzima constitutiva, con alta actividad catalítica. Presenta factores de transcripción en respuesta a metales pesados y compuestos xenobióticos.	Téllez-Téllez y cols. 2012

La secuenciación de lacasas ha dado como resultado patrones en común, identificando cuatro regiones (L1-L4) que son útiles para su caracterización y las cuales permiten distinguir zonas muy conservadas de las multicobre azul oxidasas (Kumar y cols. 2003) En la tabla 3 se muestran las características en los sitios de cobre principales de lacasa.

1.2.4 Regulación de la expresión de lacasas

La producción de la enzima lacasa presentan una regulación diferencial, por lo que están influenciados por diversos factores ambientales, tales como el pH, temperatura, el tipo de medio de cultivo y la composición del mismo, por lo que estas isoenzimas pueden ser inducibles o constitutivas (Téllez-Téllez y cols. 2005). Entre los inductores que se han utilizado para el incremento de la actividad enzimática de la lacasa se encuentra el 2,6 dimetoxifenol, el cual ha sido agregado al medio de cultivo en fermentación sumergida (Grandes-Blanco y cols., 2013) y se han obtenido una buena expresión enzimática. Aunado a esto, se ha demostrado que el cobre causa un incremento en la actividad de lacasa de *P. ostreatus* y en particular en la producción de POXA1b y las dos isoenzimas estrechamente relacionadas POXA3a y POXA3b, las cuales son hetero-dímeros (Palmieri y cols. 2000, 2003). Por otra parte, se ha reportado que la variación del pH del medio de cultivo de *P. ostreatus* modifica la velocidad específica de crecimiento de producción de biomasa y promueve diferentes patrones de producción de lacasas, además se ha determinado que el pH óptimo para obtener una alta producción de biomasa es 6.5 (Díaz 2009). Se ha sugerido que la inducción de los genes de lacasas por iones metálicos y compuestos fenólicos es resultado de la presencia de sitios específicos de regulación en la región promotora de dichos genes. La región regulatoria rio arriba de varios de los genes de lacasas contiene elementos de respuesta a metales (MRE), que también se han encontrado en la región promotora de las metalotioneínas, proteínas involucradas en la homeostasis y detoxificación de Zn y Cu en ciertos mamíferos (Karahanian y cols. 1998, Mansur y cols. 1998, Giardina y cols. 1999, Galhaup y cols. 2002, Faraco y cols. 2003). Además, en las regiones promotoras de los genes de lacasas se han encontrado posibles elementos de choque térmico (HSE), elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) y elementos de respuesta a antioxidantes (ARE) (Saloheimo y cols. 1991, Fernández-Larrea y Stahl, 1996, Giardina y cols. 1999, Soden y Dobson 2001, Galhaup y cols. 2002). Una posible explicación de la presencia de diferentes isoformas en el genoma de un determinado organismo sería la existencia de diferentes funciones fisiológicas para cada una de ellas durante el ciclo de vida de los hongos.

La expresión de los genes de lacasa utilizando inductores un alto contenido de nitrógeno ha resultado efectivo para la actividad enzimática, tal y como lo reportaron Mansur y cols. (1998)

quienes indujeron la transcripción de los genes de lacasas en el basidiomiceto I-62 (CECT 20097) y Soden y Dobson (2001) en *P. sajor-caju*. Aunado a estos reportes, en *P. sajor-caju* se ha encontrado que, la producción de algunas de las lacasas son inducidas a nivel transcripcional por los niveles de la fuente de nitrógeno: las isoenzimas lac2 y lac4 son reguladas positivamente por el nitrógeno, mientras que la lac1 y lac3 no se vieron afectadas (Soden y Dobson 2001). Por otro lado, al agregar cobre u otro ion como Mg^{2+} , Cd^{2+} o Hg^{2+} también se puede estimular la expresión de genes de lacasa (Scheel y cols. 2000, Soden y Dobson 2001, Galhaup y cols. 2002). Ciertos compuestos aromáticos con estructuras relacionadas con los precursores de lignina (como 2,5-xilidina o ácido ferúlico), también incrementan la transcripción en *Trametes villosa*, *Trametes versicolor* y *P. sajor-caju* (Yaver y Golightly 1996, Collins y Dobson 1997, Soden y Dobson 2001). Aunado a esto, *Trametes villosa* y *P. sajor-caju* presentan genes de lacasa de expresión constitutiva, lo cual puede relacionarse con las diferentes funciones fisiológicas de cada lacasa en los diferentes hongos (Yaver y Golightly 1996, Soden y Dobson 2001). Se ha sugerido que la inducción de los genes de lacasas por iones metálicos y compuestos fenólicos es resultado de la presencia de sitios específicos de regulación en la región promotora de dichos genes.

1.2.5 Expresión heteróloga de Lacasas

Los hongos de pudrición blanca producen bajas concentraciones de lacasas cuando son cultivados en fermentación sumergida o sólida (Robene-Soustrade y Lung-Escarmant, 1997), sin embargo, para propósitos industriales, los niveles de producción son bajos. De esta forma, se ha buscado organismos capaces de expresar esta enzima heterológamente y por medio de la transformación genética se han encontrado hospederos capaces de producirla adecuadamente. Entre estos organismos destacan *Saccharomyces cerevisiae* (Kruus y cols. 2001 y 2007, Bulter y cols. 2003, Kojima y cols. 1990, Yasuchi y cols. 1990, kiiskinen y cols. 2004), *Trichoderma reesei* (Kruus y cols. 2001, Paloheimo y cols. 2006, Saloheimo y cols. 1991), *Aspergillus oryzae* (Yaver y cols. 1996, Yaver y cols. 1999, Wahleithner y cols. 1996, Berka y cols. 1998, Ishida y cols. 2002, Sigoillot y cols. 2004), *Pichia pastoris* (Jonsson y cols. 1997, Otterbein y cols. 2000, Brown y cols. 2002, Liu y cols. 2003) y *Escherichia coli* (Ravikumar y cols. 2013)

E. coli es una bacteria Gram-negativa, en forma de bacilo, aerobia facultativa y fue descrita por primera vez por Theodor Escherich en 1885. La mayoría de las cepas son inofensivas y colonizan el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales como parte de la flora normal, sin embargo, hay algunas cepas que se han convertido en patógenas por la adquisición de factores de virulencia a través de plásmidos, transposones, bacteriófagos, y/o islas de patogenicidad (Hayhursts 2004). *Escherichia coli* es la especie más empleada y estudiada tanto genética y fisiológicamente, por lo cual su uso como un sistema de expresión brinda ciertas ventajas entre las que destacan:

- i. Amplio conocimiento de la fisiología de la célula, que permite alcanzar densidades celulares elevadas con un medio de cultivo económico
- ii. La rápida generación de biomasa (elevada velocidad de crecimiento)
- iii. Fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento
- iv. Alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo,
- v. Gran variedad de vectores de expresión, variantes mutantes y vectores de expresión disponibles
- vi. El conocimiento del efecto de la sobreexpresión de proteínas sobre la bacteria.

Entre las desventajas que presenta expresar una enzima recombinante en *E. coli* destacan:

- i) No lleva a cabo procesamientos post-transduccionales propios de células eucariotas, como es el caso de la glicosilación o fosforilación, lo cual afecta a la estructura, estabilidad, solubilidad y actividad biológica de la proteína producida
- ii) Carece de chaperonas (proteínas de plegamiento) adecuadas para permitir un plegamiento correcto de las proteínas recombinantes
- iii) No forma puentes disulfuro en el citoplasma, salvo en ciertas cepas mutantes

La expresión de proteínas recombinantes no sólo se ha realizado en células procariotas como *E. coli*, sino también en células eucariotas, las cuales han sido utilizadas ampliamente en los procesos industriales. Destacando a las levaduras *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por expresar esta enzima heterológamente y homológamente, su producción no es suficiente para poderla aplicar a nivel industrial, obteniendo bajas concentraciones de enzima. En la tabla 2 se muestra la producción de esta enzima en sistemas heterólogos.

Tabla 3. Producción de lacasa heteróloga. (Adaptado de Kunamneni y cols. 1007)

Gen de Lacasa	Organismo hospedero	Producción de lacasa (mg/L)	Referencia
<i>Pycnoporus cinnabarinus lac1</i>	<i>Schizophyllum commune</i>	1200	Alves y cols. 2004 y 2005. Sigoillot y cols. 2004
	<i>Aspergillus oryzae</i>	80	
<i>Melanocarpus albomyces lac1</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	920	Kiiskinen y cols. 2004
<i>Ceriporiopsis subvermispora lcs-1</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	1.5	Larrondo y cols. 2003
	<i>Aspergillus niger</i>	1.5	
<i>P. sajor-caju lac4</i>	<i>Pichia pastoris</i>	4.9	Soden y cols. 2002
<i>Pycnoporus cinnabarinus lac1</i>	<i>Pichia pastoris</i>	8	Otterbein y cols. 2000
	<i>Aspergillus niger</i>	70	Record y cols. 2002
<i>Coprinus cinereus lcc1</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	135	Yavert y cols. 1999
<i>Myceliophthora thermophila lcc1</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	19	Berka y cols. 1998 Bulter y cols. 2003.
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18	
<i>Phlebia radiata lac1</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	20	Saloheimo y Niku-Paavola, 1991

Por lo cual, incrementar los rendimientos en la expresión de la lacasa en un sistema heterólogo es fundamental para la aplicación industrial de la enzima

2. ANTECEDENTES

2.1.1 Genes de Lacasas

El número de copias de los genes de lacasa es variable en los hongos y su cuantificación precisa es complicada, por la existencia de diferentes alelos de los genes en su genoma, y al ser diploides en su mayoría (Egger y cols. 1998). Muchos genomas de hongos contienen más de un gen de lacasas: *Trametes villosa*, por ejemplo, contiene de dos a cinco genes, localizados en el mismo cromosoma (Yaver y Golightly 1996). En el hongo patógeno *Rhizoctonia solani* hay tres genes de lacasas, que agrupan en un clúster de aproximadamente 11 kb (Wahleithner y cols. 1996). *Caprinus cinereus* posee ocho genes de lacasas (Yaver y cols. 1999). En *P. erygii* se han reportado dos genes y para *P. ostreatus* siete genes (Tabla 4) (Giardina y cols. 1995, 1996 y 1999, Palmieri y cols. 1993, 1997 y 2003).

Tabla 4. Proteínas y genes reportados para lacasas en diferentes organismos. (Téllez-Téllez, 2011)

Nombre	Gen		Proteína que codifica para el gen			
	Nombre	EMBL No. Acc.	Longitud (aa)	PM (KDa)	pI	Referencia
<i>P. ostreatus</i>	LACC12			55		Lettera y cols. 2010.
<i>P. ostreatus</i>	POXA3a	AJ344434	522	67+18	4.1	Palmieri y cols. 2003.
<i>P. ostreatus</i>	POXA3b	AJ344434	522	67+18	4.3	Palmieri y cols. 2003.
<i>Streptomyces lavendulae</i>		AB092576	631	73	n.d*	Suzuki y cols. 2003.
<i>Trametes pubescens</i>	lap2	AF414807	523	65	2.6	Galhaup y cols. 2002.

<i>Bacillus subtilis</i>	cotA	U51115	513	65	7.7	Martins y cols. 2002.
<i>Hirsutiaria parvophila</i> (Basidiomycete C30)	lac1	AF162785	517	63	3.6	Dedeyan y cols. 2000.
<i>Ganoderma graminis</i> var. <i>tritici</i>	LAC2	AJ417686	577	70	5.6	Edens y cols. 1999. Litvintseva y Henson 2002.
<i>Caprinus cinereus</i>	lcc1	AF118267	539	63	3.7-4.0	Yaver y cols. 1999. Schneider y cols. 1999.
<i>Trametes versicolor</i>	lcc2	U44430	520	64	3.1-3.3	Cassland y Jönsson 1999.
<i>P. ostreatus</i>	POXA1b	AJ005017	533	62	6.9	Giardina y cols. 1999.
<i>Populus euramericana</i>	lac90	Y13772	574	90	9.2	Ranocha y cols. 1999
<i>Trametes trogii</i>	lcc1	Y18012	496	70	3.3	Garzillo y cols. 1998.
<i>Trametes versicolor</i>	lcc1	L49376	519	67	n.d.*	Ong y cols. 1997. Bourbonnais y cols. 1995
<i>Myceliophthora thermophile</i>	lcc1	AR023901	619	80	4.2	Berka y cols. 1997.

<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	lcs-1	AY219235	519	79	3.6	Karahanian y cols. 1998. Salas y cols. 1995
<i>P. ostreatus</i>	POXA1			61	6.7	Palmieri y cols. 1997.
	POXA1w					
<i>P. ostreatus</i>	POXA2			67	4.0	Palmieri y cols. 1997.
<i>Podospora anserina</i>	lac2	Y08827	621	70	7-10	Fernández-Larrea y Stahl 1996.
<i>Trametes villosa</i>	lcc1	L49377	520	63	3.5	Yaver y cols. 1996.
	lcc2	AY249052	519	63	6.2-6.8	
<i>Rhizoctonia solani</i>	lcc4	Z54277	530	66	7.5	Wahleithner y cols. 1996
<i>P. ostreatus</i>	POXC POX 2	Z49075	533	59	3.3	Palmieri y cols. 1993. Giardina y cols. 1996.
<i>P. ostreatus</i>	POX1	Z34847.1	529	67	4.7	Giardina y cols. 1995.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CNLAC1	L22866	624	75	n.d. *	Williamson, 1994.
Basidiomycete PMI (CECT 2971)	lac1	Z12156	517	64	3.6	Coll y cols. 1993.

<i>Phlebia radiata</i> ,	lac1	X52134	548	64	3.5	Niku-Paavola y cols. 1990, Saloheimo y cols. 1991.
<i>Neurospora crassa</i>	2 alelos	M18333-4	619	64	6.8	Germann y cols. 1988.

n.d. *, No determinado.

+ Peso molecular determinado por SDS-PAGE

La caracterización de la familia de genes de lacasas se podría mejorar si se dispusiera de la secuencia de los genomas de los hongos, algo que aún no está disponible en muchos de los casos. Un análisis reciente del genoma de *P. ostreatus* ha mostrado que aún hay genes de lacasas sin caracterizar y se ha propuesto la existencia de aproximadamente 12 de estos genes (Giardina y cols. 2010). Por otra parte, Pezzella y cols. (2009), reportaron que en un fragmento genómico de 150 kpb encontraron siete genes de lacasas en *P. ostreatus*. Una posible explicación de la presencia de diferentes isoformas en el genoma de un determinado organismo sería la existencia de diferentes funciones fisiológicas para cada una de ellas durante el ciclo de vida de los hongos. Se sabe que *P. ostreatus* carece de lignina peroxidasa, indicando la presencia probable de varias isoformas de lacasas (Tabla 4). Además de que estas enzimas son las involucradas en la biodegradación de la lignina y cada una de estas tienen un papel importante (Gochev y Krastanov 2007). Se han realizado investigaciones para aislar y purificar isoformas de lacasa en *P. ostreatus*, reportando que un gen típico presenta aproximadamente 500-600 aminoácidos y su región codificante normalmente contiene 8-13 intrones, de aproximadamente 50-90 pb de extensión (Galhaup y cols. 2002). En el gen de la isoforma POX1 y POX2 de *P. ostreatus* se han encontrado aproximadamente 19 intrones (Giardina y cols. 1995, Giardina y cols. 1996), un número variable de intrones se ha considerado como un indicador de la distancia evolutiva entre hongos basidiomicetos y ascomicetos. Moussa (2009) reporta una similitud de un 93 - 97 % entre una lacasa de *P. ostreatus* con otras lacasas de las bases de datos (NCBI), lo cual indica

que el nivel de identidad de los aminoácidos entre las lacasas del mismo grupo generalmente varía poco.

