



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y  
BIOCATÁLISIS

*Caracterización de lacasas producidas por *Pleurotus ostreatus*  
y en co-cultivo con *Trichoderma viride*, en medio líquido*

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

***IBQ. CONTRERAS ORDÓÑEZ MARTHA ALICIA***

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Leobardo Serrano Carreón



CUERNAVACA, MORELOS 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Índice General

	Página
<b>Índice General</b> . . . . .	I
<b>Lista de Abreviaturas</b> . . . . .	IV
<b>Lista de Tablas</b> . . . . .	V
<b>Lista de Figuras</b> . . . . .	VI
<b>Resumen</b> . . . . .	
<b>1. Introducción</b> . . . . .	1
<b>2. Antecedentes</b> . . . . .	3
2.1 Biotecnología Ambiental . . . . .	3
2.2 Lacasas distribución y roles fisiológicos . . . . .	4
2.2.1 Estructura de lacasas . . . . .	5
2.2.2 Mecanismo de reacción de lacasas y sustratos . . . . .	8
2.2.3 Inhibidores . . . . .	10
2.2.4 Aplicación de lacasas . . . . .	11
2.2.5 Producción e inducción de lacasas en cultivos de hongos ligninolíticos . . . . .	13
2.2.6 <i>Trichoderma sp.</i> incrementa la producción de lacasas de hongos ligninolíticos . . . . .	15
2.2.7 Propiedades Bioquímicas . . . . .	17
<b>3. Justificación</b> . . . . .	20
<b>4. Hipótesis y Objetivos</b> . . . . .	21
<b>5. Materiales y Métodos</b> . . . . .	22
5.1 Materiales . . . . .	22
5.1.1 Microorganismos . . . . .	22
5.1.2 Inóculo de <i>Pleurotus ostreatus</i> . . . . .	22
5.1.3 Inóculo de <i>Trichoderma viride</i> . . . . .	23
5.1.4 Co-cultivos . . . . .	23
5.1.5 Producción de lacasas . . . . .	23
5.2 Métodos . . . . .	24
5.2.1 Obtención del extracto crudo de lacasas . . . . .	24
5.2.2 Biomasa . . . . .	24
5.2.3 Actividad de lacasa . . . . .	24
5.2.3.1. Ensayo de actividad con ABTS . . . . .	25
5.2.3.2. Ensayo de actividad con SGZ . . . . .	25

5.2.3.3. Ensayo de actividad con DMP . . . . .	26
5.2.3.4. Ensayo de actividad con GUAI . . . . .	27
5.2.4 Determinación de proteína . . . . .	27
5.2.5 Purificación . . . . .	28
5.2.5.1 Cromatografía de Intercambio Iónico . . . . .	28
5.2.5.2 Cromatografía de Exclusión Molecular . . . . .	28
5.2.5.3 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica . . . . .	29
5.2.6 Análisis de Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS . . . . .	29
5.2.6.1 Preparación del gel y de las muestras . . . . .	29
5.2.6.2 Condiciones de corrida . . . . .	30
5.2.6.3 Revelado de las bandas de proteína . . . . .	30
5.2.6.4 Geles de poliacrilamida en condiciones nativas . . . . .	30
5.2.7 Determinación del efecto del pH sobre la actividad enzimática . . . . .	31
5.2.8 Determinación del efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática . . . . .	31
5.2.9 Termoestabilidad . . . . .	31
5.2.10 Especificidad de sustrato . . . . .	32
<b>6. Resultados y Discusión . . . . .</b>	<b>33</b>
6.1 Crecimiento y Producción de Lacasa por <i>P. ostreatus</i> (200 rpm) . . . . .	33
6.2 Crecimiento y Producción de Lacasa por <i>P. ostreatus</i> (100 rpm) . . . . .	36
6.2.2 Actividad Específica . . . . .	38
6.3 Concentración del Extracto Crudo . . . . .	39
6.3.1 Ultrafiltración . . . . .	39
6.3.2 Análisis Electroforético . . . . .	40
6.3.2.1 Geles de Actividad . . . . .	40
6.3.3 Liofilización . . . . .	42
6.4 Purificación de las enzimas con actividad lacasa . . . . .	43
6.4.1 Cromatografía de Intercambio Iónico . . . . .	43
6.4.2 Cromatografía de Exclusión Molecular . . . . .	46
6.4.3 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica . . . . .	48
6.5 Co-Cultivos <i>P. ostreatus</i> - <i>T. viride</i> . . . . .	50
6.5.1 Cinética de Crecimiento de <i>P. ostreatus</i> - <i>T. viride</i> . . . . .	50
6.5.2 Producción de Lacasa . . . . .	51
6.5.2.1 Evaluación de la Actividad Enzimática . . . . .	51
6.5.3 Concentración del Extracto Crudo . . . . .	52
6.5.4 Análisis Electroforético . . . . .	52
6.5.5 Purificación . . . . .	53
6.6 Caracterización de las enzimas con actividad lacasa . . . . .	56
6.6.1 Perfil de pH . . . . .	56
6.6.2 Perfil de Temperatura. . . . .	58
6.6.3 Termoestabilidad . . . . .	60
6.6.4 Especificidad de Sustratos . . . . .	62
<b>Conclusiones . . . . .</b>	<b>65</b>
<b>Perspectivas . . . . .</b>	<b>66</b>
<b>7. Bibliografía . . . . .</b>	<b>67</b>

<b>Apéndice 1</b> Toxicidad de inductores . . . . .	A-1
<b>Apéndice 2</b> Curva estándar de BSA . . . . .	A-2
<b>Apéndice 3</b> Soluciones de trabajo para preparar geles de electroforesis . . . . .	A-3
<b>Apéndice 4</b> Actividad Volumétrica (200 y 100 rpm) . . . . .	A-5
<b>Apéndice 5</b> Ultrafiltración del extracto crudo de lacasa de <i>P. ostreatus</i> . . . . .	A-6
<b>Apéndice 6</b> Curva estándar de pesos moleculares . . . . .	A-7
<b>Apéndice 7</b> Actividades volumétricas de lacasa ( <i>P. ostreatus</i> – <i>T. viride</i> ) . . . . .	A-8
<b>Apéndice 8</b> Ultrafiltración y liofilización de lacasa ( <i>P. ostreatus</i> – <i>T. viride</i> ) . . . . .	A-9
<b>Apéndice 9</b> Perfiles de estabilidad térmica . . . . .	A-10
<b>Apéndice 10</b> Ajustes de las cinéticas (Michaelis-Menten) . . . . .	A-11

## Lista de Tablas

	<b>Página</b>
Tabla 2.1 Características de lacasas purificadas de Hongos . . . . .	18
Tabla 2.2 Características de isoenzimas de lacasas purificadas de <i>P. ostreatus</i> . . . . .	19
Tabla 5.1 Soluciones para geles de acrilamida . . . . .	30
Tabla 6.1 Resumen de la etapa de ultrafiltración del extracto crudo de lacasa de <i>P. ostreatus</i> . . . . .	40
Tabla 6.2 Resultados de la liofilización de la fracción (10-100 kDa) . . . . .	42
Tabla 6.3 Purificación de lcs1 y lcs2 ( DEAE ) . . . . .	45
Tabla 6.4 Purificación de lcs1 y lcs2 ( DEAE y SC ) . . . . .	48
Tabla 6.5 Resumen de las etapas de purificación de lcs1 y lcs2 ( DEAE, SC, HC ) . . . . .	49
Tabla 6.6 Resumen de las etapas de purificación de lcs3 . . . . .	56
Tabla 6.7 Tiempos de vida media de las enzimas (lcs1, lcs2 y lcs3) de <i>P. ostreatus</i> . . . . .	61
Tabla 6.8 Parámetros cinéticos de las enzimas lcs1, lcs2 y lcs3 . . . . .	63
Tabla 6.9 Comparación de Km de lcs1, lcs2 y lcs3 con otras lacasas fúngicas . . . . .	64
Tabla 6.10 Resumen de las propiedades determinadas de las enzimas lcs1, lcs2 y lcs3 . . . . .	64

## Lista de Figuras

	Página
Figura 2.1 Estructura de Lacasa . . . . .	6
Figura 2.2 Centro catalítico . . . . .	6
Figura 2.3 Ciclo catalítico de Lacasa . . . . .	8
Figura 2.4 Sustratos de Lacasa . . . . .	9
Figura 2.5 Mediadores de lacasa . . . . .	10
Figura 2.6 Sensor de lacasa . . . . .	12
Figura 5.1 Oxidación del ABTS . . . . .	25
Figura 5.2 Oxidación de SGZ . . . . .	26
Figura 5.3 Oxidación de DMP . . . . .	26
Figura 5.4 Oxidación de GUAI . . . . .	27
Figura 6.1 Cinética de producción de lacasa y crecimiento de <i>P. ostreatus</i> . (200 rpm) . . . . .	34
Figura 6.2 Cinética de producción de lacasa y crecimiento de <i>P. ostreatus</i> . (200 y 100 rpm) . . . . .	36
Figura 6.3 Actividad específica. (200 y 100 rpm) . . . . .	38
Figura 6.4 Gel Nativo PAGE . . . . .	41
Figura 6.5 Perfil de separación de la proteína producida por <i>P. ostreatus</i> ( DEAE ) . . . . .	43
Figura 6.6 Gel nativo PAGE ( DEAE ) . . . . .	45
Figura 6.7 Gel SDS-PAGE (10%) de las enzimas lcs1 y lcs2 ( DEAE ) . . . . .	46
Figura 6.8 Perfil de Absorbancia y Actividad Volumétrica de lcs1 y lcs2. ( SC ) . . . . .	47
Figura 6.9 Gel SDS-PAGE (10%) de las enzimas lcs1 y lcs2. ( DEAE,SC,HIC ) . . . . .	49
Figura 6.10 Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> y en co-cultivos ( <i>P. ostreatus</i> - <i>T. viride</i> ) . . . . .	50
Figura 6.11 Actividad Volumétrica de lacasa producida por <i>P. ostreatus</i> y en co cultivo con <i>T. viride</i> . . . . .	52
Figura 6.12 Gel nativo de poliacrilamida ( <i>P. ostreatus</i> – <i>T. viride</i> ) . . . . .	53
Figura 6.13 Perfil de separación de las enzimas con actividad lacasa producidas por <i>P. ostreatus</i> , en co-cultivo con <i>T. viride</i> ( DEAE ) . . . . .	54
Figura 6.14 Gel nativo ( DEAE ) . . . . .	55
Figura 6.15 Gel SDS PAGE (10%) de la enzima lcs3 . . . . .	55
Figura 6.16 Perfiles de pH de las enzimas lcs1, lcs2 y lcs3 . . . . .	57
Figura 6.17 Perfiles de Temperatura de enzimas lcs1, lcs2 y lcs3 . . . . .	59

## Lista de Abreviaturas

<b>A<sub>280</sub></b>	Absorbancia a 280 nm
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
<b>BSA</b>	Albúmina Sérica Bovina
<b>APS</b>	Persulfato de Amonio
<b>CV</b>	Volumen de Columna
<b><math>\epsilon</math></b>	Coefficiente de Extinción ( $M^{-1} cm^{-1}$ )
<b>DEAE</b>	Dietilaminoetil
<b>DMP</b>	2,6 Dimetoxifenol
<b>EDTA</b>	Acido etilendiaminotetraacético
<b>g</b>	Fuerza Centrifuga
<b>GUAI</b>	Guayacol
<b>HBT</b>	Hidroxibenzo-triazol
<b>HIC</b>	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>mA</b>	mili amperio
<b>PAGE</b>	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
<b>PAHs</b>	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
<b>pI</b>	Punto Isoeléctrico
<b>SC</b>	Cromatografía de Filtración en gel
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio
<b>SGZ</b>	Siringaldazina
<b>T1</b>	Tipo 1 (sitio de Cobre)
<b>T2</b>	Tipo 2 (sitio de Cobre)
<b>T3</b>	Tipo 3 (sitio de Cobre)
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis- Menten ( $\mu M$ )
<b>TRIS</b>	2-Amino-2-(hidroximetil)-1-3-propanediol
<b>U</b>	Unidades de Actividad Enzimática (cantidad de enzima que oxida 1 $\mu mol$ de sustrato por minuto)
<b>V</b>	Volts
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad Máxima ( $\mu mol L^{-1} min^{-1}$ )
<b>rpm</b>	Revoluciones por Minuto

## Resumen

Las lacasas son oxidasas azul multicobre que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos sustituidos, aminas aromáticas e incluso ciertos compuestos inorgánicos, usando el oxígeno molecular como aceptor de electrones. Esta versatilidad sobre sustratos hace a las lacasas sumamente interesantes en biotecnología. Las áreas de aplicación actuales y potenciales de las lacasas incluyen a la industria textil, farmacéutica, alimentaria, papelería y en la detoxificación de suelos y agua contaminados. En estas industrias la catálisis enzimática puede ser una alternativa ambientalmente menos dañina que los procesos químicos actualmente empleados\*. Diversas especies fúngicas producen varias isoenzimas de lacasas, debido a que presentan más de un gen que codifica para la proteína, por lo cual la regulación de la expresión de los genes es substancialmente diferente en las distintas especies. Algunas especies del hongo filamentoso *Trichoderma*, al infectar cultivos de hongos productores de lacasas, provocan el incremento en la producción de la enzima e incluso la inducción de algunas isoformas.

El objetivo de este proyecto fue purificar y caracterizar las lacasas producidas por *Pleurotus ostreatus* (cultivo axénico<sup>o</sup>) y en cultivos duales con *Trichoderma viride*.

En el extracto crudo del cultivo de *Pleurotus ostreatus* se detectaron dos bandas con actividad de lacasa. La presencia de *Trichoderma viride* no estimuló un incremento en la producción de la enzima, sin embargo, modificó una de las enzimas con actividad de lacasa. Las tres enzimas fueron purificadas mediante ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, permeación en gel e interacción hidrofóbica. Los pesos moleculares fueron estimados por SDS PAGE siendo de 44, 27 y 35 kDa para lcs1, lcs2 y lcs3 respectivamente. La caracterización bioquímica se realizó con sustratos fenólicos como los monoaromáticos Guayacol (GUAI) y 2-6 Dimetoxifenol (DMP) y Siringaldazina (SGZ), así como el no fenólico heterocíclico Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS). Se obtuvieron especificidades considerablemente diferentes, lcs1 y lcs3 mostraron una mayor afinidad sobre ABTS y SGZ. Además lcs3, debido al procesamiento al que fue sometida durante el co-cultivo, incrementó la afinidad por DMP y SGZ comparada con lcs1. La enzima lcs2 presentó valores más bajos de Km sobre DMP y SGZ. Los ensayos de estabilidad térmica indicaron que lcs1 y lcs3 presentan gran estabilidad a altas temperatura.

---

\* Uso dióxido de azufre en industria alimentaria-remoción de fenoles, peróxido de hidrógeno en industrial textil-blanqueo, ozonización de agua-degradación hidrocarburos aromáticos policíclicos.

<sup>o</sup> Cultivo que contiene solamente una especie microbiana.

## CAPÍTULO I

### Introducción

Las lacasas son enzimas oxido reductasas que pertenecen al grupo de las polifenol oxidasas. Son glicoproteínas que contienen generalmente cuatro átomos de cobre en su centro catalítico por lo cual son usualmente llamadas oxidasas multicobre. Las lacasas catalizan la oxidación de compuestos fenólicos, la cual es acompañada por la reducción de oxígeno para producir agua. Los grupos fenólicos son oxidados por la remoción de un electrón, generándose un radical libre, el cual puede ser oxidado de nuevo o experimentar una polimerización. El rango de sustratos que pueden ser oxidados es amplio y varía entre una lacasa y otra (Maheshwari *et al.*, 2000).

Las lacasas son producidas principalmente por plantas y hongos (Mayer y Staples, 2002), se ha establecido que en plantas participan en mecanismos involucrados en la formación de polímeros de lignina (Liu *et al.*, 1994), mientras que en hongos sus actividades están relacionadas con morfogénesis, defensa a estrés y degradación de lignina (Thurston, 1994).

La producción de lacasas por hongos ligninolíticos de los géneros *Trametes*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Pycnoporus* y *Agaricus* ha sido estudiada ampliamente por la facilidad con que estos microorganismos se cultivan y debido a que las enzimas son excretadas al medio de cultivo. Por otra parte, el estudio de la oxidación de compuestos aromáticos utilizando lacasas fúngicas ha ido en incremento, ya que representan una alternativa en el área de biorremediación de compuestos xenobióticos. Además, el uso de enzimas proporciona ventajas sobre los tratamientos físicos y químicos, entre las que encontramos la remoción específica de contaminantes, altas velocidades de reacción y reducción en los volúmenes de operación (Aitken, 1993).

Las lacasas extracelulares de hongos ligninolíticos se presentan en diferentes isoformas, las cuales pueden ser constitutivas o inducibles. Se ha reportado la producción diferencial de isoformas como resultado de la adición de compuestos fenólicos al medio de cultivo, encontrándose interesantes propiedades catalíticas en las distintas isoenzimas, tales como una gran estabilidad térmica, ausencia de inhibición por EDTA, así como la degradación de compuestos fenólicos sin la adición de mediadores (Farnet *et al.*, 2000).

La producción de lacasas fúngicas se ha visto fuertemente incrementada con modificaciones en la formulación y en la concentración de los componentes del medio, principalmente cobre (Palmieri *et al.*, 2000). Un aumento en la producción de lacasas también ha sido observado cuando se realizan co-cultivos de hongos productores de dichas enzimas con hongos del género *Trichoderma* (Baldrian, 2004; Hatvani *et al.*, 2002). Así mismo se ha reportado que existe una producción diferencial de isoformas de una misma cepa de *Trametes*, cuando se realiza la inducción por compuestos químicos o por la interacción biológica con *Trichoderma sp.* (Zhang *et al.*, 2006).

En nuestro laboratorio, se evaluó la producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus* CP-50 en co-cultivo con diferentes cepas de *Trichoderma sp.* Se encontró que la producción de lacasas de los co-cultivos, en medio agar-extracto de malta, no solo incrementó la actividad de la lacasa en tres sustratos diferentes, sino también se detectó la presencia de una isoforma ausente en el medio control (donde solo creció *Pleurotus ostreatus*). Si bien la sobreproducción de lacasas durante la interacción biológica, así como las diferentes isoformas (número de bandas) generadas por inducción química y/o biológica han sido reportadas, no existen estudios de la influencia de la interacción *Trichoderma*-hongos ligninolíticos sobre el perfil y el potencial catalítico de las isoformas de lacasas.

Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar el perfil de lacasas producidas por *Pleurotus ostreatus* CP-50 y durante los co-cultivos con *Trichoderma viride*, en medio líquido a base de extracto de malta, así como la caracterización cinética utilizando cuatro de los sustratos de lacasas más estudiados.

## **CAPÍTULO II**

### **Antecedentes**

#### **2.1 Biotecnología Ambiental**

Como consecuencia del desarrollo humano y tecnológico, en las últimas décadas nos hemos enfrentado a serios problemas de contaminación ambiental. Por lo cual, se ha buscado encontrar medidas efectivas que controlen los efectos nocivos provocados por la contaminación. La biotecnología ambiental ha surgido como una respuesta a muchos de los problemas de contaminación actual. De manera general, la biotecnología ambiental abarca diversas aplicaciones destinadas a reducir la contaminación. Con el fin de subsanar el daño al medio ambiente, se han desarrollado tecnologías con el uso de microorganismos así como enzimas para transformar contaminantes en compuestos no tóxicos.

Las enzimas al ser catalizadores biológicos y altamente eficientes presentan varias ventajas sobre los catalizadores químicos, los tratamientos físicos y los biológicos. Entre las que se encuentran su alta especificidad, su biodegradabilidad, alta velocidad de reacción, reducción del volumen de operación y no ser tóxicas.

En la remoción de contaminantes tanto de suelos como de agua, el uso de complejos enzimáticos ha permitido la biodegradación o disminución de la toxicidad de compuestos xenobióticos como plaguicidas, herbicidas, fenoles, así como hidrocarburos aromáticos. Los cuales son contaminantes con propiedades mutagénicas, tóxicas y cancerígenas que se encuentran presentes en aguas residuales de industrias del papel, petróleo, minera, colorantes, etc. (Karam y Nicell, 1996).

De las diversas enzimas que se han utilizado para realizar la degradación de compuestos aromáticos así como la remoción de metales, encontramos a las peroxidasas y a las polifenoloxidasas. Las peroxidasas son oxido-reductasas producidas por microorganismos y plantas. Catalizan una variedad de reacciones en presencia de peróxido de hidrógeno. Dentro de las polifenoloxidasas se encuentran las lacasas, las cuales para llevar a cabo su actividad requieren de oxígeno molecular y no utilizan coenzimas. Debido a su versatilidad para oxidar una amplia gama de sustratos, las lacasas son un grupo de enzimas con aplicaciones muy diversas tanto en la biotecnología ambiental como en otro tipo de industrias.

## 2.2 Lacasas: distribución y roles fisiológicos

Las lacasas son enzimas encontradas comúnmente en la naturaleza, se encuentran presentes en plantas y hongos así como en algunas bacterias e insectos. La primera lacasa fue obtenida de los exudados del árbol japonés de la laca *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883). Poco tiempo después fue aislada de hongos y caracterizada como enzima oxidasa que contiene metal (Bertrand, 1896). Aunque ha sido conocida desde hace tiempo, la lacasa atrajo la atención solo después del inicio de estudios de degradación enzimática de madera por hongos de la podredumbre blanca.