Téllez-Téllez y cols. (2012) reportaron un gen de lacasa (LACP83) con 2887 pb, que codifica para una proteína de 509 aa, con enlaces de cobre conservados, el promotor de este gen contiene factores de transcripción de respuesta a metales, compuestos xenobióticos y elementos de respuesta a estrés, esta isoenzima presenta una alta actividad enzimática en fermentación sumergida y es característica de la cepa ATCC32783. Es importante mencionar que hasta la fecha no se ha realizado la expresión del gen LACP83 en un sistema homólogo o heterólogo, lo cual se abre una brecha para la investigación de la producción de esta enzima recombinante.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años el interés biotecnológico de los hongos de pudrición blanca se ha incrementado debido a las enzimas que producen y a su uso como degradadoras de lignina sumado a que son capaces de oxidar compuestos recalcitrantes y tóxicos. Entre los hongos de pudrición blanca, el hongo *P. ostreatus* constituye un grupo cosmopolita con numerosas aplicaciones, destacando por poseer la enzima lacasa, la cual tiene amplias aplicaciones industriales y biotecnológicas.

La enzima lacasa ha sido extensamente estudiada y caracterizada molecularmente, sin embargo, la existencia de diferentes isoenzimas y múltiples genes que las codifican hace que sea complicado comprender la forma en la que estos genes se activan o inactivan debido a las distintas condiciones o etapas de crecimiento. Por lo cual, la búsqueda de genes que codifican para enzimas con alta actividad ha llevado a diversas investigaciones, entre ellas la secuenciación del gen LACP83 en *P. ostreatus* que codifica para una isoenzima altamente activa a lo largo de toda la fermentación líquida (Téllez-Téllez y cols. 2012).

Por otro lado, se ha demostrado que *Escherichia coli* es un organismo con capacidad para expresar enzimas lacasas por lo que la expresión de este gen en esta bacteria reduciría los tiempos de producción de la enzima y permitirá una mayor producción. Todo esto para su posible aplicación en el ámbito biotecnológico.

4. HIPÓTESIS

El gen *lacP83* que codifica para una enzima lacasa en *P. ostreatus* podrá ser introducido a través de un vector recombinante en *Escherichia coli* y se expresará produciendo una enzima funcional.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Expresar el gen de la lacasa LACP83 de *Pleurotus ostreatus* en *Escherichia coli*.

5.2 Objetivos específicos

- Obtención de un vector para la expresión de la proteína LACP83 en *Escherichia coli*
- Expresión de la proteína LACP83 en el sistema *Escherichia coli*
- Caracterización de la actividad de la proteína LACP83 recombinante

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diagrama de trabajo

Para llevar a cabo los objetivos planteados en el presente trabajo, se planeó el diagrama de trabajo de la figura 5.

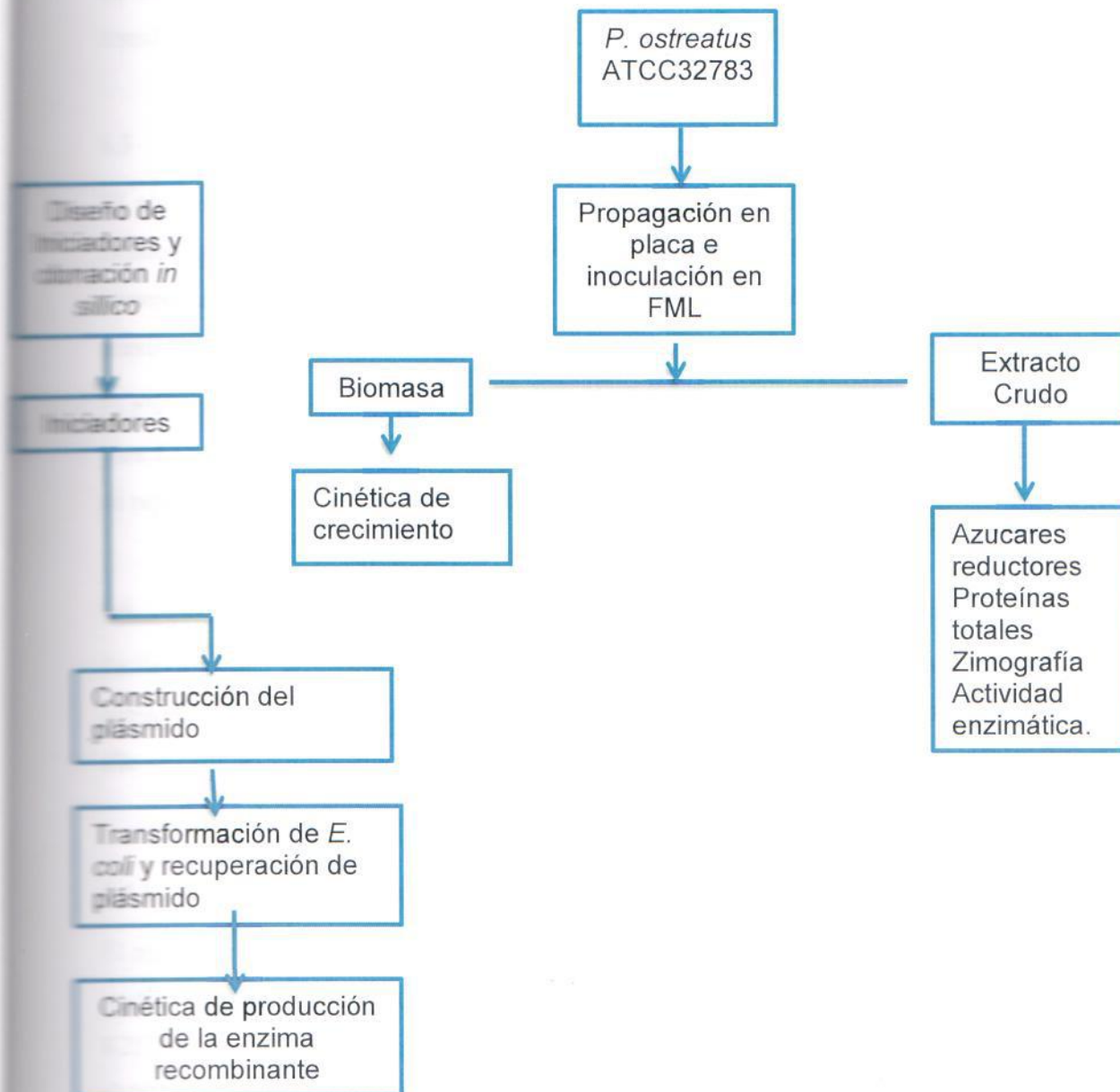


Figura 5. Diagrama general de trabajo

6.2 Material biológico

La cepa de *P. ostreatus* ATCC32783 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, U.S.A) fue utilizada para llevar a cabo caracterización de la fermentación en estado líquido del hongo

Se utilizaron cepas de *E. coli* TOP 10 y BL21 (Thermo Fisher Scientific) para llevar a cabo la transformación y expresión del gen.

6.3 Plásmidos

El plásmido de clonación utilizado fue el pJET2.0, que se caracteriza por ser un vector multicopia, con un tamaño de 2.3 Kpb, tiene un promotor de clonación para *E. coli*, es abierto, presenta un gen letal para que no crezcan las bacterias sin la inserción del gen de interés, además presenta un gen de resistencia a ampicilina.

El plásmido de expresión que se utilizó fue pQE30, el cual es un vector multicopia específico para *E. coli*, con un tamaño de 3.4 Kpb, el cual tiene un promotor de expresión lac, un origen de replicación ColE1 y un gen de resistencia a ampicilina.

6.4 Caracterización de la Fermentación en medio líquido.

Se llevó a cabo una caracterización del crecimiento y producción de lacasas por el hongo *P. ostreatus* a fin de comparar la producción de lacasa en el sistema heterólogo y el silvestre. Para ello se realizaron los siguientes puntos:

6.4.1 Condiciones de cultivo de *P. ostreatus*

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *P. ostreatus* fue un medio optimizado que contiene (en g/L): glucosa (10), extracto de levadura (5), KH₂PO₄ (0.6), MgSO₄-7H₂O (0.5), K₂HPO₄ (0.4), CuSO₄-5H₂O (0.25), FeSO₄-H₂O (0.05), MnSO₄ (0.05) y ZnSO₄-7H₂O (0.001), preparado de acuerdo con lo publicado por Téllez-Téllez y cols. (2008), el pH se ajustó a 6.5 con NaOH (0.1M), cada matraz fue inoculado con 3 pellets (4 mm de diámetro) de la

periferia de la colonia de *P. ostreatus* crecido en cajas Petri con agar PDA por 7 días a 25°C posterior a esto se incubaron los matraces a 23 – 25 °C en agitación (120 rpm) durante 22 días. Durante la fermentación se tomaron muestras cada 24 h, después del tercer día de inoculación y éstas fueron almacenadas en congelación hasta su uso.

6.4.2 Obtención del extracto enzimático y evaluación de la biomasa

El extracto crudo enzimático (ECE) fue obtenido por filtración y retención de la biomasa a través de papel de filtro Whatman No. 4. La biomasa retenida sobre el papel Whatman se secó hasta peso constante para su cuantificación. Esto se realizó posterior a las 48 h de sembrado, seguido cada 24 h. La curva de crecimiento se estableció por la ecuación logística:

$$dX/dt = \mu(1-X/X_{max})X \quad (1)$$

donde, μ es la máxima velocidad específica de crecimiento y X_{max} es la biomasa máxima (o equilibrio) producida cuando $dX/dt = 0$ para $X > 0$. La solución de la ecuación (1) es la siguiente

$$X = X_{max}/(1 + C e^{-\mu t}) \quad (2)$$

donde, $C = (X_{max} - X_0)/X_0$; cuando $X = X_0$ es el valor inicial de la biomasa. La estimación de los parámetros cinéticos de las ecuaciones previas se hizo mediante un procedimiento de minimización de las sumas de los errores usando el programa “Solver”, presente en la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Díaz-Godínez y cols. 2001; Viniestra-González y cols. 2003).

6.5 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de lacasas se determinó en cada ECE, utilizando como sustrato 2,6- dimetoxifenol (DMP). La mezcla de reacción se realizó con 950 μ l de DMP 2 mM, en amortiguador de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5, y 50 μ l de ECE. La actividad se determinó por incremento en la absorbancia a 468 nm de la mezcla de reacción, en una celda Peltier a 40 °C durante un minuto. Una unidad de actividad (U) de lacasa se consideró como la cantidad de enzima que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en la mezcla de reacción.

6.6 Zimografía y geles de electroforesis

Se realizaron zimogramas para determinar el peso molecular de la enzima extraída mediante geles de electroforesis en presencia de SDS (SDS-PAGE, Laemmli 1970); el gel de separación se preparó con 100 g/L de acrilamida y 27 g bis-acrilamida/L. El gel concentrador se preparó con 40 g/L de acrilamida y 27 g bis-acrilamida/L. Se mezclaron 30 µl de extracto con amortiguador de muestra sin agente reductor y sin tratamiento con calor; las muestras se corrieron en geles (de 1,5 mm de espesor) en el sistema de electroforesis de Mini-Protean III (BioRad) y con una carga de 150 V por 1-1.25 h. Después de la electroforesis, los geles se lavaron con agua desionizada en un agitador orbital (20-30 rpm) durante 5-6 horas, el agua se cambió cada hora para eliminar el SDS. Por último, los geles se incubaron a temperatura ambiente en una solución de 2mM de DMP. La actividad oxidativa de lacasas se observó como zonas oscuras en los geles (Téllez-Téllez y cols. 2005). Se utilizó marcador de peso molecular como referencia.

6.7 Determinación de la concentración de proteína soluble

La concentración de proteína soluble se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976). En donde a 50 µl de ECE se le adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford (SIGMA), el volumen se ajustó a 1 ml con agua destilada y se determinó su absorbancia a 595 nm. Se utilizó albúmina sérica bovina (SIGMA) como proteína estándar.

6.8 Determinación del contenido de azúcares

Se cuantificó la concentración de azúcares reductores por medio del reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico). Para esto, a 50 ml de ECE y 950 ml de agua destilada se le agregaron 2 ml del reactivo DNS (hidróxido de sodio 1%, Sulfito de sodio 0.05%, Fenol 0.2% y DNS 1%). Posteriormente se llevó a temperatura de ebullición por 5 min y después de enfriarse se leyó la absorbancia a 575 nm (Miller 1959). Se preparó una curva de calibración con glucosa.

6.9 Expresión del gen de la lacasa en un sistema heterólogo

Una vez caracterizada la producción de lacasas en medio líquido por el hongo *P. ostreatus*, se procedió a llevar a cabo la transformación, clonación y expresión del gen en *E. coli*. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

6.9.1 Condiciones de cultivo de *E. coli*

Para el crecimiento celular de las bacterias se utilizó el medio Luria-Bertani (LB), las células fueron incubadas a 37 °C por 18 h a 250 rpm. El medio de cultivo utilizado para la selección de células transformadas fue LB con 2 mg/ml de ampicilina (LB/Amp), con las mismas condiciones de incubación. El medio de cultivo utilizado para la inducción del gen recombinante fue el LB/Amp con 0.1 mM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y 0.25 mM de CuSO₄ (LB/Amp/IPTG), según lo reportado por Guan y cols. (2014).

6.9.2 Obtención y amplificación del gen LACP83

La secuencia del gen LACP83 se obtuvo de la base de datos GenBank con número de acceso JF719064 y se sintetizó químicamente (Integrated DNA Technologies). Para su expresión, el marco de lectura se amplificó con los iniciadores sentido (5'-CACGGATCCTCCAGGCGCACGGATCTCGCTACGCTTACA-3') y anti sentido (5'-TAATTAAGCTTTCAAGCTATGCCACCTTTGTCGGAATCGCTC-3'), los cuales presentan sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción BamHI y HindIII (subrayados en la secuencia). El PCR se llevó a cabo con el sistema comercial SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen) usando el protocolo propuesto por el proveedor. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 95 °C por 2 min, 95 °C por 30 s, 56 °C por 50 s, 72 °C por 2 min, repitiendo este proceso por 30 ciclos y 72 °C por 5 min. En todos los casos se corroboró la obtención de material genético con electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Sambrook y cols. 1989) teñido con RedGel (BIOTIUM), se utilizó un marcador molecular de 1 Kb (Thermo scientific). El producto esperado fue de 1,6 kpb, el DNA amplificado se purificó con el sistema comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Prómega).

6.3.3 Construcción del vector de clonación

El ADN amplificado se insertó en el vector de clonación pJET 1.2 Blunt (Fermentas Thermo científico) siguiendo las instrucciones del proveedor y fue clonado en *E. coli* TOP 10. La purificación del plásmido se llevó a cabo mediante lisis alcalina (Sambrook y cols. 1989) y se confirmó el inserto deseado con enzimas de restricción.

6.3.4 Construcción del vector de expresión

El ADN obtenido del perfil de restricción se subclonó en el vector de expresión pQE30 (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido resultante se introdujo en la cepa *E. coli* BL21 usando un electroporador Eppendorf Mod 2510. Las células transformadas fueron seleccionadas y el plásmido se purificó por lisis alcalina (Sambrook y cols. 1989) verificando la presencia del gen mediante PCR bajo las condiciones descritas anteriormente. Una vez que se confirmó la presencia del marco de lectura de LACP83 mediante PCR en el plásmido recombinante pQE30P83, se llevó a cabo la cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 recombinante.

6.3.5 Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 recombinante

A fin de evaluar el crecimiento de la cepa de *E. coli* BL21 recombinante, se realizaron dos cinéticas de crecimiento, una de ellas en medio LB/Amp (cinética sin inducción) y otra en medio LB/Amp/IPTG (cinética con inducción). La inducción de la expresión del gen LACP83 se realizó cuando se alcanzó una densidad óptica de 0.5 a 600 nm (DO_{600}), de acuerdo a lo sugerido por Sugantha y cols. (2010). Una muestra del cultivo fue tomada cada h hasta las 35 h y se determinó la concentración de biomasa por (DO_{600}) utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Cary 300 Bio. Los parámetros de crecimiento se modelaron con la ecuación logística por la minimización del error cuadrático con la herramienta Solver en hoja electrónica de Microsoft Excel (Tlecuitl-Beristain y cols. 2008).