De las diversas proteínas que contienen cobre, la lacasa es la más ampliamente distribuida. En plantas, la lacasa ha sido identificada en árboles como el roble (*Quercus*), álamo (*Populus*) (Thurston, 1994), en manzana (*Malus*), papa (*Solanum tuberosum*), betabel (*Beta vulgaris*), esparrago (*Asparagus officinalis*) y otros vegetales (Levine, 1965). Las lacasas en plantas son proteínas constitutivas extracelulares y la mayoría están glicosiladas. Se han encontrado en el xilema y su actividad ha sido correlacionada con la lignificación ya que utilizan sustratos como el alcohol cumarílico, coniferílico y sinapílico, los cuales son precursores de la lignina (Ranocha, *et al.*, 1999). Además se les ha involucrado con la reconstitución de la pared celular en la regeneración de protoplastos (Liu *et al.*, 1994). La detección y purificación de lacasas de plantas frecuentemente resulta difícil debido a que el extracto crudo contiene diversas enzimas oxidativas que presentan actividad sobre diversos sustratos, lo cual podría explicar la limitada información de propiedades bioquímicas de lacasas de dicho origen.

Con respecto a las lacasas fúngicas, éstas forman un grupo más estudiado, debido a que han sido aisladas de diversas especies de hongos, principalmente de Ascomicetos, Deuteromicetos y Basidiomicetos. Los basidiomicetos ligninolíticos son los degradadores de lignina más eficientes y los más ampliamente estudiados. Las lacasas fúngicas son glicoproteínas y el papel fisiológico reportado es muy diverso. Las lacasas de *Trametes versicolor* participan en la biodegradación de la lignina oxidando principalmente las subunidades fenólicas de la lignina (Bourbonnais y Paice, 1990; Thurston, 1994). En *Cryphonectria parasitica* la lacasa mostró ser importante en el proceso de patogénesis del hongo hacia la nuez castaña (Mayer y Staples, 2002). En *Aspergillus nidulans* se ha relacionado la actividad de lacasa con la producción de pigmento en los conidios, ya que la depleción del gene *yA*\* provocó la ausencia de la coloración verde de las esporas (Aramayo y Timberlake, 1993).

---

\* Gene *yA* codifica para la fenol oxidasa y se acumula en los conidios.

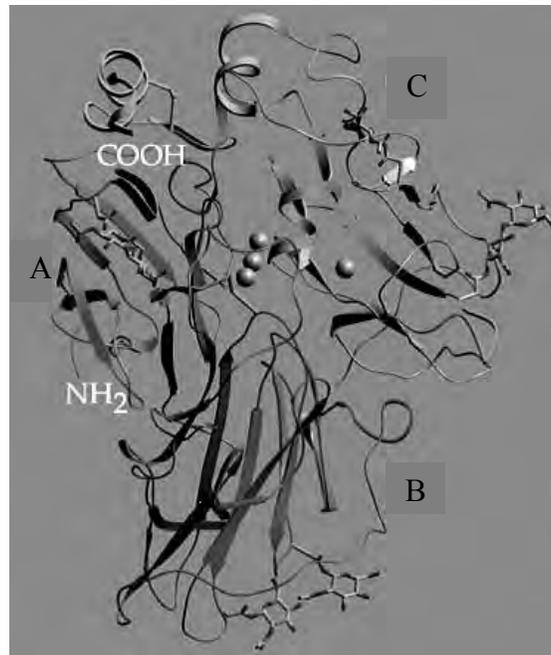
En hongos, las lacasas también han sido asociadas con el crecimiento y desarrollo del cuerpo fructífero. En *Aspergillus nidulans* se ha detectado actividad de lacasa en la formación del cuerpo fructífero y regulación durante la diferenciación de conidios (Hermann *et al.*, 1983). En *Agaricus bisporus* se ha reportado la oscilación de la actividad de lacasa relacionada con el ciclo de maduración del basidioma y actividad ligninolítica (Bonnen, *et al.*, 1994). En *Pleurotus florida* se encontró que una de las dos isoformas aisladas reguló el crecimiento y la formación del cuerpo fructífero (Das *et al.*, 1997) y en *Phlebia sp* con la diferenciación de micelio cenocítico o septado (White y Boddy, 1992). Otro rol con el cual se han relacionado es la detoxificación de fenoles (a través de su polimerización) generados como mecanismo de defensa por las plantas contra ataque fitopatogénico así como en la producción de melanina (Iakovlev y Stenlid, 2000). Entre las lacasas fúngicas más estudiadas se encuentran las producidas por los géneros *Agaricus*, *Ceriporiopsis*, *Coriolopsis*, *Lentinula*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Trametes*, (Baldrian, 2006).

Las lacasas fúngicas, al participar en el rompimiento de lignina, son principalmente extracelulares, aunque han sido encontradas intracelulares. Al cultivar *Trametes versicolor* en glucosa y paja de trigo, sintetizó lacasas tanto extra como intracelularmente (Schlosser *et al.*, 1997). La mayoría de la actividad enzimática fue producida extracelularmente 98% y 95% respectivamente.

### 2.2.1 Estructura de lacasas

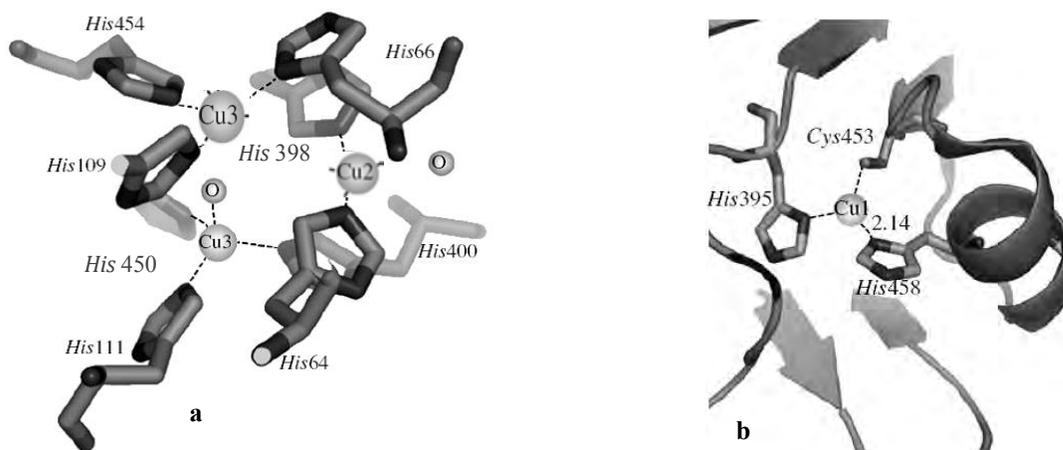
Las lacasas (p-difenol:dioxígeno óxido-reductasa E.C.1.10.3.2) presentan una estructura plegada que consta de tres dominios (A, B y C), con tamaños aproximadamente iguales (Ducros *et al.* 1998; Piontek *et al.*, 2002). Los tres dominios son importantes para la actividad catalítica de las lacasas. El sitio de unión al sustrato está localizado en una hendidura entre los dominios B y C, un centro mononuclear de cobre se encuentra localizado en el dominio C, y un centro trinuclear de cobre esta en la interface de los dominios A y C [**Figura 2.1**] (Piontek *et al.*, 2002).

El sitio catalítico presenta generalmente cuatro átomos de cobre, los cuales están distribuidos en tres sitios redox (T1, T2 y T3). El centro de cobre mononuclear contiene un átomo de cobre tipo 1 (T1) el cual está coordinado trigonalmente a dos histidinas y una cisteína [**Figura 2.2**]. El enlace entre el T1 y la cisteína es covalente y causa una fuerte absorción a 600 nm confiriendo a las lacasas su típica coloración azul (Solomon *et al.*, 1996).



**Figura 2.1.** Estructura de Lacasa de *Trametes versicolor* mostrando los tres dominios (A, B, C) y los cuatro sitios de cobre (esferas). (Tomada de Piontek *et al.*, 2002).

El cluster trinuclear contiene un átomo de cobre tipo 2 (T2) y un par de cobres tipo 3 (T3) y es donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno molecular a agua (Messerschmidt, 1997; Solomon *et al.*, 1996). El cobre T2 está coordinado por dos histidinas y los átomos de cobre T3 por seis\* (Piontek *et al.*, 2002) [Figura 2.2]. En sus estados oxidados los cobres T1 y T2 exhiben señales específicas en espectros de resonancia paramagnética de electrones (EPR). El par de cobres T3 no es paramagnético, pero puede ser detectado ya que emite señal a 330 nm (Andreasson y Reinhammar, 1979).



**Figura 2.2.** Centro catalítico de la estructura de Lacasa de *Cerrena maxima*, a) Cluster T2/T3, b) Cobre T1. (Tomada de Zhukhlistova *et al.* 2009).

\* Cada cobre T3 se encuentra coordinado por 3 histidinas.

Algunas lacasas no contienen cuatro átomos de cobre por molécula, al carecer del cobre T1 no presentan absorción alrededor de los 600 nm. Una isoenzima de *Pleurotus ostreatus* no presenta coloración azul por lo cual es denominada como “lacasa blanca”. Se determinó por absorción atómica que la lacasa presenta 1 átomo de cobre, 1 átomo de zinc y dos átomos de hierro (Palmieri *et al.*, 1997). Además se han reportado “lacasas amarillas”, sin embargo estas enzimas presentan un contenido similar de cobre que las azules. Se ha propuesto que las lacasas amarillas no mantienen sus centros de cobre en el estado oxidado, así como la unión de material fenólico de bajo peso molecular proveniente de la degradación de la lignina, contribuyendo esto a la coloración amarilla de la enzima. Sin embargo, lo anterior no ha sido verificado (Leontievsky *et al.*, 1997).

Las lacasas son codificadas por familias de genes relacionados estructuralmente. Típicamente la lacasa es una proteína de 500 a 600 aminoácidos. Se han clonado varios genes de lacasas entre las que se encuentran cinco de *Trametes villosa* (Yaver *et al.*, 1996) y *Trametes sanguinea* (Hoshida *et al.*, 2001) cuatro de *Rhizoctonia solani* (Wahleithmer, *et al.*, 1996) dos de *Agaricus bisporus* (Perry *et al.*, 1993) y *Pleurotus ostreatus* (Giardina *et al.*, 1995). Si bien el porcentaje de identidad entre las lacasas de hongos puede ser bajo existe alta conservación entre las regiones involucradas en la unión con cobre.

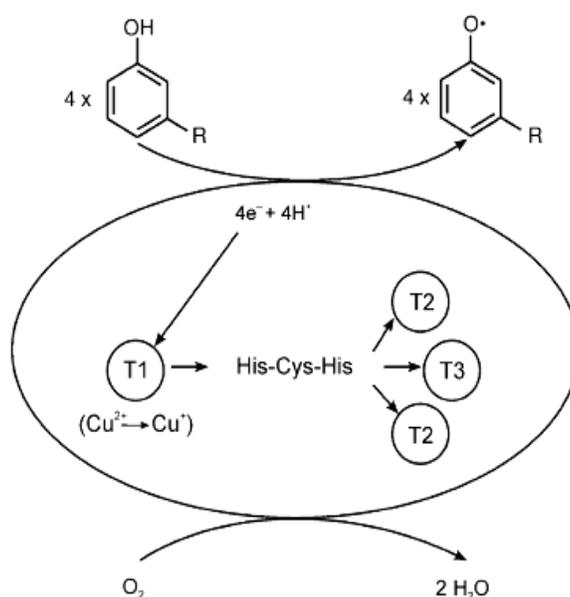
El peso molecular promedio de las lacasas extracelulares oscila entre 60 y 80 kDa. Como se mencionó anteriormente la mayoría de las lacasas fúngicas son glicoproteínas. El grado de glicosilación generalmente se encuentra entre el 10% y 25%, sin embargo se han reportado lacasas de *Coriopsis fulvocinnerea* con porcentaje del 32% (Shleev *et al.*, 2004) y en *Pleurotus pulmonarius* del 44% (Marques de Souza y Peralta, 2003). Por otro lado, un bajo grado de glicosilación se ha observado en lacasas de *Pleurotus eryngii* donde el contenido de azúcar para la lacasa I fue del 7% y para la lacasa II sólo del 1% (Muñoz *et al.*, 1997). Entre los sacáridos presentes se encuentran glucosa, arabinosa, xilosa, manosa y galactosa (Marbach *et al.*, 1984). Se ha propuesto que el grado de glicosilación puede participar en la protección de la enzima de la degradación proteolítica (Yoshitake *et al.*, 1993).

La mayoría de las lacasas son proteínas monoméricas, sin embargo existen reportes de enzimas con estructura homodimérica, como el caso de *Pleurotus pulmonarius* (Marques de Souza *et al.*, 2004) donde la proteína está formada por dos subunidades de 22.4 kDa y *Trametes villosa* del cual se purificaron dos isoenzimas diméricas de 63 kDa (Yaver *et al.*, 1996). Algunas especies producen lacasas oligoméricas, en *Monocillium indicum* una banda de actividad con una masa molecular

relativa de 100 kDa fue resuelta en tres proteínas de 24, 56 y 72 kDa (Thakker *et al.*, 1992) y Wood reportó que la lacasa de *Agaricus bisporus* consiste en varios polipéptidos de 21, 32, 45,52, 53 y 56 kDa al ser analizada con geles SDS-PAGE (Wood, 1980).

### 2.2.2 Mecanismo de reacción y sustratos de lacasas

El mecanismo de reacción de las lacasas se ha planteado de manera general, donde los sustratos son oxidados por el sitio I reduciéndose éste, y los electrones extraídos son transferidos al centro de cobre trinuclear T2/T3, para la reducción del oxígeno. La vía de transferencia de los electrones de T1 a T2/T3 se realiza través de un motivo tripéptido (His-Cys-His) altamente conservado (Garavaglia *et al.*, 2004) [Figura 2.3].

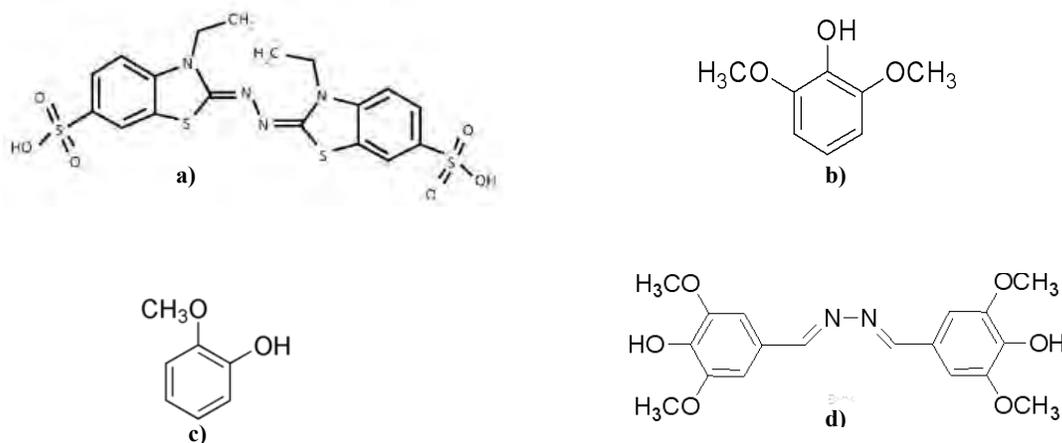


**Figura 2.3.** Ciclo catalítico de Lacasa.  
(Tomado de Baldrian, 2006)

Las lacasas catalizan la oxidación de difenoles y sustratos relacionados usando al oxígeno como aceptor final de electrones. Sin embargo, en contraste con la mayoría de las enzimas, las cuales son generalmente sustrato específicas, las lacasas actúan sobre un amplio intervalo de sustratos, incluyendo difenoles, polifenoles, diferentes fenoles sustituidos, diaminas, aminas aromáticas y benceno-tioles (Xu, 1996). En la oxidación del sustrato se generan radicales cationicos debido a la remoción de un electrón del núcleo aromático (Tien y Kirk, 1988). Se ha sugerido que el producto inicial al ser relativamente inestable puede presentar una segunda oxidación para formar quinonas, o

puede también ocurrir una reacción no enzimática tal como una hidratación o desprotonación, o podría participar en una reacción de polimerización (Thurston, 1994) [Figura 2.3].

Algunos de los sustratos más conocidos de las lacasas incluyen al no fenólico ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), monofenoles como el 2,6 dimetoxifenol (DMP), naftol, cresol y 2-metoxifenol (GUAI). Difenoles como el 4-Hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldehído hidrazina (SGZ), el cual se ha reportado como un sustrato específico de lacasa y con ello puede ser diferenciada la actividad de la lacasa de otras fenoloxidasas (Harkin *et al.*, 1974) [Figura 2.4].



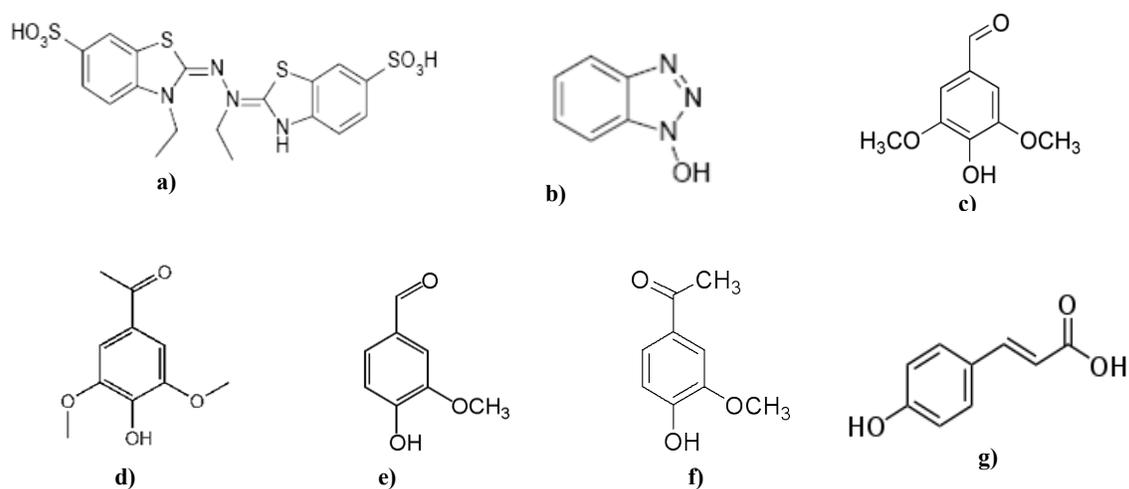
**Figura 2.4.** Sustratos comúnmente usados para determinar actividad de Lacasa.

a) Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico [ABTS], b) 2,6 Dimetoxifenol [DMP], c) 2-Metoxifenol (Guayacol) [GUAI], d) 4-Hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldehído hidrazina (Siringaldazina) [SGZ]

Para que un compuesto químico sea sustrato de las lacasas dependerá de dos factores básicamente. Primero que el sustrato pueda acoplarse a la vecindad del sitio T1, lo cual está determinado principalmente por la naturaleza y posición de los sustituyentes del anillo fenólico, especialmente de aquellos con cadenas muy voluminosas (Xu, 1996; Bertrand *et al.*, 2002). Segundo que el potencial redox ( $E_0$ ) sea lo suficientemente bajo, debido a que se ha observado que la velocidad de la reacción dependerá de la diferencia entre los potenciales redox de la enzima y del sustrato ( $\Delta E_0$  [lacasa-sustrato]). El potencial redox del sustrato está determinado por su estructura química y los diferentes sustituyentes, los cuales tendrán diferente impacto en  $E_0$  [sustrato] dependiendo de su tendencia a donar electrones. Los potenciales redox de las lacasas varían de 0.4 a 0.8 V y el factor más crítico determinante del  $\Delta E_0$  [lacasa] es la coordinación del cobre T1 (Xu, 1996; Xu *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000).

Por lo anterior, algunos sustratos de interés no pueden ser oxidados directamente por las lacasas, ya sea por ser demasiado grandes para penetrar al sitio activo de la enzima o debido al alto potencial

redox que presentan. Esta limitación ha logrado superarse con la adición de ciertos compuestos químicos, los cuales son compuestos de bajo peso molecular que pueden actuar como mediadores redox\*. Una vez que el mediador es oxidado por la lacasa, difunde del centro catalítico y oxida al sustrato. La adición de ABTS y Hidroxibenzo-triazol (HBT) ha sido utilizada para la oxidación de diferentes compuestos xenobióticos (Bourbonnais *et al.*, 1997; D' Acunzo *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2003). Camarero *et al.*, (2005) realizaron una selección de 10 compuestos fenólicos derivados naturales de la lignina, encontrándose que el siringaldehído, acetosiringona, vainillina, acetovainillona y ácido p-cumárico fueron mediadores más efectivos para la decoloración de reactivo negro 5 usando lacasas de *Pycnoporus cinnabarinus* y *Trametes villosa* [Figura 2.5].



**Figura 2.5.** Mediadores de lacasa.

a) ABTS, b) Hidroxibenzo-triazol (HBT), c) 3,5-Dimetoxi-4-hidroxibenzeno carbonal (Siringaldehído), d) 4'-Hidroxi-3',5'-dimetoxi acetofenona (Acetosiringona), e) 4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído (Vainillina), f) 4'-Hidroxi-3'-metoxi acetofenona (Acetovainillona), g) Ácido 4-Hidroxi cinámico (Ac p-cumárico).