3.3.6 Determinación de la actividad enzimática de *E. coli* BL21 recombinante

La actividad enzimática fue determinada en el medio de cultivo usado en la cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 recombinante, tomando una muestra del medio cada hora hasta las 35 h, siguiendo la metodología descrita por Téllez-Téllez y cols. (2012), donde una unidad de actividad de lacasa (U) se tomó como la cantidad de enzima necesaria para provocar un incremento de unidad de absorbancia por minuto. Las muestras analizadas, fueron almacenadas a 4 °C para la posterior determinación de la actividad enzimática a los 15 y 30 días. El perfil proteico se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) (Laemmli 1970), las bandas se tiñeron con azul de Coomassie

La actividad catalítica de la enzima se identificó mediante espectrofotometría. El peso molecular se determinó en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con el método de Laemmli (1970). Las muestras se analizaron en un sistema de electroforesis Mini Protean III (Bio-Rad) a 120 voltios durante un tiempo de 1 a 1.25 h. Después de la corrida, los geles se revelaron con 2 mM DMP (Téllez-Téllez y cols. 2005).

7. Resultados

7.1 Caracterización de la fermentación en medio líquido.

El crecimiento de la cepa *P. ostreatus* en medio líquido se muestra en la figura 6. La mayor producción de biomasa se observó a las 360 h (5.67 g/L), lo cual es comparable con lo obtenido por Téllez-Téllez (2011) misma que reportó una X_{max} de 5.5 g/L y Tlecuitl-Beristain y cols. (2008) obtuvieron una X_{max} de 5.71 g/L, sin embargo, se encontró una diferencia en la velocidad específica de crecimiento. En este estudio se obtuvo una $\mu=0.032 \text{ h}^{-1}$, lo cual es comparable con lo obtenido por Tlecuitl-Beristain y cols. (2008) y se encontró que es 45% más alta que lo reportado por Téllez-Téllez (2011), quienes obtienen una $\mu=0.022 \text{ h}^{-1}$ y 77% más que Díaz (2013), que reporta una $\mu=0.018 \text{ h}^{-1}$. Las diferencias que se presentaron pueden deberse a las condiciones de cultivo de la cepa, es decir, las condiciones de inoculación del medio sólido al medio líquido.

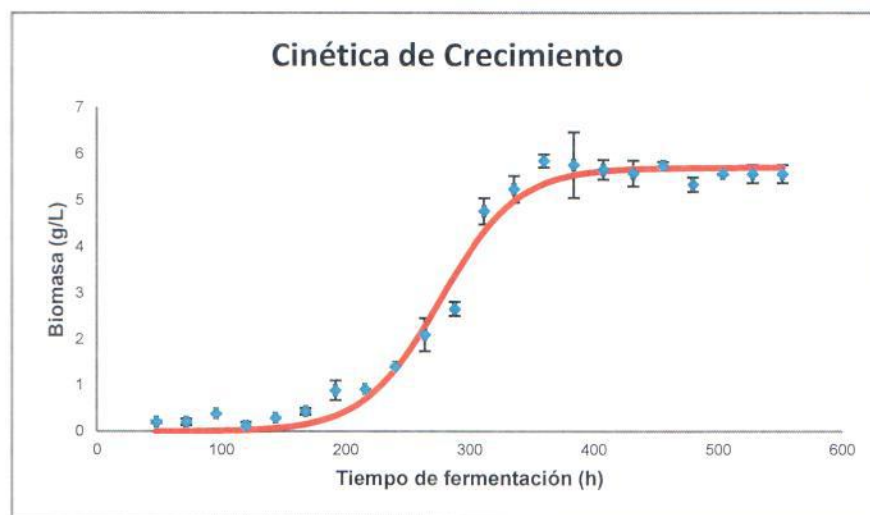


Figura 6. Cinética de crecimiento de *P. ostreatus* en medio líquido.

El consumo de la fuente de carbono (glucosa) durante la fermentación se presenta en la figura 7, encontrando el agotamiento de la misma a las 288 h, tiempo en el que el hongo se encuentra en la fase exponencial y su crecimiento continúa posiblemente por otros elementos presentes en el medio de cultivo, tales como el extracto de levadura.

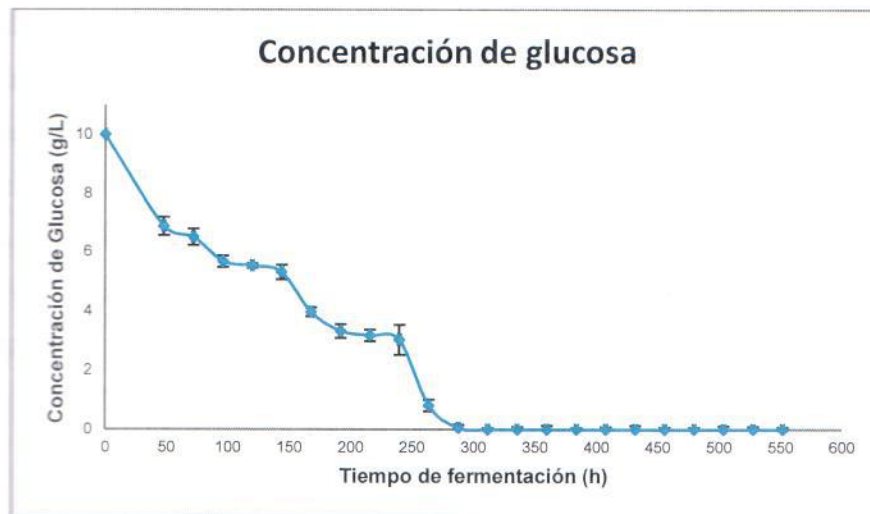


Figura 7. Concentración de glucosa de la fermentación de *P. ostreatus* en medio líquido.

La concentración de proteínas se muestra en la figura 8, donde se observó que durante las primeras horas de fermentación y hasta las 144 h no hay variación significativa en su concentración, sin embargo, a partir de las 168 h la concentración se incrementa aproximadamente 1.8 veces. Cabe mencionar que en este tiempo termina la fase de adaptación y se alcanza la máxima concentración de proteína soluble total a las 552 h (0,068 g/L). Un comportamiento similar es reportado por Mansur y cols. (2003) donde la mayor concentración de proteínas se encuentra en la fase estacionaria.

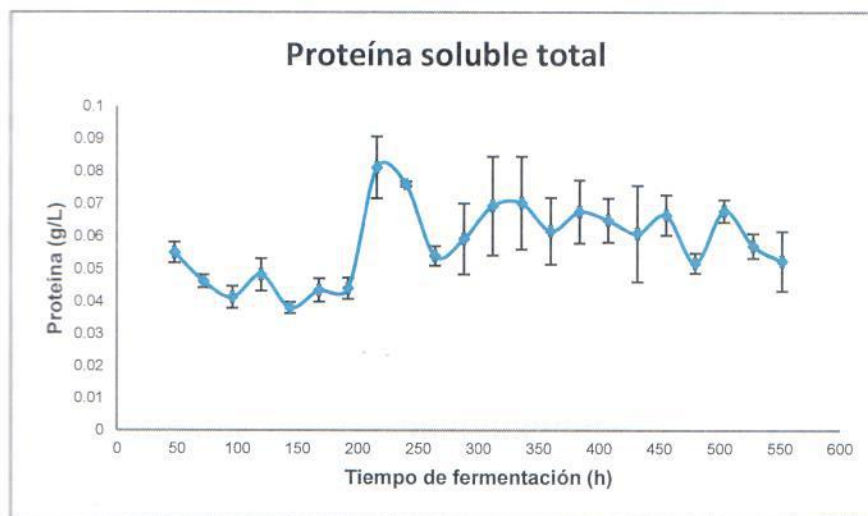


Figura 8. Concentración de proteínas solubles durante la fermentación de *P. ostreatus*.

La actividad de lacasa se muestra en la figura 9, donde se puede observar una baja actividad durante la fase de adaptación y parte de la fase exponencial. El valor máximo de actividad de lacasa fue de 36490 U/L a las 432 h de fermentación, lo cual es 3 veces más a lo reportado por Tlecuitl-Beristain y cols. (2008) quienes reportan una actividad de 12200 U/L durante la fase estacionaria. Cabe destacar que la actividad máxima presentada durante la fase estacionaria también ha sido reportada por Ramírez y cols. (2003), Mansur y cols. (2003), Hublink y cols. (2000) y Saparrat y cols. (2002).

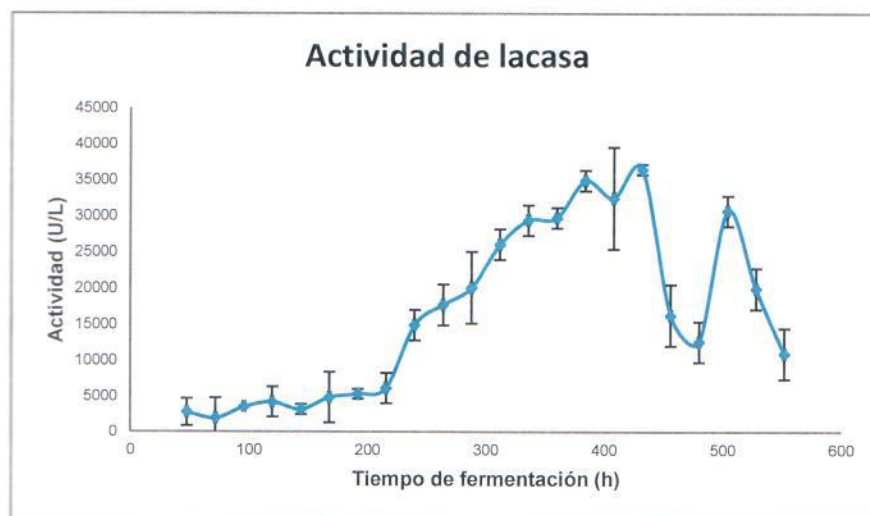


Figura 9. Actividad de lacasa durante la fermentación de *P. ostreatus*.

La identificación de las isoformas de lacasa mediante SDS-PAGE se muestra en la figura 10, donde se puede observar una isoforma de aproximadamente 50 kDa a través de toda la fermentación, lo que hace suponer que es la isoforma reportada por Téllez-Téllez (2008), en la cual la isoforma de interés presenta un peso molecular de 54.1 kDa, además, se puede apreciar que durante la fase exponencial y estacionaria se observan otras bandas de mayor peso molecular.

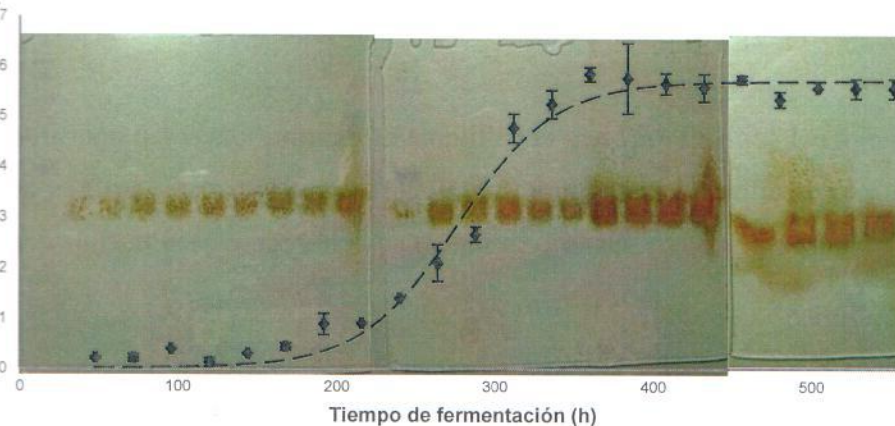


Figura 10. Isoformas de lacasas de la fermentación de *P. ostreatus*.

7.2 Expresión del gen de lacasa en un sistema heterólogo

7.2.1 Construcción del vector de clonación

La construcción del vector de expresión para *E. coli* (pQEP83) *in silico* se muestra en la Figura 11, donde se detalla cómo es que el ADN amplificado se insertó en el vector pJET 1.2 para obtener el vector de clonación pJETP83-pQ (Figura 11-A), posteriormente se introdujo en *E. coli* TOP 10 y se purificó el plásmido para hacer los cortes con enzimas de restricción (BamHI y HindIII) mismos que se realizaron con el vector pQE30 (Figura 11- B y C) para hacer una ligación dirigida mediante el uso de la ligasa T4 para construir el vector de expresión pQEP83 (Figura 11-D).

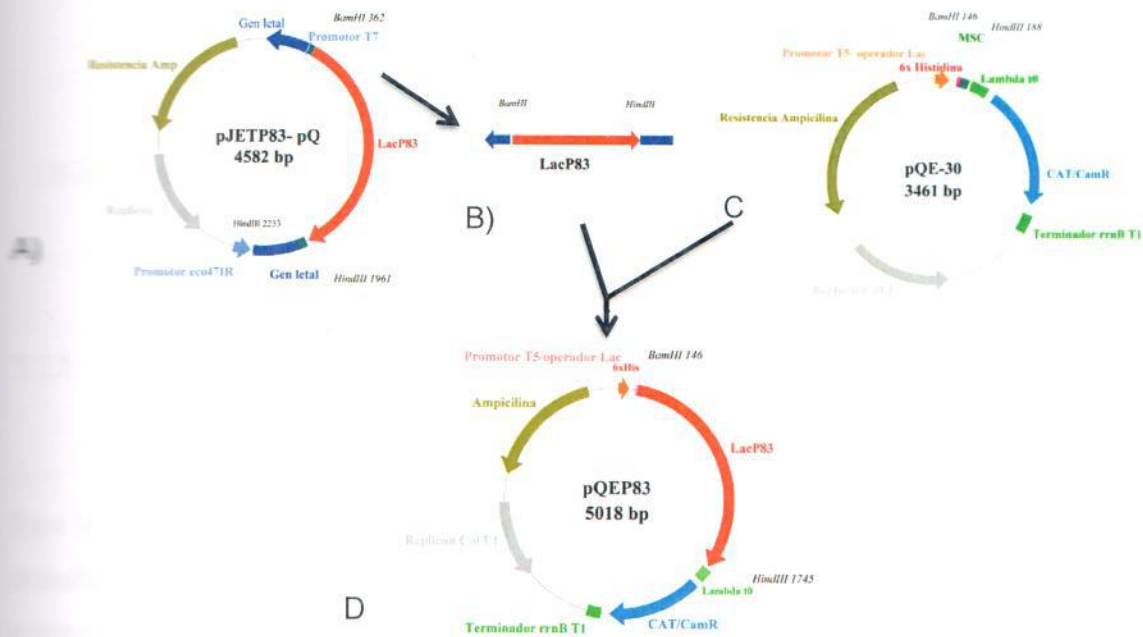


Figura 11. Construcción del vector de expresión.

Para la construcción del vector primero se amplificó el gen LACP83 con los iniciadores antes mencionados y se transformaron cepas TOP10, posteriormente se purificaron los plásmidos y se llevó a cabo un PCR para comprobar que se conservó el gen como se muestra en la figura 12.

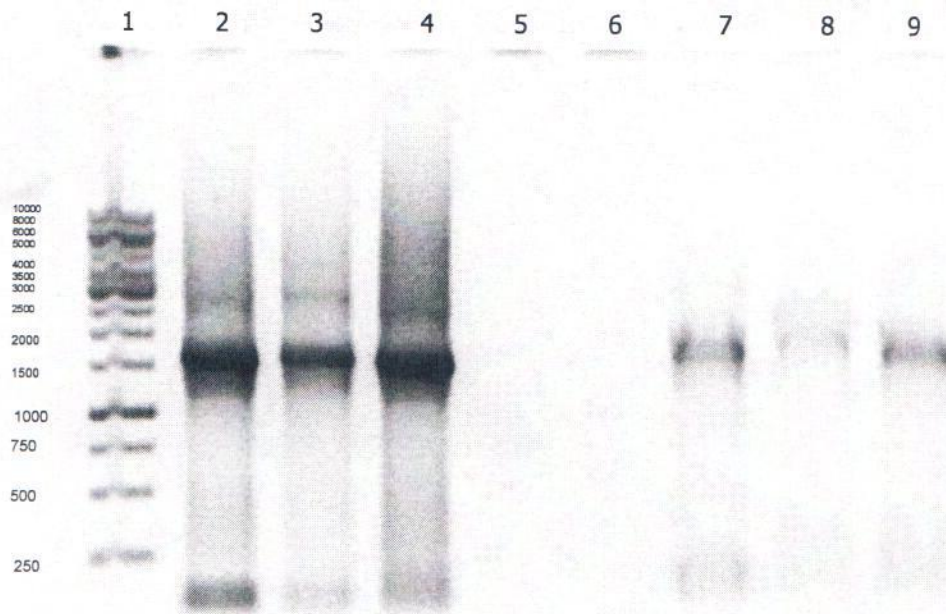


Figura 12. Gel de agarosa de los productos de PCR; Carril 1: Marcador molecular (1Kb), Carril 2-4: Producto de PCR de gen LACP83 con los sitios de restricción, Carril 7-9: Producto de PCR de cepas TOP10 transformadas con gen LACP83.