### 2.2.3 Inhibidores

Diversos compuestos han sido descritos como inhibidores de lacasas, principalmente pequeños iones como azida, fluoruro, cianuro e hidróxido son fuertes inhibidores, los cuales se unen al sitio T2, bloqueando la transferencia interna de electrones (Johannes y Majcherczyk, 2000). El EDTA, ácido tioglicólico y la dimetil glioxima han mostrado inhibición de la actividad al ser agentes quelantes del cobre (Chefetz *et al.*, 1998). Los iones metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) y detergentes catiónicos de amonio cuaternario resultan inhibidores al estar involucrados con modificación de residuos de aminoácidos o cambios conformacionales (Gianfreda *et al.*, 1999, Zavarzina *et al.*, 2004). Muchos

\* El mediador actúa como un “transportador de electrones” entre la enzima y el sustrato.

compuestos que contienen sulfidrilos, tales como la L-cisteína, el ácido tioglicólico y ditriotritol se han considerado inhibidores de lacasa. Sin embargo, cuando el efecto de inhibición se ha estudiado por medio del consumo de oxígeno en lugar de medidas de absorbancia, se encontró que la inhibición observada fue causada por la reducción del sustrato por los compuestos sulfidrilos y no por inhibición de la enzima (Johannes y Majcherczyk, 2000).

#### 2.2.4 Aplicación de lacasas

Las reacciones de oxidación son ampliamente utilizadas en procesos industriales, por ejemplo en industrias como la textil, alimentaria, procesamiento de madera, farmacéutica y química. Actualmente muchos de los métodos utilizados son económica y ambientalmente poco convenientes, debido a que se producen reacciones secundarias no deseables y los oxidantes y catalizadores empleados suelen ser tóxicos. De tal manera que la oxidación enzimática es una alternativa a los métodos químicos, al ser las enzimas catalizadores biodegradables muy eficientes y específicos; además las reacciones enzimáticas se llevan a cabo en condiciones no severas.

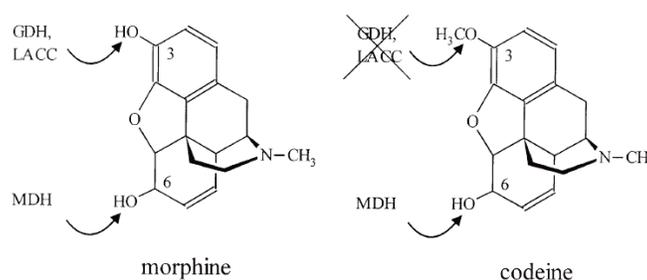
La transformación de fenoles y aminas aromáticas mediante la acción de peroxidasas o lacasas, es probablemente uno de los procesos enzimáticos más estudiados en el área de tratamiento de desechos. Tanto las peroxidasas como las lacasas de hongos ligninolíticos tienen un elevado potencial de aplicación ambiental por su facilidad de separación, purificación y producción en biorreactores, facilitando su producción a gran escala (Ikehata *et al.*, 2004).

Las lacasas ofrecen varias ventajas de gran interés para aplicaciones biotecnológicas. Al presentar una baja especificidad de sustrato son capaces de oxidar un amplio rango de compuestos xenobióticos. Además, a diferencia de las peroxidasas, no requieren la adición o síntesis del peróxido de hidrógeno que puede inactivar a la enzima, utilizando el oxígeno como aceptor de electrones, el cual usualmente se encuentra presente en su medio ambiente.

Una aplicación potencial de las lacasas es en el área ambiental, donde las propiedades catalíticas de éstas han sido utilizadas para oxidar diversos contaminantes orgánicos. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) junto con otros compuestos xenobióticos son la fuente principal de la contaminación del suelo, por lo cual su degradación es de gran importancia. Lacasas de *Trametes versicolor* y de *Coriolopsis gallica* lograron oxidar PAHs en presencia de mediadores químicos como el HBT y ABTS (Collins *et al.*, 1996; Johannes *et al.*, 1998; Majcherczyk *et al.*, 1998,

Pickard *et al.*, 1999). Otros compuestos que las lacasas han sido capaces de oxidar son compuestos fenólicos clorados (Bollag *et al.*, 2003), colorantes sintéticos y pesticidas (Torres *et al.*, 2003). Además la enzima fue capaz de mediar el acoplamiento de metabolitos reducidos de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) a una matriz orgánica y con ello detoxificar residuos de explosivos (Durán y Esposito, 2000).

Debido a que las lacasas catalizan reacciones de transferencia de electrones sin la adición de cofactores, su uso ha sido estudiado en la elaboración de biosensores. En la industria farmacéutica los biosensores enzimáticos permiten la identificación de morfina y distinguirla de codeína\* (Bauer *et al.*, 1999) [Figura 2.6]. También se ha logrado detectar con los biosensores varios compuestos fenólicos, oxígeno, azidas, catecolaminas o flavonoides (Rodríguez y Toca, 2006).



**Figura 2.6.** Selectividad del sensor de lacasa (LACC/GDH).  
Lacasa (LACC), Glucosa deshidrogenasa (GDH), Morfina deshidrogenasa (MDH).  
(Tomado de Bauer *et al.*, 1999).

La lacasa también es empleada en la industria alimentaria para modificar la apariencia y el color de algunas bebidas y alimentos. En este sentido, la aplicación de las lacasas involucra la eliminación de compuestos fenólicos responsables del oscurecimiento y formación de turbidez en jugos, cervezas y vino (Gianfreda *et al.*, 1999).

En cuanto a la producción de etanol, el metabolismo de los microorganismos empleados en la síntesis del alcohol llega a ser inhibido por compuestos fenólicos presentes en los hidrolizados lignocelulósicos utilizados. Por lo cual la lacasa ha sido expresada en *Saccharomyces cerevisiae* y con ello lograr la resistencia de los microorganismos y así resolver esta inhibición (Mayer y Staples, 2002).

Dentro de la industria textil el uso de la lacasa está creciendo muy rápidamente, ya que además de decolorar los efluentes, la enzima es utilizada para el blanqueo de telas sustituyendo el uso de hipoclorito y en la síntesis de colorantes azo (Setti *et al.*, 1999).

\* La lacasa oxida la morfina pero no puede convertir la codeína. La morfina deshidrogenasa oxida tanto a la morfina como a la codeína.

Otro campo donde la lacasa ha sido empleada es en la industria cosmética, donde se han desarrollado tintes los cuales resultan menos irritantes y más fáciles de manejar que los convencionales, debido a que la lacasa reemplaza el peróxido como agente oxidante en la formulación (Lang y Cotteret, 1999). También se ha empleado en preparaciones cosméticas y dermatológicas para aclarar la piel (Golz-Berner *et al.*, 2004).

### **2.2.5 Producción e inducción de lacasas en cultivos de hongos ligninolíticos**

La producción de lacasas por hongos ligninolíticos ha sido ampliamente estudiada, debido a la capacidad de estos microorganismos para crecer en sustratos económicos, excretar las enzimas y su potencial en la oxidación de compuestos xenobióticos (Ikehata *et al.*, 2004). Las lacasas extracelulares en basidiomicetos son producidas constitutivamente en pequeñas cantidades; sin embargo su producción puede ser considerablemente incrementada por diversas sustancias químicas y compuestos aromáticos.

Entre los inductores químicos que se han estudiado se encuentra el cobre, el cual al ser añadido al medio produce incrementos entre siete y treinta veces con respecto al control (Klonowska *et al.*, 2001, Giardina *et al.*, 1999). Dentro de los compuestos aromáticos están el ácido ferúlico, la vainillina, p-anisidina, orcinol, p-toludina, xilidina, ácido veratrico y guayacol, cuyo suplemento aumenta hasta treinta veces la producción de la lacasa (Marques de Souza *et al.*, 2004; Gianfreda *et al.*, 1999). Además de la adición de inductores químicos, la producción de lacasas resulta ser estimulada por diferentes condiciones de cultivo. Particularmente se ha evaluado la limitación nutricional de carbono y nitrógeno (Kirk y Ferell, 1987).

Una característica importante de la lacasa es que está codificada por una familia de genes, por lo cual es producida en forma de múltiples isoenzimas. Se ha probado que los genes que codifican las isoformas son regulados diferencialmente (Soden y Dobson, 2001). Varias isoformas han sido detectadas en muchas especies fúngicas. Blaich y Esser (1975) realizaron un “screening” de la actividad de varios hongos de la podredumbre blanca. Las diferentes especies examinadas fueron *Coprinus plicatilis*, *Leptoporus litschaueri*, *Pleurotus corticatus*, *P. ostreatus*, *Trametes gibbosa* y *T. versicolor*, las cuales exhibieron la producción de más de una isoenzima. Por lo anterior, al incrementar la producción de la lacasa mediante la adición de inductores químicos, no solo se obtiene una variación en la actividad, también se regula la secreción de la lacasa, mediante la inducción de diferentes isoformas.

La inducción de algunas isoformas se ha realizado mediante compuestos aromáticos relacionados con la lignina, tales como la lignina Kraft, xilidina, alcohol veratrílico, entre otros (Gianfreda *et al.*, 1999; Dekker *et al.*, 2001). Se ha reportado que el uso de ácido ferúlico y vainillina no solo incrementa la producción de lacasas por *Pleurotus pulmonaris*, sino que también se observó que las isoformas lac 1 y lac 2 son producidas en cultivos basales y con la adición de los compuestos se induce lac 3 y lac 2 continúa presentándose (Marques de Souza *et al.*, 2004). Klonowska *et al.*, (2001) demostraron que *Marasmius quercophilus* produce una sola lacasa en medio líquido a base de extracto de malta, sin embargo cuando se adiciona  $\text{CuSO}_4$  se producen tres isoenzimas.

Con respecto a las cepas del hongo *Pleurotus ostreatus* se ha reportado que produce al menos ocho diferentes isoenzimas de lacasa, seis de las cuales han sido aisladas y caracterizadas (Palmieri *et al.*, 1993, 1997, 2003; Giardina *et al.*, 1999). La principal proteína presente en los medios de cultivo fue POXC con un peso de 59 kDa y un pI de 2.9. Las isoenzimas POXA3a y POXA3b exhibieron pesos moleculares similares alrededor de 85 kDa, mientras POXA1b, POXA1w y POXA2 son más pequeñas (aproximadamente 65 kDa). Palmieri *et al.*, (2003) reportaron que la producción de isoenzimas de lacasas en la cepa de *P. ostreatus* estudiada, está regulada por la presencia de cobre ya que dos isoenzimas (POXA3a y POXA3b) fueron detectadas solamente con la adición de este metal. Por otra parte, aunque POXC es la proteína más abundante en los cultivos tanto extracelular como intracelularmente, la mayor producción de RNAm detectado fue para POXA1b, la cual es probablemente una proteína intracelular o bien asociada a la pared celular y es degradada por una proteasa extracelular (Palmieri *et al.*, 1997).

El cambio en el perfil de las lacasas producidas al suplementar el medio con compuestos fenólicos se ha propuesto como un mecanismo de detoxificación del microorganismo en presencia de tales compuestos (Marques de Souza *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha observado que las isoenzimas que son sintetizadas en presencia de algunos compuestos fenólicos presentan características más ventajosas que algunas de las sintetizadas constitutivamente. Como es el caso de cuatro isoenzimas inducidas de una cepa de *Marasmius quercophilus* (Farnet *et al.*, 2000) donde al determinar las propiedades catalíticas, una de las isoformas exhibió mayor estabilidad térmica a 40°C. Además esa isoenzima no mostró inhibición en presencia de EDTA y catalizó la degradación de clorofenoles sin la adición de mediadores. En el estudio realizado por Lorenzo *et al.*, (2005) con una cepa de *Trametes versicolor* donde se efectuó inducción con fibra de cebada, se encontraron dos isoformas denominadas LacI y LacII. Se cuantificó mayor actividad de LacII, además esta isoenzima exhibió

resistencia a la presencia de  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , que son generalmente inhibidores de la actividad de lacasas.

Por lo anterior la composición y tipo de medio de cultivo así como el uso de inductores, representan un papel importante en la productividad y perfil de las lacasas.

### **2.2.6 *Trichoderma spp.* incrementan la producción de lacasas de hongos ligninolíticos**

Si bien la inducción química ha sido una estrategia eficiente para lograr un incremento en la producción de las lacasas así como en la modificación del perfil de isoformas, este método puede resultar un poco inseguro, debido al tipo de inductores utilizados, ya que debido a sus propiedades físicas son compuestos tóxicos [Apéndice 1]. Por lo anterior, se han buscado alternativas que permitan desarrollar estrategias más seguras y a costos más bajos. Con respecto a esto, se ha reportado el uso de la inducción biológica para incrementar la producción de las lacasas. Este método se basa en co-cultivos de hongos productores de lacasa con el hongo del género *Trichoderma*\* y/o bacterias. Con este tipo de estrategia se ha obtenido un incremento en la producción de lacasas sintetizadas por *Lentinula edodes* y *Pleurotus spp.* en cultivos líquidos infectados con *Trichoderma* (Savoie *et al.*, 1998; Mata *et al.*, 2005; Hatvani *et al.*, 2002). Baldrian (2004) reportó el incremento en la producción de lacasas en co-cultivo en medio sólido, de 18 cepas diferentes de hongos ligninolíticos con una cepa de *Trichoderma harzianum*. Si bien con este tipo de interacción se han presentado los mayores incrementos de actividad, la adición del sobrenadante donde creció *Trichoderma* al cultivo del hongo ligninolítico ha permitido también aumento en producción de lacasa.

Sin embargo, existen reportes en los cuales se indica que solo con un tipo de interacción (co-cultivos o sobrenadante) se logra obtener un incremento en la producción de la lacasa. Durante los co-cultivos de *Lentinula* con diferentes cepas de *Trichoderma* los resultados mostraron una represión de lacasas, obteniéndose una mayor producción solo con los sobrenadantes de *Trichoderma* (Hatvani *et al.*, 2002). Caso contrario fue el co-cultivo de *Trametes versicolor-Trichoderma* donde sólo en los co-cultivos se incrementó la producción de lacasas y no con el uso de sobrenadantes de *Trichoderma*° (Baldrian 2004).

---

\* Algunas especies del hongo filamentosos *Trichoderma* son antagonistas que causan grandes pérdidas en la producción de hongos comestibles.

° Estos hongos pueden ser demasiado agresivos para algunos basidiomicetos ya que producen diversas enzimas (quitinasas y glucanasas) involucradas en la degradación de la pared celular de hongos.

Se ha propuesto que el incremento obtenido en la producción de la lacasa durante la interacción con *Trichoderma* se debe a un mecanismo de defensa del hongo productor de la enzima contra *Trichoderma*, ya que algunas de sus cepas son micoparásitarias agresivas de los cultivos de hongos ligninolíticos comestibles (*Pleurotus*, *Agaricus* y *Lentinula*) (Savoie y Mata, 1999). Lo anterior surge debido a lo observado al realizar co-cultivos en medio sólido, donde el hongo productor de la lacasa produce una hifa emergente en la zona de contacto entre las hifas de ambos hongos, la cual se acompaña de un pigmento de color café. Al evaluar la actividad de lacasa, en dicha zona, se obtiene una sobreproducción de la enzima. Se ha reportado que existe un incremento de la actividad polifenoloxidasa en el hongo *Lentinula edodes* y esto es inducido por el daño micelial causado por metabolitos *Trichoderma* (Tokimoto 1980, 1982). Por otra parte, la represión de la lacasa observada en algunos co-cultivos se ha tratado de explicar por medio de una sobreproducción de enzimas hidrolíticas por *Trichoderma* sp (Hatvani *et al.*, 2002). Con los resultados reportados se observa la importancia del tipo de interacción (por micoparasitismo o a través de metabolitos extracelulares) *Trichoderma*-hospedero en el incremento de la producción de las lacasas.

Con respecto al perfil de isoformas, se ha comparado la inducción química (lignina Kraft o toludina) y la inducción biológica (*Trametes* - *Trichoderma* sp) encontrándose que se genera una isoforma (LacC) en la inducción biológica distinta a las dos obtenidas con la adición de los compuestos aromáticos. Además existe una represión de una de las dos isoformas inducidas químicamente. Por otra parte, la isoenzima LacC resultó ser más estable a pH 4.0-8.0 y a 60°C (Zhang *et al.*, 2006). En la interacción de *Lentinula edodes* y *Trichoderma* sp, se observó que *Trichoderma* indujo cambios en el patrón de las isoenzimas. Sin embargo, el cambio fue sobre la proteína ya sintetizada y no un efecto de inducción de una nueva isoforma o la liberación de una lacasa intracelular. Debido a que el cambio en el patrón de isoformas se observó tanto en ausencia como en presencia del micelio activo de *L. edodes*, con diferencias en la intensidad del color de las bandas. Proponiéndose que el cambio en la lacasa fue a través de la acción de proteasas provocando solo una pequeña disminución en la actividad de la proteína (Savoie *et al.*, 1998).

Una de las ventajas reportadas al realizar la inducción biológica sobre la química, es que la síntesis de la lacasa se produjo más rápido\* cuando *Pleurotus ostreatus* fue cultivado con *Trichoderma longibrachiatum* (Velázquez-Cedeño, 2004). Una característica observada durante la inducción química es que la lacasa puede perder actividad súbitamente. Sin embargo, durante los co-cultivos se ha mantenido entre un 60 y 70% de su actividad máxima (Velázquez-Cedeño, 2007; Zhang *et al.*,

---

\* La síntesis de la lacasa se realizó en la mitad del tiempo requerido en el cultivo axénico.

2006). Esta estabilidad obtenida con interacción biológica resulta importante para su aplicación industrial o ambiental.

En nuestro grupo se realizó un estudio con la cepa de *Pleurotus ostreatus* CP-50 en co-cultivo con cepas de *Trichoderma*. El análisis se llevó a cabo en medio sólido con extracto de malta, observándose un incremento en la actividad en la zona de contacto *Pleurotus ostreatus*-*Trichoderma*. Tal incremento se vio favorecido al ser evaluada la actividad con tres diferentes sustratos (ABTS, DMP y SGZ). Otro dato interesante, fue el obtenido con geles de poli(acrilamida) en condiciones no desnaturalizantes, donde se detectó la presencia de una isoforma, no encontrada en el medio control de *Pleurotus ostreatus*. Además, en los geles de actividad con extractos obtenidos de los cultivos de *Trichoderma sp.* no se detectó actividad de lacasa.

### 2.2.7 Propiedades Bioquímicas

Se ha evaluado la oxidación de diversos sustratos por lacasas fúngicas, sin embargo las constantes catalíticas han sido reportadas principalmente para un pequeño grupo de sustratos – ABTS, DMP, GUAI y SGZ-. La constante de Michaelis-Menten,  $K_m$ , es un parámetro que refleja la afinidad de una enzima por un sustrato y permite describir cuantitativamente la acción catalítica de la enzima. Esta constante ha sido determinada para diversas lacasas y se ha observado una gran variación entre ellas. Los valores de  $K_m$  se encuentran en un intervalo muy amplio, con lo cual se puede inferir que existen diferentes propiedades catalíticas de estas enzimas. Dichas diferencias dependerán del origen de la enzima y del sustrato evaluado. Los valores más bajos de  $K_m$  se han obtenido con Siringaldazina, el cual es un dímero de 2 moléculas de 2,6 dimetoxifenol unido por un puente de azida. Donde el puente de azida o la forma dimérica parecen beneficiar la afinidad de las lacasas sobre la SGZ, ya que los valores de  $K_m$  obtenidos para el monómero (DMP) son generalmente mayores a los obtenidos con SGZ [Tabla 2.1]. Por su parte la especificidad por el oxígeno es menos dependiente de la enzima, y los valores de  $K_m$  se han reportado entre 20 y 50  $\mu\text{M}$  para diferentes lacasas (Yaver *et al.*, 1999; Xu, 2001; Xu *et al.*, 1996).

Además de las constantes cinéticas, el desempeño catalítico de las lacasas suele ser descrito por su actividad y estabilidad a diferentes condiciones de temperatura y pH. El perfil de actividad con respecto al pH frecuentemente es en forma de campana con un óptimo entre 4-6, cuando es evaluado con sustratos fenólicos (Hoffmann y Esser, 1977; Palmieri *et al.*, 1993; Eggert *et al.*,

1996; Xu, 1997; Chefetz *et al.*, 1998; Garzillo *et al.*, 2001). La disminución de la actividad a valores de pH neutros o alcalinos se debe al incremento en la concentración de iones hidróxido causando inhibición. Sin embargo, al incrementar el pH, disminuye el potencial redox del sustrato fenólico, lo cual hace al sustrato más susceptible a la oxidación por la lacasa (Xu, 1997). Por lo cual, el perfil de pH en forma de campana es el resultado de dos efectos opuestos, el incremento en el  $\Delta E_0$  [lacasa-sustrato] y la inhibición por el ion hidroxilo. Con respecto a los sustratos no fenólicos como el ABTS, los cuales no involucran intercambio de protones, las mayores actividades se obtienen a valores de pH entre 2 y 3 y se presenta una disminución en la actividad al incrementar el pH (Hoffmann y Esser, 1977; Xu, 1997; Garzillo *et al.*, 2001).