7.2.2 Construcción del vector de expresión

Para la construcción del vector de clonación pJETP83-PQ se utilizó el producto de PCR para introducirlo en el vector pJET 2.0, insertándolo dentro del gen letal (*eco47IR*) y con esto comprobar que las cepas que crecieron en placa realmente cuentan con el gen LACP83, posteriormente se purificó el plásmido y se realizó PCR como se muestra en la figura 13, para verificar la existencia del gen LACP83, dentro del vector pJETP83-pQ.

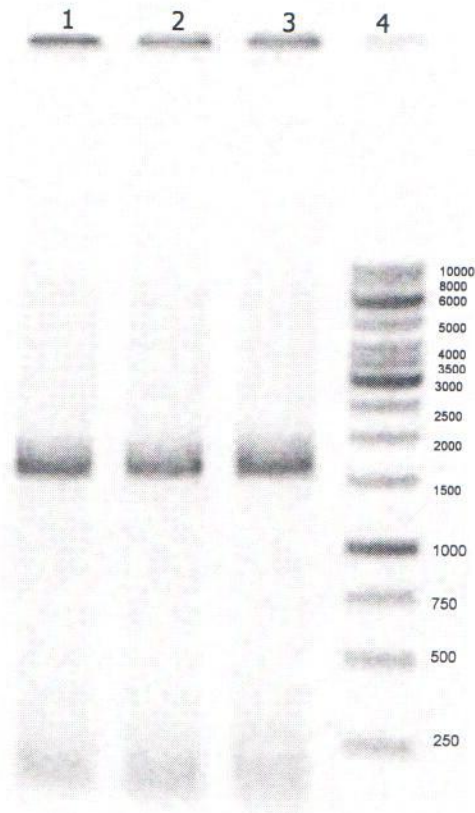


Figura 13. PCR de las clonas de TOP10 transformadas con pJETP83-pQ; Carril 1-3: Producto de PCR de clonas, Carril 4: marcador molecular (1 Kb).

El perfil de restricción del plásmido pJETP83-pQ con las enzimas de restricción BamHI y HindIII se muestra en la figura 14, donde se observan en el carril 2 las bandas características del plásmido pJETP83-pQ, en el carril 3 se observa una banda muy marcada de aproximadamente 4500 pb, lo que concuerda con lo esperado con la linealización del plásmido con la enzima de restricción BamHI, de igual manera al linealizarlo con la enzima HindIII se observa una banda de aproximadamente 1500 pb.

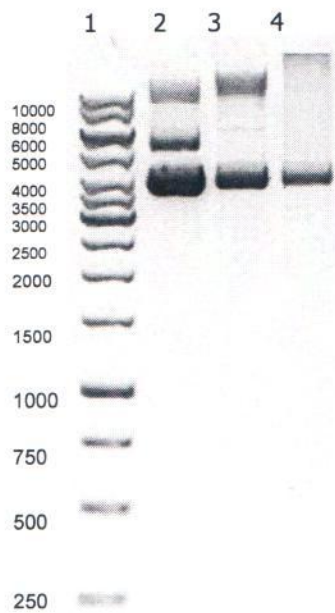


Figura 14. Perfil de restricción del plásmido pJETP83-pQ, Carril 1: Marcador molecular (1 Kb); Carril 2: Plásmido pJETP83-pQ; Carril 3: Linealización del plásmido pJETP83-pQ/BamHI; Carril 4: Linealización del plásmido pJETP83-pQ/HindIII.

El plásmido como la inserción del gen LACP83 en el vector pJETP83 y el corte con enzimas se puede observar en la figura 15 donde se muestra el perfil de restricción, con las enzimas BamHI y HindIII obteniendo fragmentos de aproximadamente 1600 y 2700 pb.

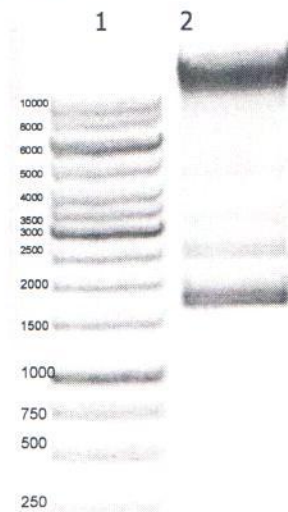


Figura 15. Perfil de restricción con las dos enzimas BamHI y HindII. Carril 1: Marcado molecular (1 Kb); Carril 2: Plásmido pJETP83-pQ con enzimas BamHI y HindIII.

Una vez realizado el perfil de restricción en el plásmido pJETP83-pQ, para corroborar la presencia del gen LACP83 se realizó la PCR, como se muestra en la figura 16, donde se observa la banda amplificada de alrededor de 1600 pb.

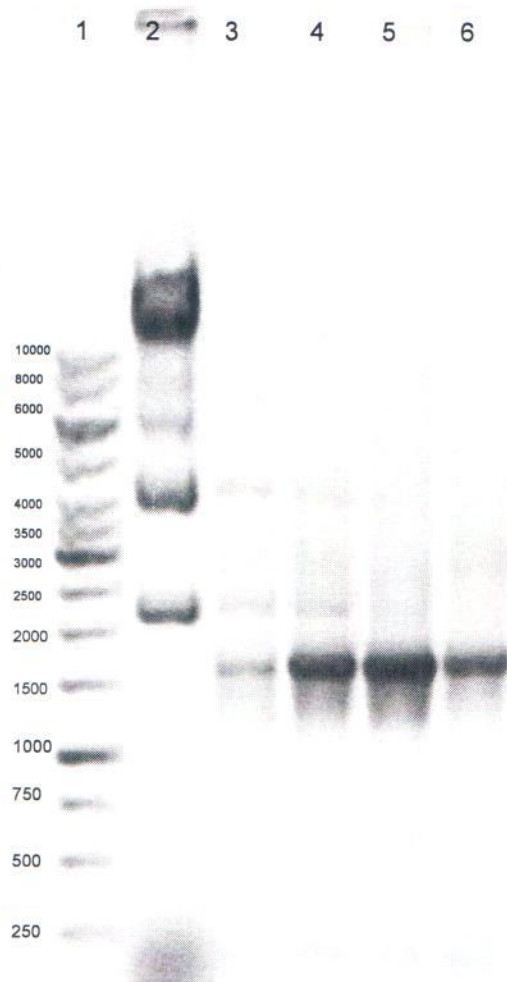


Figura 16. Producto de PCR del plásmido pJETP83-pQ. Carril 1: Marcador molecular (1Kb); Carril 2: Plásmido pJETP83-pQ; Carriles 3-6: Producto de PCR del plásmido pJETP83-pQ.

Una vez que se ha comprobado que el gen LACP83 estuvo presente en el plásmido pJETP83-pQ, se procedió a purificar el fragmento del gen de los geles para posteriormente ser insertado en el plásmido pQE30 y construir el vector de expresión pQEP83 y posteriormente introducirlo en la cepa de *E. coli* BL21.

El ADN obtenido del perfil de restricción del plásmido pJETP83-pQ se subclonó en el vector de expresión pQE30. El plásmido resultante se introdujo en la cepa *E. coli* BL21 mediante electroporación. Las células transformadas fueron seleccionadas y los plásmidos purificados se muestran en la figura 17.

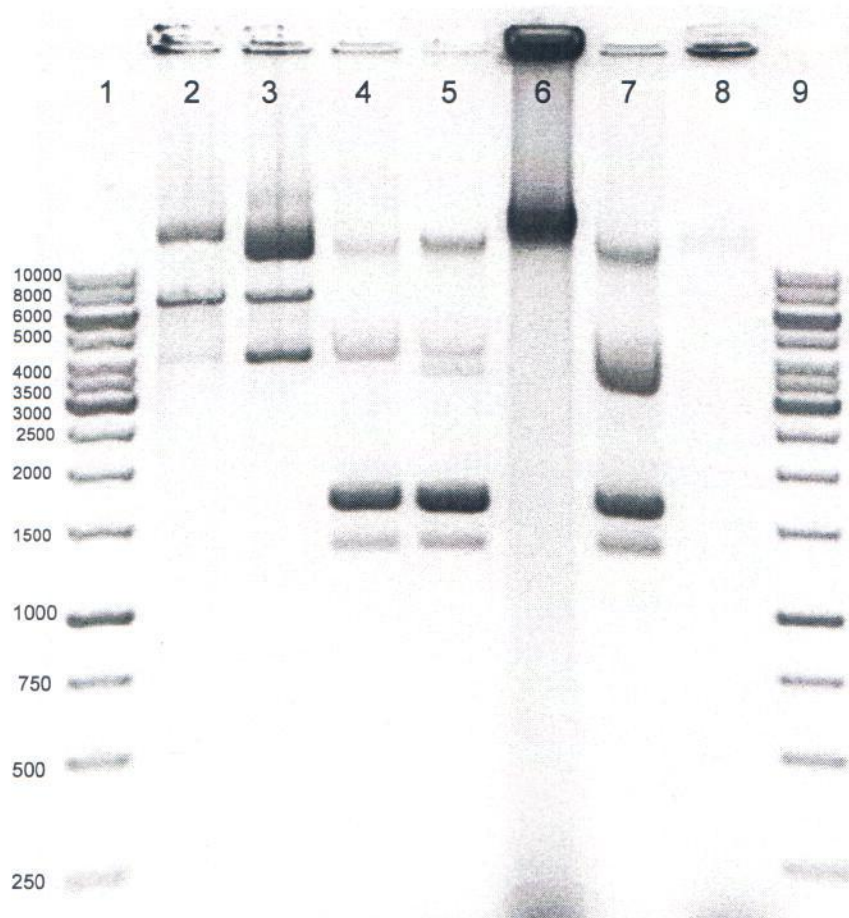


Figura 17. Gel de agarosa con purificación del plásmido de expresión pQEP83. Carril 1 y 9: Marcador molecular (1Kb); Carriles 2-8: plásmidos purificados de clonas en *E. coli* BL21.

En la figura 18 se muestra un gel de agarosa donde se destaca la presencia del gen mediante PCR bajo las condiciones descritas anteriormente, además de observar las bandas características de la extracción del ADN plasmídico del vector de expresión pQEP83 en *E. coli* BL21, así como el producto de PCR de aproximadamente 1600 pb, según lo esperado. Corroborando que el plásmido purificado contiene el gen LACP83.

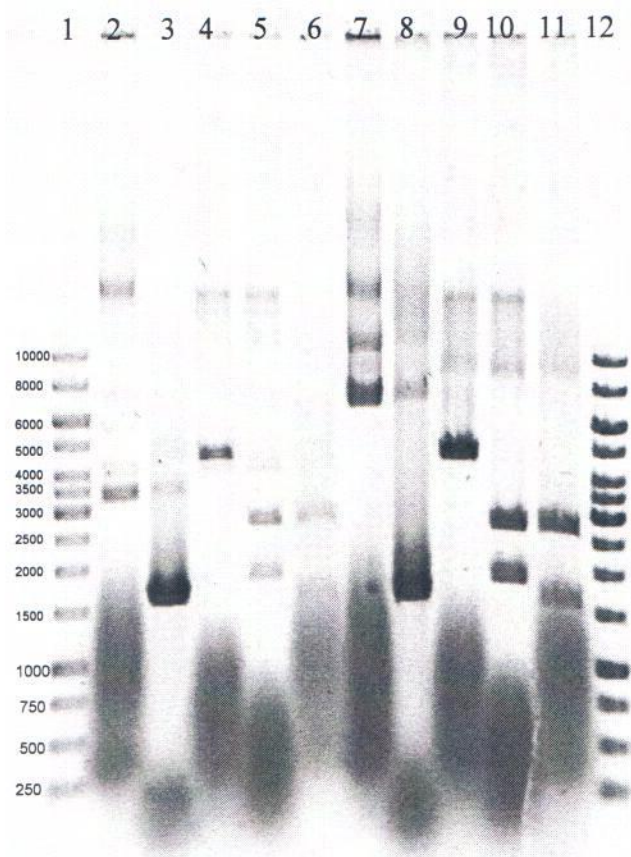


Figura 18. Gel de agarosa con plásmido pQEP83 purificado y producto de PCR; Carril 1 y 12: Marcador molecular (1Kb); Carriles 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 11: PQEP83 purificado de clonas de BL21; Carriles 3 y 8: Producto de PCR de plásmidos de expresión purificados.

Una vez que se confirmó la presencia del marco de lectura de LACP83 mediante PCR en el plásmido de expresión pQEP83, se llevó a cabo la cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 recombinante.

7.2.3 Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 recombinante

En la figura 19 se muestran las cinéticas de crecimiento de *E. coli* BL21 recombinante sin inducción y con inducción, dónde se puede apreciar el inicio de la fase exponencial a las 7 h y de la fase estacionaria a las 15 h, para ambas cinéticas. Según los parámetros cinéticos calculados, la velocidad específica de crecimiento (μ) para la cinética sin inducción fue de 0.536

h^{-1} , sin embargo, cuando se llevó a cabo la inducción, se presentó una disminución de la μ de aproximadamente el 50 %, con un valor de 0.244 g/L. Esta disminución coincide con lo reportado por Wagner y cols. (2008), quienes encontraron una disminución en el crecimiento de la cepa de *E. coli* BL21 después de la inducción de una proteína recombinante. Aunado a esto, Vilar y cols. (2003) argumentaron que la disminución del crecimiento de las cepas recombinantes se puede deber a los cambios de la inducción del promotor lac que afectan el crecimiento celular, este efecto puede ser inhibido según Gálvez y cols. (2014) adicionando con xilosa en el medio de cultivo, además de la glucosa como fuente alternativa de carbono.

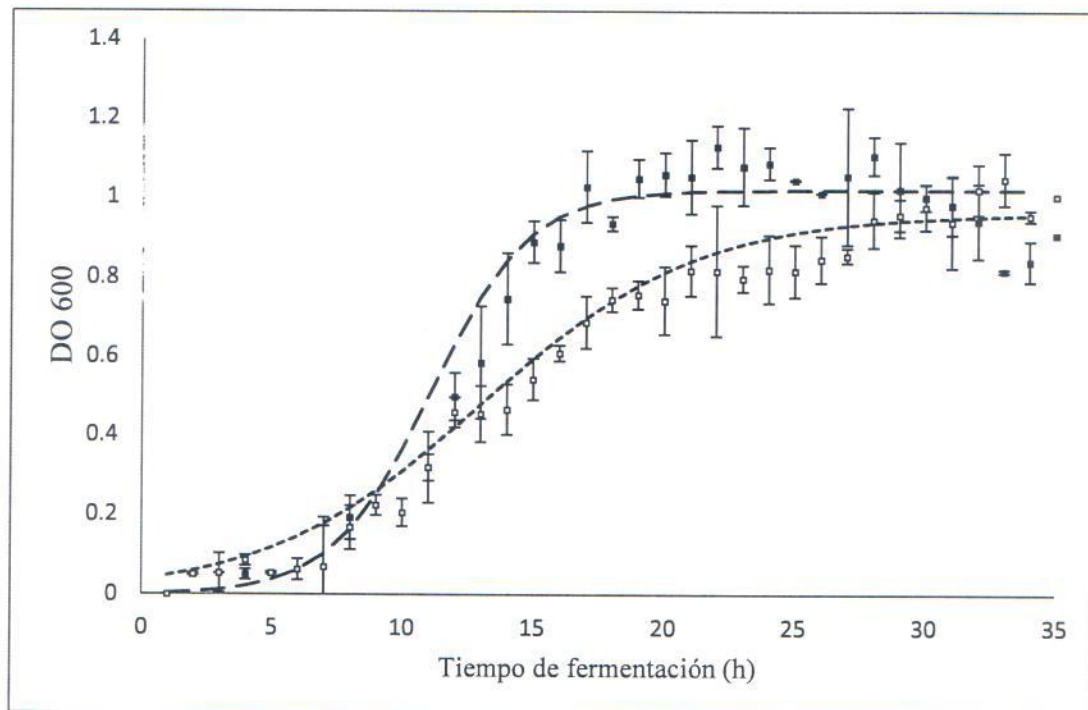


Figura 19. Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 recombinante, ■ *E. coli* BL21 recombinante sin inducción; ▾ *E. coli* BL21 inducida con IPTG

7.2.4 Cinética enzimática de lacasa recombinante.

La cinética enzimática de lacasa recombinante se muestra en la figura 20. Donde se observa que la inducción se llevó a cabo a las 11 h, encontrándose la máxima actividad en la fase exponencial y estacionaria del crecimiento microbiano, después de la toma de la muestra, con 3740 ± 342 U/L a las 7 h después haber hecho la inducción, dato que es comparable con lo reportado por Ihssen

y cols. (2015) quienes reportaron una actividad de 3400 U/L, de una lacasa obtenida *Bacillus licheniformis* (CotA) y expresada en *E. coli*. Además, la actividad enzimática encontrada en este estudio supera 80 veces la actividad enzimática (44.8 U/L) reportada por Ng y col. (2013) de una lacasa obtenida de *Aeromonas hydrophila* NIU01 y expresada en *E. coli*.

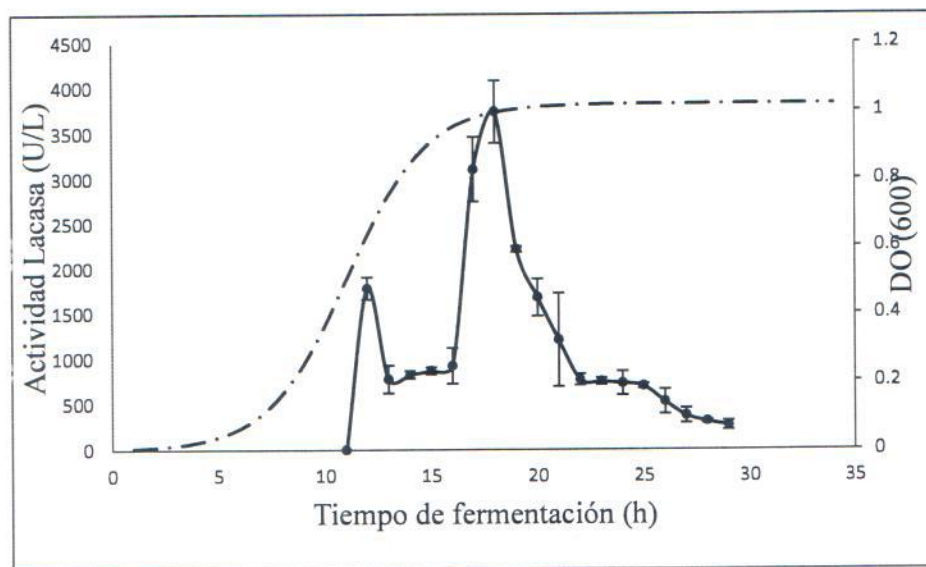


Figura 20. Cinética de lacasa recombinante de *E. coli* BL21 con IPTG: -- Biomasa, ● Actividad de lacasa.

Aunado a esto, los resultados de este trabajo superan en un 200 % la actividad enzimática reportada por Park y cols. (2015), quienes realizaron la expresión del gen *Lacc6* de *P. ostreatus* en *P. pastoris*, obteniendo valores de 1560 U/L. La máxima actividad enzimática encontrada en este estudio (3740 ± 342 U/L), es similar a la reportada por Grandes-Blanco y cols. (2013) en la expresión de lacasa en la cepa de *P. ostreatus* (3190 ± 707 U/L), sin embargo, se obtiene esta concentración hasta las 144 h, por lo cual, el sistema de expresión diseñado en este trabajo, produce la misma concentración de enzima en un menor tiempo.

Es importante mencionar que además de evaluar la actividad enzimática de la cepa BL21 recombinante, se llevó a cabo la cinética enzimática de la cepa recombinante sin inducción con IPTG, en la cual no se encontró actividad enzimática de lacasa en ningún punto de muestreo.

Esto indica que la actividad enzimática que presenta el medio de cultivo es debida a la inducción con IPTG y no por que BL21 tenga la capacidad de producir una enzima análoga a la lacasa.

La actividad de lacasa en diferentes tiempos de almacenamiento de las muestras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se llevó a cabo a fin de determinar la estabilidad de la enzima con respecto al tiempo, los resultados de esta actividad se muestran en la figura 21.

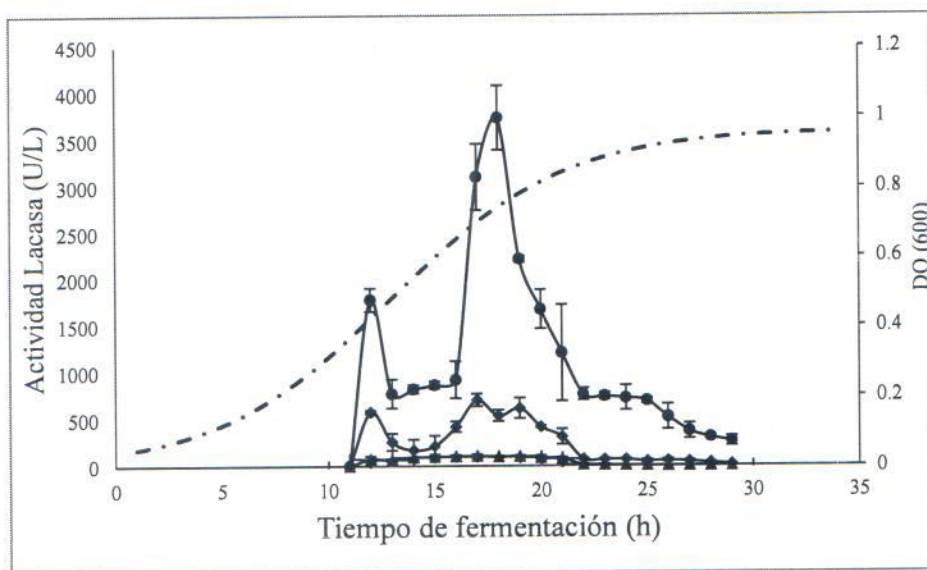
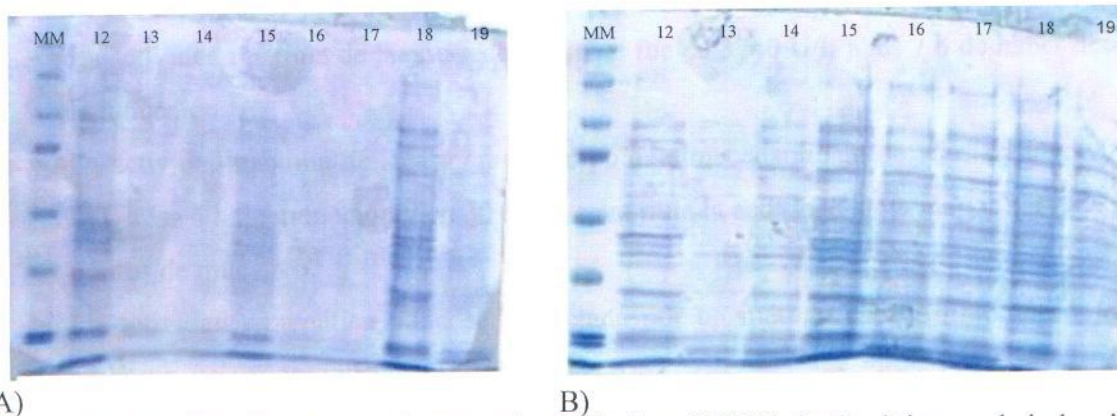


Figura 21. Cinética de lacasa recombinante en diferentes tiempos de almacenamiento; ● Actividad inmediatamente al tomar la muestra; ◆ Actividad de lacasa a los 15 días de la toma de muestra; ▲ Actividad de lacasa a los 30 días de la toma de muestra.

Como se puede observar, la actividad enzimática disminuye conforme se incrementa el tiempo de almacenamiento de la muestra a los 15 días con respecto a los 30 días, este decaimiento coincide con lo reportado por Gunne y cols. (2013), quienes proponen que la pérdida de actividad catalítica se puede deber al incremento intracelular del cobre, el cual impide que se continúe expresando la proteína adecuadamente. Aunado a que la producción de la enzima en la cepa nativa, pudiera sufrir algunas modificaciones post-traduccionales que *E. coli* BL21 no realiza eficientemente. Por lo cual, una opción para disminuir este problema, sería la co-expresión de proteínas chaperonas intracelulares.

El perfil de expresión de proteínas del cultivo de *E. coli* BL21 recombinante se muestra en la figura 22, donde se observa que la intensidad de las bandas se incrementa a partir de las 5 h y en la fase exponencial, cuando se agrega el inductor IPTG, lo cual indica que la inducción de la expresión de la proteína con IPTG además de expresar la lacasa, estabiliza otras proteínas. Este fenómeno, no coincide con lo argumentado por Leone y cols. (2015), quienes mencionan que en el sistema recombinante de *E. coli* BL21 la mayor expresión de la proteína ocurre durante la fase estacionaria cuando la mayor parte del sustrato comienza a consumirse e incluso cuando se ha agregado antes el IPTG, lo encontrado en este ensayo indica que la expresión de proteínas es mayor en la fase exponencial del crecimiento microbiano.



A) B)
Figura 22. Electroforesis de las fermentaciones de *E. coli* BL21 desde el tiempo de inducción.
A) Sin inducción con IPTG; B) Con inducción con IPTG.

Los resultados encontrados en este trabajo son significativos debido a que no existen reportes de expresión heteróloga del gen LACP83 en organismos procariotes, además de que se ha demostrado que la proteína presenta actividad catalítica y es funcional, solo que es muy susceptible a los cambios tanto de pH debido a que no se obtuvieron resultados en el zimograma, aunado a esto se encontró un adecuado rendimiento y más aún se logró expresar la enzima en menor tiempo en comparación con la enzima original producida por *P. ostreatus*.

8. Conclusiones

- Se caracterizó la fermentación de *P. ostreatus* en fermentación sumergida, obteniendo la enzima constitutiva de aproximadamente 50 kDa, comprobando la actividad y presencia mediante Zimografía.
- Se logró hacer la transformación adecuadamente de *E. coli* Top 10 con el vector de clonación pJETP83-pQ
- Se logró hacer la construcción del vector pQEP83
- Se logró transformar y clonar pQEP83 en BL21 satisfactoriamente
- *E. coli* es capaz de expresar el gen de lacasa y más aún ser una enzima funcional
- La actividad máxima de lacasa recombinante fue de 3740 U/L a las 7 h de haber hecho la inducción.
- La actividad máxima de lacasa en el tiempo de almacenamiento de 15 días fue de 706 U/L a las 6 h de inducción y en 30 días ya era nula la actividad en la mayor parte de los puntos de muestreo.
- La actividad enzimática pudo ser detectada por un método espectrofotométrico, sin embargo, no se logra visualizar por Zimografía

9. Perspectivas

Es necesario continuar la investigación introduciendo el gen LACP83 en un vector para levaduras, debido a que las levaduras tienen la capacidad de hacer modificaciones postraduccionales, éstas pueden ser necesarias para que la enzima pueda ser más estable y así durar mucho más tiempo en el medio y sea aplicable en procesos biotecnológicos

Además de la producción en levadura, se debe hacer una purificación y caracterización de la enzima.

Probar la enzima en procesos biotecnológicos, como biorremediación de aguas residuales.

10. Referencias

- Ainsworth A and Rayner A. 1991. Ontogenic stages from coenocyte to basidiome and their relation to phenoloxidase activity and colonization processes in *Phanerochaete magnoliae*. *Mycology Research* 95: 1414-1422.
- Alexandre G and Bally R. 1999. Emergence of laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum* occurs via a two-step phenotypic switching process. *FEMS Microbiology Letters* 174:371-378.
- Alexandre G, Bally R, Taylor B and Zhulin I. 1999. Loss of cytochrome oxidase activity and acquisition of resistance to quinone analogs in a laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum*. *Journal Bacteriology* 181: 6730-6738
- Almansa E, Kandelbauer A, Pereira L, Cavaco-Paulo A and Gubitz G. 2004. Influence of structure on dye degradation with laccase mediator systems. *Biocatalysis and Biotransformation* 22:315-324.
- Alper N and Acar J. 2004. Removal of phenolic compounds in pomegranate juices using ultrafiltration and laccase-ultrafiltration combinations. *Food/Nahrung* 48: 184-187.
- Andersen S, Petery M y Roepstorff P. 1996. Cuticular sclerotization in insects. *Computing Biochemistry Physical* 113:689-705.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman R, Kanost M and Kramer K. 2005. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102: 11337-11342.
- Arias M, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball A and Hernandez M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied Environmental Microbiology* 69:1953-1958.
- Baldrian P. 2004. Purification and characterization of Laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied and Microbial Biotechnology* 63:560-563.
- Barnett J, Payne R and Yarrow D. 2000. *Yeast: Characteristics and Identification*, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, London.
- Barr D and Aust S. 1994. Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. *Environment Science Technoogy* 28:78-87.
- Barreca A, Fabbrini M, Galli C, Gentili P and Ljunggren S. 2003. Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 26: 105-110.

- Berka R, Brown S y Xu F and Schneider P.: US5795760 1998.
- Bertrand B, Martínez-Morales F and Trejo-Hernández M. 2013. Fungal laccases: Induction and production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12:473-488.
- Binz T and Canevascini G. 1997. Purification and partial characterization of the extracellular laccase from *Ophiostoma novo-ulmi*. *Current Microbiology*. 35: 278-281. Blanchette R. 1984. Manganese accumulation in wood decayed by whiterot fungi. *Phytopathology* 74:725-730.
- Blanchette R. 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian journal of Botany* 73:S999-S1010.
- Brown M, Zhao Z and Mauk A. 2001. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorganical Chim Acta* 331: 232-238.
- Brown N, Barret S, Camakaris J, Lee B and Rouch D. 1995. Molecular-genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (Pco) from *Escherichia coli* plasmid Prj1004. *Molecular microbiology* 17:1153-1166.
- Bu'Lock JD. 1967. Fungal metabolites with structural function. In *Essays in Biosynthesis and Microbial Development* 1-18.
- Bulter T, Alcalde M, Sieber V, Meinhold P, Schlachtbauer C and Arnold F. 2003. Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied Environmental Microbiology* 69:987-995.
- Cabrera S. 2011. Producción de lacasa de *Pleurotus ostreatus* utilizando los residuos de Agave tequilana Weber como sustrato. Tesis de Doctorado. IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México. Mex.
- Calabrese B, Pickard M, Vazquez-Duhalt R and Heller A. 2002. Electroreduction of O₂ to water at 0.6 V (SHE) at pH 7 on the 'wired' *Pleurotus ostreatus* laccase cathode. *Biosens Bioelectron* 17: 1071-1074.
- Camacho J, Nava B, Díaz R, Tlecuitl-Beristain S, Garrido V and Bibbins-Martínez M. 2015. Induction effect of azo yellow dye on gene expression and activity of oxidases of *Pleurotus ostreatus* grown in submerged fermentation. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias* 6: 57-71.
- Camarero S, García O, Vidal T, Colom J, del Rio J, Gutiérrez A, Gras J, Monje R, Martínez M and Martínez A. 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme Microbiology Technology* 113-120.