**Tabla 2.1. Características de lacasas purificadas de Hongos**

Característica	n	Min	Max	Lacasa
PM (kDa)	103	43	383	<i>Agaricus bisporus</i>
pI	67	2.6	6.9	<i>Agaricus blazei</i>
Temperatura (°C)	39	25	80	<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>
pH				<i>Chaetomium termophilum</i>
ABTS	49	2.0	5.0	<i>Chalara paradoxa</i>
DMP	36	3.0	8.0	<i>Coniothyrium minitans</i>
GUAI	24	3.0	7.0	<i>Coprinus cinereus</i>
SGZ	31	3.5	7.0	<i>Coriolipsis rigida</i>
Km ( $\mu$ M)				<i>Daedalea quercina</i>
ABTS	36	4	770	<i>Lentinula edodes</i>
DMP	30	26	14 720	<i>Marasmius quercophilus</i>
GUAI	23	4	3 000	<i>Phellinus ribis</i>
SGZ	21	3	4 307	<i>Pleurotus eryngii</i>
kcat ( $s^{-1}$ )				<i>Pleurotus florida</i>
ABTS	12	198	350 000	<i>Pleurotus ostreatus</i>
DMP	12	100	360 000	<i>Pleurotus pulmonarius</i>
GUAI	10	90	10 800	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
SGZ	4	16 800	28 000	<i>Rigidoporus lignosus</i>
				<i>Thelephora terrestris</i>
				<i>Trametes gallica</i>
				<i>Trametes versicolor</i>
				<i>Volvariella volcea</i>

n: Número de enzimas. Min: Valor Mínimo Reportado. Max: Valor Máximo Reportado  
Baldrian, Petr. *FEMS Microbiology Reviews* **30** (2), 215-242. 2006

La estabilidad de las lacasas con respecto a la temperatura varía considerablemente dependiendo del origen de la enzima. Sin embargo, las lacasas son estables entre 30 y 50°C y pierden rápidamente actividad a temperaturas superiores a 70°C. Las lacasas más termoestables han sido aisladas de bacterias. Con respecto a las lacasas fúngicas a altas temperaturas, la vida media a 70°C se encuentra por debajo de una hora y menos de 10 minutos a los 80°C (Wood, 1980; Xu *et al.*, 1996; Chefetz *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2002).

La variabilidad en las propiedades catalíticas y físicas de las lacasas no solo es función de la cepa productora. También se han reportado diferencias para las diversas isoformas aisladas de un mismo género, así como para un mismo hongo (Palmieri *et al.*, 1993, 1997, 2003; Giardina *et al.*, 1999). En la **tabla 2.2** se agruparon las características de las isoenzimas purificadas para una misma cepa de *Pleurotus ostreatus*.

**Tabla 2.2. Características de isoenzimas de lacasas purificadas de *Pleurotus ostreatus*.**

LACASA	PM (kDa)	pI	pH (Actividad Máxima)			
			ABTS	DMP	GUAI	SGZ
<i>P. ostreatus</i> RK36	67	3.6	----	----	----	5.8
<i>POXA</i> 1b	62	6.9	3.0	4.5	----	6.0
<i>POXA</i> 1w	61	6.7	3.0	3.0-5.0	NA	6.0
<i>POXA</i> 2	67	4.0	3.0	6.5	6.0	6.0
<i>POXA</i> 3a	85	4.1	3.6	5.5	6.2	---
<i>POXA</i> 3b	83	4.3	3.6	5.5	6.2	---
<i>POXC</i>	59	2.9	3.0	3.0-5.0	6.0	6.0
	Temperatura (°C) (Actividad Máxima)	Km (µM)				
		ABTS	DMP	GUAI	SGZ	
<i>P. ostreatus</i> RK36	50	---	-----	----	----	
<i>POXA</i> 1b	---	370	260	----	----	
<i>POXA</i> 1w	45-65	90	2,100	NA	45-65	
<i>POXA</i> 2	25-35	120	740	3,100	25-35	
<i>POXA</i> 3a	35	70	14,000	----	35	
<i>POXA</i> 3b	35	74	8,800	----	35	
<i>POXC</i>	50-60	280	230	1,200	50-60	

NA: No Activa. Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), 2,6-dimetoxifenol (DMP), Guayacol (GUAI), 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldehído hidrazina (SGZ).

Baldrian, Petr. *FEMS Microbiology Reviews* **30** (2), 215-242. 2006

## CAPÍTULO III

### Justificación

Las lacasas han llamado la atención debido a la amplia variedad de compuestos fenólicos que oxidan. Hasta ahora se han purificado y caracterizado un gran número de lacasas fúngicas y se observa que existe una considerable heterogeneidad en las propiedades físico-químicas y catalíticas de estas enzimas. Las diferencias entre las isoformas se presentan en el peso molecular, grado de glicosilación y especialmente con respecto a su estabilidad térmica, tolerancia a inhibidores y mayor actividad sobre algunos sustratos. Siendo éstas propiedades características ventajosas de unas isoenzimas sobre otras. Permitiendo que con dichas propiedades el uso de isoenzimas específicas en los diversos campos de aplicación, resulte más eficiente.

Por otro lado, hasta ahora la mayoría de las isoformas caracterizadas son procedentes de modificaciones en el medio de cultivo o bien de la adición de ciertos inductores. Sobre la interacción de distintas cepas productoras de lacasas con *Trichoderma* sp. se ha reportado incremento en la producción de lacasa y la modificación en el perfil de isoenzimas, sin embargo no se han caracterizado bioquímicamente las isoformas modificadas o inducidas. Con respecto al trabajo realizado por Zhang *et al.*, (2006) se trata de un análisis comparativo entre la inducción química y la biológica, ya que la cepa evaluada de *Trametes* no produce lacasa de manera constitutiva. El único antecedente sobre la influencia de co-cultivos en la inducción de isoformas de la enzima, con una cepa productora de lacasa (constitutiva) es el estudiado en nuestro grupo, en co-cultivos en medio sólido, sin embargo no se caracterizaron las isoenzimas producidas por *Pleurotus ostreatus*.

Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue caracterizar las isoformas de lacasas producidas por *Pleurotus ostreatus* en medio líquido y estudiar el efecto de la interacción de *Pleurotus ostreatus*-*Trichoderma viride*. Con este estudio se buscó definir si la interacción entre los dos hongos resultó favorable, por un lado para lograr un incremento en la producción de las lacasas, y además inducir un cambio en el patrón de isoenzimas. Se adaptó un método de purificación que permitió separar las isoformas de lacasas producidas por la cepa de *Pleurotus ostreatus* CP-50. Se determinaron propiedades físicas y capacidades catalíticas de las distintas isoenzimas.

## CAPÍTULO IV

### Hipótesis

La interacción de *Pleurotus ostreatus* CP-50 con *Trichoderma viride* en medio líquido incrementa la producción de lacasas e induce cambios en el patrón de isoformas.

### Objetivo General

Purificar y caracterizar cinéticamente las diferentes isoenzimas de lacasas producidas por *Pleurotus ostreatus* y en co-cultivo con *Trichoderma viride*.

### Objetivos Particulares

- Adaptar un método de purificación para las lacasas producidas.
- Caracterizar parcialmente las diferentes lacasas.
  - ✓ Determinar el intervalo de pH y temperatura óptimo de actividad para cada una de las lacasas.
  - ✓ Determinar los parámetros cinéticos de las diferentes lacasas: Km y Vmax para los sustratos ABTS, DMP, GUA I y SGZ.

## CAPÍTULO V

### Materiales y Métodos

#### 5.1 Materiales

##### 5.1.1 Microorganismos

Se utilizó una cepa de *Trichoderma* evaluada anteriormente como inductora de lacasas en cultivos sólidos de *Pleurotus ostreatus*.

La cepa de *Pleurotus ostreatus* CP-50 fue obtenida del Colegio de Posgraduados, Unidad Puebla. *Trichoderma viride* (CIAD 01-570903) fue proporcionada por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán.

Ambas cepas fueron preservadas en caja de Petri, en medio de agar y extracto de malta (1.5% y 2% respectivamente). Inoculándose aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> del medio con la cepa preservada, a otra caja con medio fresco. Posteriormente se incubaron por 192 horas la cepa de *Pleurotus ostreatus* y 144 horas las cepas de *Trichoderma viride* en oscuridad a 29° C y finalmente se conservaron a 4° C durante un mes antes de realizar una nueva resiembra\*.

##### 5.1.2 Inóculo de *Pleurotus ostreatus*

*Pleurotus ostreatus* se inoculó en matraces Erlenmeyer de 500 mL con medio extracto de malta (2%), pH 6 e incubados durante 4 días a 25°C y 150 rpm. El medio líquido fue inoculado con 2 cm<sup>2</sup> del medio de agar-extracto de malta (previamente molidos a 30, 000 rpm con medio estéril durante 10 segundos). El volumen de trabajo en el matraz fue de 100 mL (10 mL de suspensión de inóculo y 90 mL de medio).

Transcurridos los (4 días) de cultivo, el micelio se centrifugó en condiciones de esterilidad a 11,000 rpm (18,533g) durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el micelio se transfirió a tubos falcon de 15 mL, se adicionó solución salina (0.9%) y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. Se

---

\* Los tiempos de incubación para los hongos son diferentes debido a sus velocidades radiales de crecimiento *P. ostreatus* 0.023 cm h<sup>-1</sup> y *T. viride* 0.056 cm h<sup>-1</sup>.

realizaron tres lavados para eliminar cualquier residuo de medio, se eliminó el sobrenadante y se recuperó el micelio. Finalmente el micelio fue resuspendido en agua destilada estéril (1:3 volumen de micelio / volumen de agua) y se molió a 30, 000 rpm durante 10 segundos. El fermentador se inoculó con 100 mL de esta solución.

### **5.1.3 Inóculo de *Trichoderma viride***

La cepa de *Trichoderma viride* fue sembrada en medio extracto de malta 2% - agar 1.5% por 6 días en caja de Petri en oscuridad a 29°C. Se recuperaron las esporas en condiciones de esterilidad adicionando 5mL de solución salina 9 g L<sup>-1</sup> y Tween 40 al 0.05%, a la cepa cultivada en caja de Petri. La suspensión del lavado se recolectó en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de solución salina.

### **5.1.4 Co-cultivos**

La cepa de *Trichoderma viride* fue inoculada en una concentración de 5x10<sup>3</sup> esporas mL<sup>-1</sup>. La infección se efectuó a las 30 h del desarrollo del cultivo de *P. ostreatus*.

### **5.1.5 Producción de lacasas**

La producción de la enzima se llevó a cabo en medio líquido con 2% de extracto de malta pH 6. Se utilizó un fermentador marca Microferm-114 (New Brunswick Scientific). Con jarra de vidrio de 14 L de capacidad y se utilizó un volumen de trabajo de 10 L. El fermentador estuvo equipado con tres impulsores tipo Rushton de 7.1 cm de diámetro (D/T=0.3) cada uno y un difusor de punto. El cultivo se desarrolló a una temperatura de 25°C, agitación 200 rpm y aireación de 0.5 vvm. La tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue monitoreada con un electrodo polarográfico de oxígeno esterilizable (Ingold, modelo A420) conectado a un amplificador de TOD, previamente calibrado a 100% de oxígeno disuelto.