- Camarero S, Ibarra D, Martínez M and Martínez A. 2005. Ligninderived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied Environmental Microbiology* 71:1775-1784.
- Caparros-Ruiz D, Fornale S, Civardi L, Puigdomenech P and Rigau J. 2006. Isolation and characterisation of a family of laccases in maize. *Plant Sci* 171: 217-225.
- Chang S and Miles P. 2004. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional value, medicinal effect, enviromental impact*. CRC Press, Boca Raton 451.
- Chefetz B, Chen Y and Hadar Y. 1998. Purification and characterization of Laccase from *Chaetomium thermophilium* and its role in humification. *Applied and Enviromental Microbiology* 64:3175-3179.
- Chefetz B, Chen Y and Hadar Y. 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilium* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3175-3179.
- Chen S, Ge W and Buswell J. 2004. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS Microbiology Letters* 230: 171-176.
- Chen S, Ma D, Ge W and Buswell J. 2003. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Microbiology Letters* 218: 143-148.
- Choi H, Keum K and Lee S. 2006. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science* 61: 876-885.
- Christenson A, Dimcheva N, Ferapontova E, Gorton L, Ruzgas T, Stoica L, Shleev S, Yaropolov A, Haltrich D, Thorneley R and Aust S. 2004. Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes. *Electroanal* 16: 1074-1092.
- Cisterna C. 2003. *Cultivo del champiñón ostra en chile*. 1ª Edición. Editorial Mycotec, Ltda. Chile. 118.
- Claus H and Filip Z. 1997. The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiology research* 152:209-216.
- Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* 179: 145-150.
- Collins P and Dobson A. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied Environment Microbiology* 63: 3444- 3450.

- Crawford R. 1981. Lignin biodegradation and transformation. Wiley Interscience, New York 84-109.
- Davies G and Ducros V. 2001. Laccase. En: Handbook of metalloproteins. John Wiley and Sons, Ltd. Chichester, West Sussex.
- De Marco A and Roubelakis-Angelakis K. 1997. Laccase activity could contribute to cell-wall reconstitution in regenerating protoplasts. *Phytochemistry* 46: 421-425.
- De Marco A. 2009. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 8: 26-43
- De Vries O, Kooistra W and Wessels J. 1986. Formation of an extracellular laccase by a *Schizophyllum commune* dikaryon. *Journal Genetic Microbiology* 132: 2817-2826.
- Deckert G, Warren P, Gaasterland T, Young W, Lenox A, Graham D, Overbeek R, Snead M, Keller M, Aujay M, Huber R, Feldman R, Short J, Olsen G and Swanson R. 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392:353-358.
- Dedeyan B, Klonowska A, Tagger S, Tron T, Iacazio G, Gil G and Petit J. 2000. Biochemical and molecular characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 925-929.
- Diamantidis G, Effosse A, Potier P and Bally R. 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology Biochemistry* 32:919-927.
- Díaz R, Téllez-Téllez M, Sánchez C, Bibbins-Martínez M, Díaz-Godínez G and Soriano-Santos J. 2013. Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 16: 1-13
- Díaz R. 2009. Efecto del pH inicial de desarrollo de *P. ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas, Tesis CIBA-IPN.
- Díaz-Godínez G, Soriano J, Augur C and Viniestra-González G. 2001. Exopectinases Produced by *Aspergillus niger* in Solid-State and Submerged Fermentation: A Comparative Study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 271-275.
- Dittmer N, Suderman R, Jiang H, Zhu Y, Gorman M, Kramer K and Kanost M. 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 34: 29-41.

Dittmer N, Suderman R, Jiang H, Zhu Y, Gorman M, Kramer K and Kanost M. 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 34:29-41.

Dong X, Qin L, Tao Y, Huang J and Dong Z. 2012. Overexpression and characterization of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* in *Trichoderma reesei*. *Wei sheng wu xue bao. Acta microbiologica Sinica* 52: 850-856.

Driks A. 2004. The *Bacillus* spore coat. *Phytopathology* 94:1249-1251.

D'Souza T, Boominathan K and Reddy C. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied Environmental Microbiology* 62: 3739-3744.

Durán N, Rosa M, Annibale A and Gianfreda L. 2002. Applications of laccase and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and microbial Technology* 31: 907-931.

Dwivedi U, Singh P, Pandey V and Kumar A. 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal Molecular Catalytic B-Enzymatic* 68:117-128.

Edens W, Goins T, Dooley D and Henson J. 1999. Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3071-3074.

Eggert C, Temp U and Eriksson K-E. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1151-1158.

Endo K, Hayashi Y, Hibi T, Hosono K, Beppu T and Ueda K. 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *Journal of Biochemistry* 133:671-677.

Endo K, Hosono K, Beppu T and Ueda K. 2002. A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology* 148:1767-1776.

Enguita F, Martins L, Henriques A and Carrondo M. 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry* 278:19416-19425.

- Enguita F, Martins L, Henriques A and Carrondo M. 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component a laccase with enhanced thermostability properties. *Journal Biology Chemistry* 278: 19416–19425.
- Erikson K, Blanchette R and Ander P. 1990. *Microbial degradation of Wood and Wood components*. Springer-Verlag, Berlín, New York 407.
- Faraco V, Giardina P and Sannia G. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* 149: 2155-2162.
- Farnet A, Criquet S and Pocachard E. 2002. Purification of a new isoform of laccase from a *Marasmius quercophilus* strain isolated from a cork oak litter (*Quercus subre* L.). *Mycologia* 94:735-740.
- Fernández-Larrea J and Stahl U. 1996. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Molecular Genetics Genomics* 252: 539-551.
- Froehner S and Eriksson K. 1974. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccases. *Journal of Bacteriology* 120: 458-465.
- Fukushima Y and Kirk T. 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. *Applied and Environmental Microbiology* 61:872-876.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer C, Strauss J and Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiol* 148: 2159-2169.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer C, Strauss J and Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169.
- Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B and Haltrich D. 2002a. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 529-536.
- Galvez R, Pablos T, Sigala J and Lara A. 2014. Co-utilization of glucose and xylose increases growth rate without affecting plasmid DNA yield of engineered *E. coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13: 387-391.
- Gamelas J, Tavares A, Evtuguin D and Xavier A. 2005. Oxygen bleaching of kraft pulp with polyoxometalates and laccase applying a novel multi-stage process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 33: 57-64.

- García O, Camarero S, Colom J, Martínez A, Martínez M, Monje R and Vidal T. 2003. Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57:513-519.
- García-Rivero M, Membrillo-Venegas I, Viguera-Carmona S, Zafra-Jiménez G, Zárate-Segura P and Martínez-Trujillo M. 2015. Enzymatic pretreatment to enhance chemical bleaching of kraft pulp. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14: 335-345.
- Garzillo A, Colao M, Caruso C, Caporale C, Celletti D and Buonocore V. 1998. Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Applied Microbiology Biotechnology* 49: 545-551.
- Gavnholt B and Larsen K. 2002. Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiology Plant* 116: 273-280
- Geiger J, Rio B, Nandris D and Nicole M. 1986. Laccase of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 12:121-133
- Germann U and Lerch, K. 1986. Isolation and partial nucleotide sequence of the laccase gene from *Neurospora crassa*: amino acid sequence homology of the protein to human ceruloplasmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83:8854-8858.
- Gianfreda L, Xu F and Bollag J. 1999. Laccases: A Useful Group of Oxidative Enzymes. *Bioremediation Journal* 3:1-26.
- Giardina P, Cannio R, Martirani L, Marzullo L, Palmieri G and Sannia G. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the ligning-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied Environmental Microbiology* 61: 2408-2413.
- Giardina P, Aurilia V, Cannio R, Marzullo L, Amoresano A, Siciliano R and Sannia G. 1996. The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *European Journal of Biochemistry* 235(3): 508-515.
- Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S and Sannia G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular molecular life science* 67:369-385.
- Giardina P, Palmieri G, Saloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G and Sannia G. 1999. Protein and Gene Structure of a Blue Laccase from *P. ostreatus*. *Journal Biochemical* 341: 655-663.
- Gimeno C, Ljungdahl P, Styles C and Fink R. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077-1090.
- Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant M and Bally R. 1993. Polyphenol oxidase from *Azospirillum lipoferum* isolated from the rhizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters* 108:205-210.

Glazer A and Nikaido H. 1998. Microbial Biotechnology: Fundamentals of applied microbiology. W. H. Freeman and Company. USA. 334-347.

Glenn J, Morgan M, Mayfield M, Kuwahara M and Gold H. 1983. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemical Biophysical Commun 114:1077-1083.

Gochev V and Krastanov A. 2007. Isolation of laccase producing *Trichoderma spp.* Bulgarian Journal, Agricultural Science 13:171-176.

Goffeau A, Barrell B, Bussey H, Davis R, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel J, Jacq C and Johnston M. 1996. Life with 6000 genes. Science 274: 563-567.

Gold M and Alic M. 1993. Molecular biology of the lignin-Degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiological Reviews 57: 605-622.

Gomes K and Roberto D. 2006. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. Brazilian Journal of Microbiology 37: 468-473.

Goncalves M and Steiner W. 1996. Purification and characterization of laccase from a newly isolated woody-decaying fungus. Enzymes for pulp and paper processing.

Gorman M, Sullivan L, Nguyen T, Dai H, Arakane Y, Dittmer N, Syed L Li J, Hua D and Kanost M. 2012. Kinetic properties of alternatively spliced isoforms of laccase-2 from *Tribolium castaneum* and *Anopheles gambiae*. Insect Biochemistry Molecular Biology 42:193-202

Grandes-Blanco A, Díaz Godínez G, Téllez-Téllez M, Delgado-Macuil R, Rojas-López M and Bibbins-Martínez M. 2013. Ligninolytic activity patterns of *P. ostreatus* obtained by submerged fermentation in presence of 2,6-dimethoxyphenol and remazol brilliant blue R dye. Preparative Biochemistry and Biotechnology 43: 468-480.

Griffin H. 1994. Fungal Physiology. Wiley-liss. New York.

Guan Z, Song C, Zhang N, Zhou W, Xu C, Zhou L and Liao X. 2014. Overexpression, characterization, and dye-decolorizing ability of a thermostable, pH-stable, and organic solvent-tolerant laccase from *Bacillus pumilus* W3. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 101: 1-6.

Guillén F, Muñoz C, Gómez-Toribio V, Martínez Á and Martínez M. 2000. Oxygen Activation During Oxidation of Methoxyhydroquinones by laccase from *P. eryngii*. Applied and Environmental Microbiology. 66: 170-175.

- Gunne M, Al-Sultani D and Urlacher V. 2013. Enhancement of copper content and specific activity of CotA laccase from *Bacillus licheniformis* by coexpression with CopZ copper chaperone in *E. coli*. *Journal of biotechnology* 168: 252-255.
- Guo-Qing Z, Yi-Fan W, Xiao-Qing Z, Tzi B and He-Xiang W. 2009. Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. *Process Biochemistry* 45: 627-633.
- Haibo Z, Yinglong Z, Feng H, Peiji G and Jiachuan C. 2009. Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters* 31: 837-843.
- Ham M, Choi H and Song H. 2005. Purification and characterization of Laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Microbiology* 43:555-560.
- Hammel K. 1996. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungus. *New Journal Chemistry* 20:195-198.
- Hammel K. 1997. Fungal degradation of lignin. En: Cadisch, G. y Giller, K. E. Eds. *Plant litter quality and decomposition*. CAB International. London.
- Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Review* 13:125-135.
- Hatamoto O, Sekine H, Nakano E and Abe K. 1999. Cloning and expression of a cDNA encoding the laccase from *Schizophyllum commune*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63: 58-64.
- Hattori M, Tsuchihara K, Noda H, Konishi H, Tamura Y, Shinoda T, Nakamura M and Hasegawa T. 2010. Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). *Insect Biochem. Mol. Biol* 40: 331-338.
- Hayhurst C. 2004. *Epidemics Deadly diseases throughout history, E. coli*. Rosen Publishing Group, Inc 1: 5-8
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P and Anke T. 1998. Characterization of laccase and peroxidase from wood-rotting fungi (Family *Coprinaceae*). *Applied and Environmental Microbiology* 64:1601-1606.
- Higuchi T. 1985. *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Academic Press, Orlando.
- Hong F, Meinander N and Jönsson L. 2002. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 79: 438-449.

- Hong Y, Zhou H, Tu X, Li J and Xiao Y. 2007. Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes sp.* 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Current Microbiology* 54: 260-265.
- Hoopes J and Dean J. 2004. Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*. *Plant physiology biochemistry* 42:27-33
- Hopkins T and Kramer K. 1992. Insect Cuticle Sclerotization. *Annual Review of Entomology* 37:273-302
- Hou H, Zhou J, Wang J, Du C and Yan B. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry* 39: 1415-1419.
- Hublik G and Schinner F. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *P. ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 330-336.
- Hullo M, Moszer A, Danchin and Martín-Verstraete. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal Bacteriology* 183:5426-5430.
- Ihssen J, Reiss R, Luchsinger R, Thöny-Meyer L and Richter M. 2015. Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli*. *Scientific reports* 5: 10465.
- Ishida H, Hata Y, Abe Y and Akao T. 2002: JP2002218983 A2
- Jauregui J, Valderrama B, Albores A and Vazquez-Duhalt R. 2003. Microsomal Transformation of *Orgnosporus pestocides* by White rot Fungi. *Biodegradation* 14: 397-406.
- Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren P and Stahl S. 2002. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 35: 91-105.
- Jonsson L, Saloheimo M and Penttila M. 1997. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetic* 32: 425-430.
- Jung H, Xu F and Li K. 2002. Purification and characterization of laccase from degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme Microbiology Technology* 30:161-168.
- Kaneko S, Cheng M, Murai H, Takenaka S, Murakami S and Aoki K. 2009. Purification and characterization of an extracellular laccase from *Phlebia radiata* strain BP-11-2 that decolorizes fungal melanin. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 73: 939-942.

- Karahanian E, Corsini G, Lobos S and Vicuña R. 1998. Structure and expression of laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochemistry biophysics Acta* 143:65-74.
- Kiiskinen L, Kruus K, Bailey M, Ylosmaki E, Siika-aho M and Saloheimo M. 2004. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology* 150: 3065-3074.
- Kim Y, Cho N, Eom T and Shin W. 2002. Purification and characterization of a Laccase from *Cerrena unicolor* and its reactivity in lignin degradation. *Bull. Journal of the Korean Chemical Society* 23:985-989.
- Kirk T and Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetic of wood degradation by white-rot fungi. *Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry*. John Wiley y Sons, Inc. New York 1:273-307
- Kojima Y, Kita Y and Tsukuda Y. EP0388166, 1990. M.: US7183090
- Koroljova O, Stepanova E, Gavrilova V, Biniukov V, Jaropolov A, Varfolomeyv S, Scheller F, Makower A and Otto A. 1999. Laccase of *Coriolus zonatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 76:115-127.
- Koschorreck K, Richter S, Ene A, Roduner E, Schmid R and Urlacher V. 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Applied Microbiology Biotechnology* 79: 217-224
- Kruus K, Kiiskinen L-L, Raettoe M, Viikari L and Saloheimo, M.: WO2001092498 A1 2001.
- Kumar S., Phale P., Durani S and Wangikar P. 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology Bioengineering* 83:386-394.
- Kunamneni A, Ballesteros A, Plou F and Alcalde M, 2007. Fungal laccase- a versátil enzyme for biotechnological applications. *Applied microbiology, formatex* 233-245.
- Kunamneni A, Plou F, Ballesteros A and Alcalde M. 2008. Laccases and their applications: A patent review. *Recent patology Biotechnology* 2:10-24.
- Kuwahara M, Glenn J, Morgan M and Gold M. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 169:247-250.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- La Fayette P, Eriksson K and Dean J. 1999. Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). *Plant Molecular Biology* 40:23-25
- Larrondo L, Avila M, Salas L, Cullen D and Vicuna R. 2003. Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. *Microbiology* 149: 1177-1182.
- Law D and Timberlake W. 1980. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *Journal Bacteriology* 144: 509-517.
- Leathman G and Stahmann M. 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *Journal of General Microbiology* 125:147-157.
- Lee K, Wi S, Singh A and Kim Y. 2004. Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *Journal Wood Science* 50: 281-284.
- Leland H., 1974. *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. *Bacteriological Reviews* 38: 164-198.
- Leone S, Sannino F, Tutino M, Parrilli E and Picone D. 2015. Acetate: friend or foe? Efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source. *Microbial cell factories* 14: 1-10.
- Leonowicz A, Cho N, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D and Rogalski J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal Basic Microbiology* 34:185-227.
- Leonowicz A, Chon N, Lutere K, Wilkolazka A, Wojtawasilewska M, Matuszewska A, Wesenberg D and Rogalski J. 2001. Fungal laccase propieties and activity on lignin. *Journal Basic of Microbiology* 41: 185-227.
- Leonowicz A, Matuszawska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtaś- Wasilewska M, Cho N, Hofrichter M and Rogalski J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.
- Lewis N and Yamamoto E. 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:455-496.
- Lithauer D, Jansen Van Vuuren M, Van Tonder A and Wolfaardt F.W. 2007. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme and Microbial Technology* 40: 563-568.

Liu L, Tewari R and Williamson P. 1999. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infectology Immunology* 67: 6034-6039.

Liu W, Chao Y, Lii S, Bao H and Qian S. 2003. Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology Biotechnology* 63: 174-181.

Loera C, Pérez P, Barbosa R and Villaseñor O. 2006. Laccases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology* 81: 323-340.

López E. 2002. Hongos comestibles. Orellanas: deliciosa medicina. Visión chamanica Bogotá-Colombia.

Lucas-Elio P, Solano F and Sánchez-Amat A. 2002. Regulation of polyphenol oxidase activities and melanin synthesis in *Marinomonas mediterránea*: identification of ppoS, a gene encoding a sensor histidine kinase. *Microbiology* 148:2457-2466.

Lyashenko A, Zhukhilistova N, Gabdoulkhakov A, Zhukova Y, Voelter W, Zaitsev V, Bento I, Stepanova E, Kachalova G, Koroleva O, Cherkashyn E, Tishkov A, Lamzin V, Schirwitz K, Morgunova E, Betzel C, Lindley P and Mikhailov A. 2006. Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the Laccase from *Cerrena maxima*. *Structural Biology and Crystallization Communications. Acta Crystallization Seccion I.F* 62:954-957.

Madhavi V and Lele S. 2009. Laccase: properties and applications. *BioResources* 4: 1694-1717.

Mansur M, Suarez T and González A. 1998. Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied Environment Microbiology* 64: 771-774.

Mansur M, Suarez T, Fernández-Larrea J, Brizuela M and González A. 1997. Identification of a laccase gen family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Applied Environmental Microbiology* 63: 2637-2646

Martínez A. 2002. Molecular biology and structure-function of lignindegrading heme peroxidases. *Enzyme Microbiology Technology* 30:425-444.

Martínez Ruiz. 2013. Caracterización cinética y Aplicaciones biotecnológicas de Lacasa. Universidad de Murcia. Facultad de Biología.

Martínez-Carrera D, Curvetto M, Sobal P, Morales and Mora. 2010. Hacia un desarrollo sostenible del sistema de producción-consumo de los hongos comestibles y medicinales en Latinoamérica: Avances y perspectivas en el siglo XXI: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales COLPOS-UNS-CONACyT- AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. México, Puebla. 648.

Martínez-Carrera D, Morales M, Sobal A and Larque-Saavedra. 1993. ¿Reconversión de la industria de los hongos? *Technoindustria* 52-59.

Martins L, Soares C, Pereira M, Teixeira M, Costa T, Joanes G and Henriques A. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal Biology Chemistry* 277: 18849-18859.

Martirani L, Giardina P, Marzullo L and Sannia G. 1996. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res* 30: 1914-1918.

Máximo C, Pessoa A and Costa-Ferreira M. 2003. Biotransformation of Industrial Reactive azo dyes by *Geotrichum sp.* CCM1 1019. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 145-151.

Mayer A y Staples R. 2002. Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551-565.

McCaig B, Meagher R and Dean J. 2005. Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 221:619-636

McGuirl and Dooley 1999, Cooper-containing oxidases. *Current Opinion in Chemical Biology* 3: 138-144

Messerschmidt A, Ladenstein R, Huber R, Bolognesi M, Avigliano L, Petruzzelli R, Rossi A and Finazzi-Agro A. 1992. Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *Journal Molecular Biology* 224:179-205.

Min K, Kim Y, Kim Y, Jung H and Hah Y. 2001. Characterization of a novel Laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 392:279-286.

Minussi R, Miranda M, Silva A, Ferreira C and Aoyama H. 2007. Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mil wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Africa Journal Biotechnology* 6:1248-1254.

Monteiro M and de Carvalho M. 1998. Pulp bleaching using laccase from *Trametes versicolor* under high temperature and alkaline conditions. *Applied Biochemistry Biotechnology* 70-2:983-993.

Morozova O, Shumakovich G, Gorbacheva M, Shleev S and Yaropolov A. 2007, Blue laccases. *Biochemistry (Moscow)* 72: 1136-1150

Morozova O, Shumakovich G, Shleev S and Yaropolov Y, 2007, Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry Microbiology* 43, 523-535.

Muñoz C, Guillén F, Martínez A and Martínez M. 1997. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *P. eringii*, *Current Microbiology* 34: 1-5.

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

Nakamura K and Go N. 2005. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 2050-2066.

Ng I, Zhang X, Zhang Y and Lu Y. 2013. Molecular cloning and heterologous expression of laccase from *Aeromonas hydrophila* NIU01 in *Escherichia coli* with parameters optimization in production. *Applied biochemistry and biotechnology* 169: 2223-2235.

Nicotra S, Cramarossa M, Mucci A, Pagnoni U, Riva S and Forti L. 2004. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron* 60: 595-600.

Niladevi K, Jacob N and Prema P. 2008. Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and characterization. *Process biochemistry* 43:654-660.

Oda Y, Adachi K, Aita I, Ito M, Aso Y and Igarashi H. 1991. Purification and properties of Laccase excreted by *Pycnoporus coccineus*. *Agricultural Biology and Chemistry* 55:1393-1395.

Ohga S and Royse D.J. 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulose genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. *FEMS Microbiology Letters* 201: 111-115.

- Ohga S, Smith M, Thurston C and Wood D. 1999. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes in the mycelium of *Agaricus bisporus* during fruit body development on a solid substrate. *Mycology Research* 103: 1557-1560.
- Orth A, Royse D and Tien M. 1993. Ubiquity of Lignin-Degrading Peroxidases among Various Wood-degrading Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4017-4023.
- Oshima R, Yamauchi Y, Watanabe C and Kumanotani J. 1985. Enzymic oxidative coupling of urushiol in sap of the lac tree, *Rhus vernicifera*. *Journal Organic Chemistry* 50: 2613-2621.
- Otterbein L, Record E, Longhi S, Asther M and Moukha S. 2000. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* 1-937 and expression in *Pichia pastoris*. *European Journal Biochemistry* 267: 1619-1625.
- Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G and Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *P. ostreatus* cultures. *Enzyme and microbial Technology* 33: 220-230.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B and Sannia G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Environmental Microbiology* 66: 920-924
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A and Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal Biology and Chemistry* 272: 31301-31307.
- Paloheimo M, Valtakari L, Puranen T, Kruus K, Kallio J, Mantyla A, Fagerstrom R, Ojapalo P and Vehmaanpera J: US2006063246 A1.2006
- Park M, Kim M, Kim S, Ha B and Ro H. 2015. Differential Expression of Laccase Genes in *Pleurotus ostreatus* and Biochemical Characterization of Laccase Isozymes Produced in *Pichia pastoris*. *Mycobiology* 43: 280-287.
- Pazarlıoğlu N, Sarişik M and Telefoncu A. 2005. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process biochemistry* 40: 1673-1678.
- Peláez F, Martínez M and Martínez T. 1995. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycology* 99:37-42.
- Pérez J, Martínez J and de la Rubia T. 1996. Purification and partial characterization of a Laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4263-4267.
- Périeré F, Reddy V, Blackburn N and Gold M. 1998. Purification and characterization of Laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 353:349-355.

- Pezella C, Autore F, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G and Faraco V. 2009. The *P. ostreatus* laccase multi-gene family isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics* 55: 45-57.
- Pinzón, C. 2004. Implementación de un biorreactor de lecho fijo operado con pulsaciones de aire y oxígeno empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en espuma de poliuretano para reducir el color de efluentes provenientes de la industria papelera. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Pionteck K, Antorini M and Choinowski T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 37663-37669.
- Piscitelli A, Giardina P, Mazzoni C and Sannia G. 2005. Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 428-439.
- Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* 57: 20-33.
- Pourcel L, Routaboul J, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L and Debeaujon I. 2005. Transparent testa10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in Arabidopsis seed coat. *Plant Cell* 17: 2966-2980.
- Pozdnyakova N, Rodakiewicz-Nowak J and Turkovskaya O. 2004. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J. Mol. Catal. B-Enzym* 30: 19-24.
- Quevedo-Hidalgo B, Pedroza-Rodríguez A and Velásquez-Lozano M. 2015. Production of lignocellulolytic enzymes from floriculture residues using *Pleurotus ostreatus*. *Universitas Scientiarum* 20: 117-127.
- Rai M. 2008. *Advances in Fungal Biotechnology*. I.K. International Publishing House Pvt.Ltd. ISBN: 978-81-89866-53-2. 175.
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes-Macheteau M, Boudet A and Goffner D. 1999. Biochemical characterization molecular cloning and expression of laccase a divergent gene family in poplar. *European Journal Biochemical* 259: 485-495.

- Ravikumar G, Kalaiselvi M, Gomathi D, Devaki K and Uma C. 2013. Cloning, expression in *E.coli* and the enzymatic properties of laccase from *Hypsizygus ulmarius*. *World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences* 3 (1): 493-505
- Regalado V, Perestelo F, Rodríguez A, Carnicero A, Sosa F, de la Fuente G and Falcón M. 1999. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. *Applied Microbiology Biotechnology* 51: 388-390.
- Regalado V, Rodríguez A, Perestelo F, Carnicero A, de la Fuente G and Falcón M. 1997. Lignin degradation and modification by the soil inhabiting fungus *Fusarium proliferatum*. *Applied Environmental Microbiology* 63:3716-3718.
- Reinhammar B and Malmström, B. 1981. "Blue" copper-containing oxidases. En *Copper proteins*. Editorial Wiley, New York 109-149.
- Reiss R, Ihssen J and Thöny-Meyer. 2011. *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnology* 11:9
- Richardson A and McDougall G. 1997. A laccase-type polyphenol oxidase from lignifying xylem of tobacco. *Phytochemistry* 44: 229-235.
- Rigling D and Van Alfen N. 1993. Extra-intracellular laccase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3634-3639.
- Rivera-Hoyos C, Morales-Alvarez E, Poutou-Piñales R, Pedroza-Rodríguez A, Rodríguez-Vazquez R and Delgado-Boada J. 2013. Fungal laccases, *British Mycological Society* 30;1-16.
- Rivera-Hoyos C, Morales-Álvarez E, Poveda-Cuevas S, Reyes-Guzmán E, Poutou-Piñales R, Reyes-Montaño E y Cardozo-Bernal Á. 2015. Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes GILCC1 from *Ganoderma lucidum* and POXA 1B from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. *PloS one* 10 e0116524.
- Robene-Soustrade I and Lung-Escarmant B, 1997. Laccase isoenzyme patterns of European *Armillaria* species from culture filtrates and infected woody plants tissues. *European Journal of Forest Pathology* 27: 105-114.
- Roberts S, Weischel C, Grass G, Thakali K, Hazzard J, Tollin G, Rensing C and Montfort W. 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:2766-2771.
- Rodríguez E, Pickard M and Vazquez-Duhalt R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38:27-32.

Rodríguez J, Ferraz A, Nogueira R, Ferrer I, Esposito E and Durán N. 1997. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. Applied Biochemistry Biotechnology 62:233-242.

Rodríguez S, 2006. Caracterización molecular de lacasas de *P. eringii*, expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos. Tesis Doctoral. 7.

Rogalski J, Lundell T, Leonowicz A and Hatakka A. 1991. Production of laccases, lignin peroxidase and manganese dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture condition. Acta Microbiologica Polonica 40: 221-234.

Roman, R, Torres-Duarte C and Ayala M. 2010. Producción a escala piloto de lacasa de *Coriolopsis galilea*. Revista Mexicana de Micología [online] 32: 19-27.

Romanos M, Scorer C y Clare J, 1992. Foreign gene expression in yeast: a Review, Yeast 8: 423-488.

Saloheimo M and Niku-Pavola M-L. 1991. Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. Biotechnology 9: 987-990.

Saloheimo M, Niku-Paavola M.L and Knowlws J.K.C. 1991. Isolation and structural analysis of the laccase gene lignin-degrading fungus *Phlebia radiata*. Journal of General Microbiology 137:1537-1544.

Sambrook J and Russel D. 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor. New York

Sánchez-Amat A and Solano F. 1997. A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas sp* Shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. Biochemical and Biophysical Research Communications 240:787-792.

Sánchez-Amat A, Lucas-Elio P, Fernandez E, García-Borron J and Solano F. 2001. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology 1547:104-116.

Sander P, Grunewald S, Bach M, Hasse W, Reilander H and Michel H. 1994. Heterologous expression of the human D2S dopamine receptor in protease-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. European Journal Biochemistry 226: 697-705.

Santucci R, Bongiovanni C, Marini S, Del Conte R, Tien M, Banci L and Coletta M. 2000. Redox equilibria of manganese peroxidase from *Phanerochaetes chrysosporium*: functional rol of residues on the proximal side of the haem pocket. Biochemical Journals 249: 85-90.

- Saparrat M, Guilén F, Aramabarri A, Martínez A and Martínez M. 2002. Induction, isolation and characterization of two laccase from the white rot basidiomycete *Coriolus rigida*. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1534-1540.
- Sarasola P. 2014. Dual-histidin kinasas en hongos basidiomicetos. Universidad Pública de Navarra. España, Navarra.
- Schmidt O. 2006. Wood and tree fungi: Biology, damage, protection, and use. Editorial Springer 334.
- Schoemaker H, Tuor U, Muheim A, Schmidt H and Leisola M. 1991. White-rot degradation of lignin and xenobiotics. En: Betts, W. B. (Eds). *Biodegradation: natural and synthetic materials*. Springer-Verlag. London.
- Schwarze F, Engels J and Mattheck C. 2000. *Fungal strategies of decay in trees*. Springer. Berlín.
- Seo H, Chung Y, Kim S, Park C and Kim K, 2003. Enhanced expression and functional characterization of the human ferritin H and L-chain genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology Biotechnology* 63: 57-63.
- Sharma K and Kuhad R. 2008. Laccases: Enzyme revisited and function redefined. *Indian Journal of Microbiology* 48: 309-316.
- Shashirekha S, Uma L and Subramanian G. 1997. Phenol degradation by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501. *Journal Indian Microbiology Biotechnology* 19:130-133.
- Shleev S, Khan I, Morozova O, Mazhugo Y, Khalunina A and Yaropolov A. 2004. Phenylpyrazolones, novel oxidoreductase redox mediators for degradation of xenobiotics. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 40:140-5.
- Shraddha R, Sehgal S, Kamthania M and Kumar A. 2011. Laccase: Microbial, sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research* 2011:1-11
- Sigoillot C, Camarero S, Vidal T, Record E, Asther M, Pérez-Boada M, Martínez M, Sigoillot J, Asther M, Colom J and Martínez A. 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal Biotechnology* 115:333-343.

Sigoillot C, Record E, Belle V, Robert JL, Levasseur A, Punt PJ, Van Den Hondel CA, Fournel A, Sigoillot J and Asther M. 2004. Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Applied Microbiology Biotechnology* 64: 346- 352.

Slomezynski D, Nakas JP and Tanenbaum SW. 1995. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Applied Environmental Microbiology* 61: 907- 912.

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

Soden D and Dobson A. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 147: 1755-1763.

Solano F, García E, Pérez de Egea E and Sánchez-Amat A. 1997. Isolation and characterization of strain MMB-1 a novel *Melanogonic marine* bacterium. *Applied and Enviromental Microbiology* 63: 3499-3506.

Solano F, Lucas-Elío D, López-Serrano E, Fernández and Sánchez-Amat. 2001. Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiology Letters* 204:175-181

Solomon E, Augustine A and Yoon J. 2008. O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases. *Dalton Trans* 14: 3921-3932.

Solomon E, Sundaram U and Machonkin T. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96: 2563-2605.

Som T, Armstrong K, Volkert F and Broach J. 1988. Autoregulation of 2 um circle gene expression provides a model for maintenance of stable plasmid copy levels. *Cell* 52: 27-37.
Sterjiades R, Dean J y Eriksson K. 1992. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiol* 99: 1162-1168.

Suderman R, Dittmer N, Kanost M and Kramer K. 2006. Model reactions for insect cuticle sclerotization: Cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 36:353-365.

Sugantha P, Gowri S, Thirumalaisamy R, Kavitha P, Prakash B, Arunachalam G and Selvamuthukumar S. 2010. Over expression of IPTG inducible GST protein in *E. coli* BL21, *Journal Biomedical Science and Research* 2: 54-59.

Suzuki T, Endo K, Ito M, Tsujibo H, Miyamoto K and Inamori Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67:2167-2175.

- Tellez-Tellez M, Diaz R, Sanchez C and Diaz-Godínez G. 2013. Hydrolytic enzymes produced by *Pleurotus species*. African Journal of Microbiology Research 7: 276-281.
- Téllez-Tellez M, Díaz-Godínez G, Aguilar M, Sánchez C and Fernández F. 2012. Description of a laccase gene from *P. ostreatus* expressed under submerged fermentation conditions. Bioresources 7: 2038-2050.
- Téllez-Téllez M, Fernández F, Montiel-González A, Sánchez C and Díaz-Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 81: 675-679.
- Téllez-Téllez M, Sánchez C, Díaz R and Díaz-Godínez G. 2012. Zymogram patterns of extracellular laccases of *Pleurotus species* grown on non-inducer agar medium. Revista Mexicana de Ingeniería Química 11: 383-388.
- Téllez-Téllez M, Sánchez C, Loera O and Díaz-Godínez G. 2005. Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase of *P. ostreatus* species. Biotechnology Letters 27:1391-1394.
- Téllez-Téllez M, Sánchez C, Montiel-González A and Díaz-Godínez G. 2005. Laccase activities of the peripheral and central zones of the vegetative mycelium of colonies of *Pleurotus* species. Microbiology and Microbial safety 16:38-40
- Téllez-Tellez M. 2011. Identificación de una lacasa de *P. ostreatus* predominante en condiciones de fermentación líquida y caracterización molecular del gen que la codifica. Universidad Autonoma Metropolitana.
- Thomas B, Yonekura M, Morgan T, Czapla T, Hopkins T and Kramer K. 1989. A trypsin-solubilized laccase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochemistry 19:611-622.
- Thurston CF. 1994. The estructura and Fungal laccases. Journal of Microbiology 140:19-26.
- Tien M and Kirk T. K. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Burds.Science 221:661-663.
- Tien M. 1987. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. Crit Rev. Microbiol 15:141-168.
- Tlecuitl-Beristain S, Sánchez C, Loera O, Robson G.D and Díaz-Godínez G. 2008. Laccases of *P. ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: Production of a novel laccase isoform. Mycological Research 112: 1080-1084

Tonin F, Melis R, Cordes A, Sanchez-Amat A, Pollegioni L and Rosini E. 2016. Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses. *New Biotechnology* 33: 387-398.

Valdivieso M. 2006. Obtención y caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* superproductoras de glutatión. Departamento de Biotecnología de Puleva Biotech S.A. de C.V. 24.

Vicuña R. 1988. Bacterial degradation of lignin. *Enzyme Microbiology Technology* 10:645-655.

Vilar J, Guet C and Leibler S. 2003. Modeling network dynamics the lac operon, a case study. *The Journal of cell biology* 161: 471-476.

Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar C.N, Romero-Gómez S.J, Díaz- Godínez G and Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13: 157-167.

Viniegra-González G. 1997. Solid state fermentation: Definition, characteristics, limitations and monitoring. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands. In *Advances in Solid State Fermentation* 5-18.

Viterbo A, Staples R, Yagen B and Mayer A. 1994. Selective mode of action of cucurbitacin in the inhibition of laccase formation in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 35: 1137-1142.

Wagner S, Klepsch M, Schlegel S, Appel A, Draheim R, Tarry M y De Gier J. 2008. Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 14371-14376.

Wahleithner JA, Xu F, Brown SH, Golightly EJ, Halkier T, Kauppinen S, Pederson A and Schneider P. 1996. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetic* 29: 395- 403.

Wang G, Li Q, Luo B and Chen X. 2004. Ex planta phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase. *Nature Biotechnology* 227: 893-897.

Wang H, Wang F, Wang W, Yao X, Wei D, Cheng H and Deng Z. 2014. Improving the expression of recombinant proteins in *E. coli* BL21 (DE3) under acetate stress: an alkaline pH shift approach. *PloS one* 9 e112777.

Wang Y, Bouchabke-Coussa O, Lebris P, Antelme S, Soulhat C, Gineau E and Legée F. 2015. LACCASE5 Is Required for Lignification of the *Brachypodium distachyon* Culm. *Plant physiology* 168: 192-204.

- Wei D, Houtman C, Kapich A, Hunt C, Cullen D and Hammel K. 2010. Laccase and its role in production of extracellular reactive oxygen species during wood decay by the brown rot basidiomycete *Postia placenta*. *Applied Environmental Microbiology* 76: 2091-2097.
- Wesenberg D, Kyriakides, I and Agathos S. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advanced* 22: 161-187.
- Williamson P. 1997. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front. Biosci* 2: 99-107.
- Wong D. 2008. Structure and action mechanism of lignolytic anzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157:174-209.
- Wong Y and Yu J. 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research* 33:3512-3520
- Wurm D, Veiter L, Ulonska S, Eggenreich B, Herwig O and Spadiut O. 2016. The *E. coli* pET expression system revisited mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. *Applied microbiology and biotechnology* 1-9.
- Xiao Y, Tu X, Wang J, Zhang M, Cheng Q, Zeng W and Shi Y. 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a Laccase from basidiomycete *Trametes sp.* Strain AH28-2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:700-707.
- Yang J, Wang G, Ng T, Lin J and Ye X. 2015. Laccase Production and Differential Transcription of Laccase Genes in *Cerrena sp.* in Response to Metal Ions, Aromatic Compounds, and Nutrients. *Frontiers in microbiology* 6: 1-11.
- Yao Y, Sakamoto T, Honda Y, Kagotani Y, Izumitsu K, Suzuki K and Irie T. 2013. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* transformant overproduced intracellular cAMP and laccase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77: 2309-2311.
- Yaropolov A, Skorobogat'ko O, Vartanov S and Varfolomeyev D. 1994. Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 49:257-280.
- Yasuchi K, Yukio K and Yukiko T. 1990. EP0388166.
- Yatsu J and Asano T. 2009. Cuticle laccase of the silkworm, *Bombyx mori*: purification, gene identification and presence of its inactive precursor in the cuticle. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 39: 254-262

- Yaver D and Golightly E. 1996. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: Genomic organization of the laccase gene family. *Gene* 181:95-102.
- Yaver D, Ovejero M, Xu F, Nelson B, Brown K, Halkier T, Bernauer S, Brown S, Kauppinen S. 1999. Molecular characterization of laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: Genomic organization of the laccase gene family. *Gene* 181: 95-102.
- Yaver D, Xu F, Golightly E, Brown K, Brown S, Rey M, Schneider P, Halkier T, Mondorf K and Dalbøge H. 1996. Purification, characterization, molecular cloning and expression of two Laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:834-841.
- Yaver DS, Ovejero MJ, Xu F, Nelson BA, Brown KM, Halkier T, Bernauer S, Brown SH and Kauppinen S. 1999. Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase lacI. *Applied Environmental Microbiology* 65: 4943-4948.
- Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K and Dalbøge H. 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied Environment Microbiology* 62:834-841.
- Ye Y, Pan P, Kang D, Lu J and Zhang C. 2015. The multicopper oxidase gene family in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect biochemistry and molecular biology* 63: 124-132.
- Yoshida H. 1983. LXIII. Chemistry of lacquer (Urushi). *Communication from the Chemical Society of Tokyo Journal of the Chemical Society Transaction* 1: 472.
- Younes S, Mechichi T and Sayadi S. 2006. Purification and characterization of the Laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolorization of synthetic dyes. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1033-1042.
- Zabel R and Morrel J. 1992. *Wood microbiology: Decay and its prevention*. Academic press, London.
- Zhang Y, Jiang M, Hu X, Zhang G and Ma L. 2005. Expression of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Wei sheng wu xue bao Acta microbiologica Sinica* 45: 625-629.
- Zhu X and Williamson P. 2004. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research* 5:1-10.

Zhu X, Gibbons J, García-Rivera J, Casadevall A and Williamson P. 2001. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall- associated virulence factor. *Infect. Immun* 69: 5589-5596.

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

Heterologous Expression of Laccase (LACP83) of *Pleurotus ostreatus*

Amado I. Grandes-Blanco,^{a,c} Saúl Tlecuil-Beristain,^c Rubén Díaz,^b Carmen Sánchez,^b Maura Téllez-Téllez,^d Luis Márquez-Domínguez,^e Gerardo Santos-López,^e and Gerardo Díaz-Godínez^{b,*}

The heterologous expression of the gene LACP83 (encoding a laccase) from *Pleurotus ostreatus* in *Escherichia coli* was characterized. The laccase enzyme activity and kinetics of bacterial growth with an inducer (IPTG) and without inducer were determined. The maximum enzymatic activity was observed at 7 h post induction with a value of 3740 ± 342 U/L, which was similar to that reported for the native strain of *P. ostreatus* at 144 h of culture. Furthermore, the induction of laccase with IPTG reduced the specific growth rate of recombinant *E. coli* BL21 by approximately 50%. These results support the use this system for the recombinant production of the enzyme on an industrial scale.

Keywords: Gene; Recombinant protein; Transformant

Contact information: a: Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México; b: Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México; c: Laboratorio de Biotecnología, Universidad Politécnica de Tlaxcala, San Pedro Xalcatzingo, Tlaxcala, México; d: Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México; e: Centro de Investigación Biomédica de Oriente Instituto Mexicano del Seguro Social, Metepec, Puebla, México;

* Corresponding author: diazgd@hotmail.com

INTRODUCTION

Laccases are enzymes found in plants (Wang *et al.* 2015), insects (Ye *et al.* 2015), bacteria (Tonin *et al.* 2016), and white rot fungi (Yang *et al.* 2015). These enzymes use copper as a cofactor and oxidize a wide range of phenolic compounds including mono-, di- and polyphenols, aminophenols, methoxyphenols, and aromatic amines, with the consequent reduction of molecular oxygen to water (Madhavi and Lele 2009); the oxidation of these compounds generates free radicals that polymerize or degrade (Claus 2003). Laccase isoenzymes have different physicochemical properties (Téllez-Téllez *et al.* 2012a). They are widely used in industry and biotechnology processes, such as the paper, textile, food, and pharmaceutical industries, and their applications have extended to the synthesis of compounds in nanobiotechnology (Barreca *et al.* 2003; Alper and Acar 2004; Nicotra *et al.* 2004; Gamelas *et al.* 2005; Pazarlıoğlu *et al.* 2005; García-Rivero *et al.* 2015). *Pleurotus ostreatus* is a basidiomycete and a laccase producer. Its maximum enzyme activity is found in its stationary growth phase at about 360 h of culture (Téllez-Téllez *et al.* 2008); therefore, the production time of the enzyme is limiting. These enzymes are induced, and the transcription gene of laccases is regulated by different carbon and nitrogen sources (Bertrand *et al.* 2013). In strategies to increase production, inducers have been added to the culture medium of the fungus, such as 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Hou *et al.* 2004), ferulic acid (Yao *et al.* 2013), plant residues



CIBB-S5-P94

CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO LÍQUIDO PARA PRODUCCIÓN DE LACASAS DE *Pleurotus ostreatus*.

Grandes-Blanco, A.^{1,2}, Sánchez, C.¹, Téllez-Téllez, M.³, Santos-López, G.⁴, Tlecutli-Beristain, S.⁵, Díaz-Godínez, G.¹.

¹Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. E-mail: diazgo@hotmail.com

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

³Centro de investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México.

⁴Centro de Investigación Biomédica de Oriente/Instituto Mexicano del Seguro Social CIBIOR, Puebla, México.

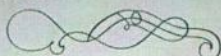
⁵Universidad Politécnica de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

Pleurotus ostreatus es un hongo de pudrición blanca de importancia por su potencial uso en procesos de biorremediación ya que es capaz de degradar compuestos xenobióticos y recalcitrantes, gracias a su sistema enzimático ligninolítico (lacasas, Mn-Peroxidasas, alcohol veratril oxidasas, principalmente) de carácter no específico, capaz de catalizar la oxidación y/o hidrólisis de estos y otros tipos de compuestos orgánicos. Estudios previos han determinado un medio para la producción de lacasas por este organismo. En el presente trabajo se caracterizó el cultivo de *P. ostreatus* en medio líquido para producir lacasas. Se realizó una fermentación líquida por triplicado, en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio de cultivo (glucosa, extracto de levadura, CuSO₄ y otras sales), inoculados con 3 pellets de 4 mm de diámetro de un precultivo en agar PDA, ajustando el pH inicial de 6.5 e incubados a 25°C en agitación orbital (120 rpm). Se tomaron muestras cada 24 h hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (552 h). Se determinó la velocidad específica $\mu = 0.022 \text{ h}^{-1}$, con una biomasa máxima de 5.76 g/L, a las 336 h, *P. ostreatus* entró a la fase estacionaria. La concentración máxima de proteína fue de 0.08 g/L a las 216 h, la máxima actividad de lacasa fue a las 432 h con 36490 U/L. Por zimografía se observó una lacasa constitutiva de aproximadamente 50 kDa.

Palabras Clave: *Pleurotus ostreatus*, isoformas, lacasa, fermentación.



La Universidad Politécnica de Tlaxcala



Otorga la presente

Constancia

a

Grandes-Blanco A., Sánchez-Minutti L., García-Barrientos R.,
Tlecuitl-Beristain S.

Por la exposición del cartel

"Caracterización de una fermentación de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido"
durante la Primera Semana de Biotecnología
celebrada del 22 al 24 de enero de 2014.

En el marco de los festejos del X Aniversario Institucional.

Dr. Saul Tlecuitl Beristain
Director del Programa Educativo de Ing. en Biotecnología

Dr. Eric Ortega Sánchez
Presidente de Academia



Tepeyanco, Tlax., a 24 de enero de 2014.



1^{er} Encuentro Nacional sobre Biología

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Otorga la presente
CONSTANCIA

A:

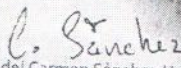
Grandes-Blanco, A, Díaz-Godínez, G, Sánchez, C, Téllez-Téllez, M, Santos-López, G, Tlecuítl-Berstein, S.


Por la presentación en cartel del trabajo:

CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO LÍQUIDO PARA PRODUCCIÓN DE LACASAS DE *Pleurotus ostreatus*.

en el "Primer Encuentro Nacional sobre Biología en la UATx",
celebrado en la ciudad de Tlaxcala, México los días 7-10 de diciembre de 2014.


Dr. Gerardo Díaz Godínez
Líder del Cuerpo Académico
de Biología


Dra. Ma. del Carmen Sánchez Hernández
Presidente del 1er Encuentro Nacional
sobre Biología


Dr. Rubén Díaz Godínez
Jefe del Laboratorio de Biología