El pH del medio fue monitoreado mediante un electrodo esterilizable (Ingold, modelo 2300) conectado a un transmisor-controlador de pH. El pH se mantuvo a un valor de 6 por medio de la adición automática de NaOH 0.4 N estéril mediante una bomba peristáltica (Cole-Palmer, modelo 7014-20).

La espuma fue controlada por la adición de antiespumante estéril (Clerol AF, Dow Corning, 30% P/V), mediante un sensor de nivel de conductividad conectado a una bomba peristáltica.

El cultivo se desarrolló durante 96 h y una vez terminada la fermentación, se eliminó el micelio para obtener el sobrenadante conteniendo la proteína.

## **5.2 Métodos**

### **5.2.1 Obtención del extracto crudo de lacasas**

Una vez finalizada la fermentación, el caldo de cultivo se separó del micelio mediante tamizado en malla. Se utilizó tamaño de malla número 40 y 120\*. Posteriormente el caldo obtenido del tamizaje fue sometido a ultrafiltración, en un equipo DC10L, Amicon. Con membranas de polisulfonas con corte de 100 y 10 kDa. La ultrafiltración fue realizada con el objetivo de obtener dos fracciones concentradas de lacasas. Finalmente las fracciones en las cuales se detectó actividad de lacasa fueron liofilizadas en un equipo SMH-15, Usifroid, con la finalidad de mantener la estabilidad biológica. Del lote liofilizado se tomaron muestras para realizar las etapas de purificación.

### **5.2.2 Biomasa**

El crecimiento micelial se evaluó mediante la determinación gravimétrica de biomasa. El micelio se filtró al vacío sobre papel filtro (Whatman No. 1) previamente tarado, se secó a 85° C en un horno (Hoffman-Pinther & Bosworth, modelo HA223) por 24 h para obtener peso constante y se pasó a un desecador por 1 hora. La concentración de biomasa se calculó mediante la diferencia de pesos y se expresó en gramos de biomasa por litro de caldo de cultivo.

### **5.2.3 Actividad de lacasa**

La oxidación de cada uno de los sustratos ensayados fue monitoreada usando un espectrofotómetro Beckman DU-650. La actividad de la enzima fue expresada en unidades (U). Donde una U se

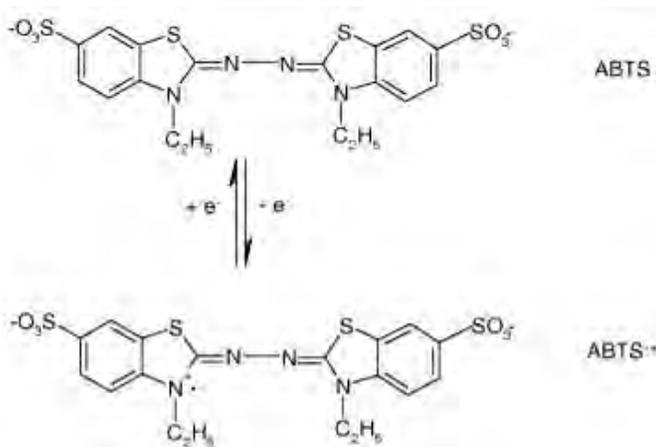
---

\* Apertura 0.42 mm y 0.125 mm para número 40 y 120 respectivamente.

definió como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto bajo las condiciones de reacción.

### 5.2.3.1. Ensayo de actividad con ABTS

El colorante no fenólico ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico es oxidado por la lacasa a un estado estable del radical catiónico [**figura 5.1**]. La concentración del radical catiónico responsable de la coloración azul verdosa puede ser correlacionada a la actividad de la enzima (Majcherczyk *et al.*, 1998). La mezcla de reacción contenía 1,750  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetatos pH 5, 50  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y 200  $\mu\text{L}$  de sustrato 0.1 M. La absorbancia del radical catiónico fue monitoreada a una longitud de onda de 436 nm y se utilizó el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de 29,300  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Niku-Paavola *et al.*, 1990).

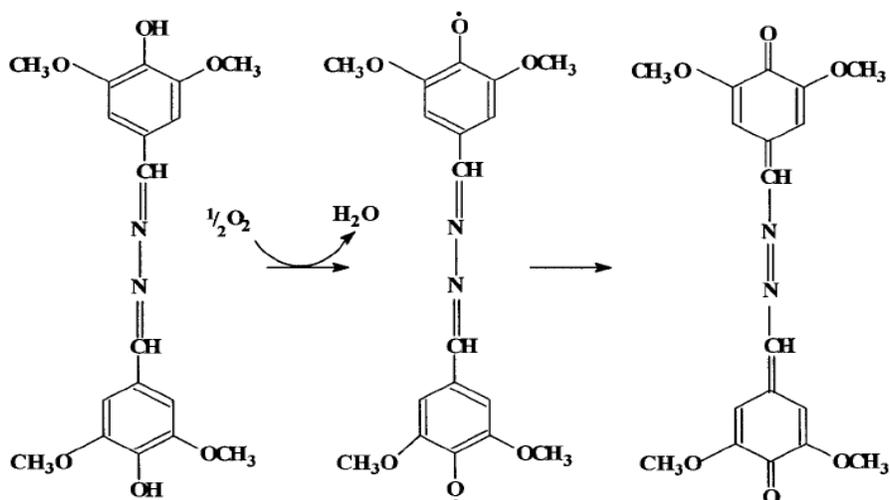


**Figura 5.1** Oxidación del ABTS a un radical catiónico ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) catalizada por lacasa (Munteanu *et al.*, 2006).

### 5.2.3.2. Ensayo de actividad con SGZ

Este método es una adaptación del método descrito por Harkin y col, el cual está basado en la oxidación de (4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldehído hidrazina) Siringaldazina (SGZ) a su quinona correspondiente [**figura 5.2**]. El incremento en la absorbancia fue seguido a 525 nm utilizando el  $\epsilon$  de  $6.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Harkin *et al.*, 1974).

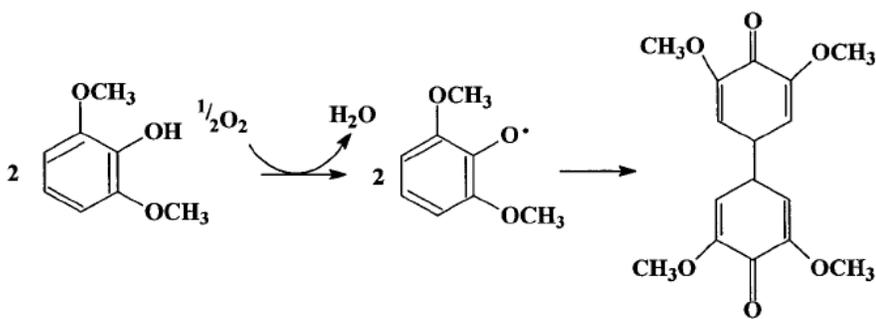
La solución stock de SGZ fue preparada disolviendo 0.1mM de sustrato en metanol. La mezcla de reacción contenía 200  $\mu\text{L}$  de sustrato, 1,750  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetatos pH 5 y 50  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático.



**Figura 5.2** Oxidación de SGZ a su quinona correspondiente catalizada por lacasa (Sánchez-Amat y Solano, 1997).

### 5.2.3.3. Ensayo de actividad con DMP

El 2,6 Dimetoxifenol (DMP) es oxidado a su quinona (2,6 dimetoxyciclohexa-2,5- dienona) por la lacasa [figura 5.3]. La coloración amarillenta rojiza formada por la quinona es medida espectrofotométricamente y puede ser correlacionada a la actividad de la enzima (Palmieri *et al.*, 1997).

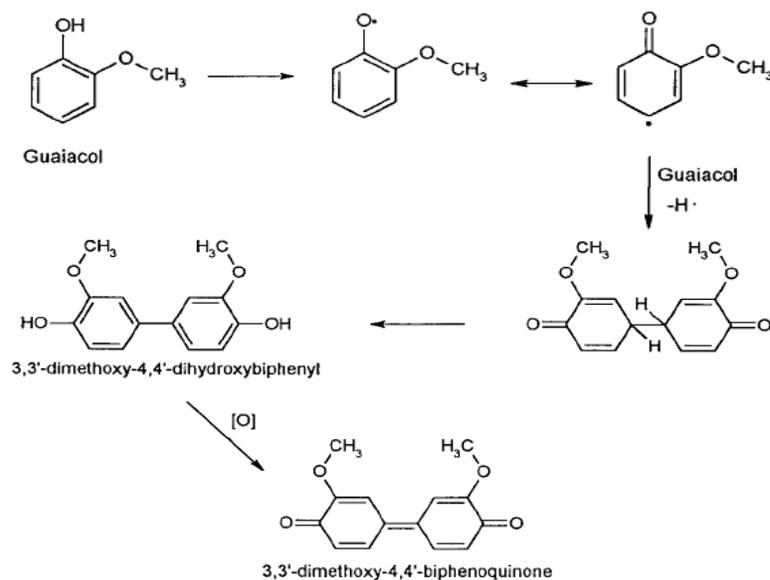


**Figura 5.3** Oxidación catalizada por la lacasa del DMP a su quinona correspondiente (Sánchez-Amat y Solano, 1997).

La oxidación del DMP fue seguida a 468 nm y con un  $\epsilon$  de  $27,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Muñoz *et al.*, 1997). La mezcla de reacción fue preparada con 1,750  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetatos pH 5, 50  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y 200  $\mu\text{L}$  de sustrato 0.6 mM.

### 5.2.3.4. Ensayo de actividad con GUAI

El compuesto 2-metoxifenol (Guaiacol) es oxidado por la lacasa formándose su quinona correspondiente [figura 5.4]. La formación de la quinona lleva a una coloración café rojiza la cual puede ser correlacionada con la actividad de la lacasa.



**Figura 5.4** Oxidación catalizada por la lacasa de Guaiacol a su quinona correspondiente (Doerge *et al.*, 1997).

La oxidación del Guaiacol fue monitoreada a 470 nm y con un  $\epsilon$  de  $26,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (DePillis *et al.*, 1991). La mezcla de reacción fue preparada con 1,750  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetatos pH 5, 50  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y 200  $\mu\text{L}$  de sustrato 6 mM.

### 5.2.4 Determinación de proteína

Se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina bovina como estándar. La proteína se midió con 800  $\mu\text{L}$  de muestra, a la cual se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (Bio-Rad). La solución se agitó en vortex y después de 30 minutos en incubación (Temperatura Ambiente), se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Para conocer la concentración de proteína en la muestra se construyó una curva estándar con soluciones de 2, 6, 10, 14, 18 y 22  $\mu\text{g/mL}$  de albúmina sérica bovina [Apéndice 2]. Las determinaciones de proteína se realizaron por duplicado.

## **5.2.5 Purificación**

### **5.2.5.1 Cromatografía de Intercambio iónico**

Del extracto enzimático liofilizado se tomó una muestra la cual fue disuelta en buffer de fosfatos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} / \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 10 mM pH 6. La muestra fue cargada en una columna con la resina (25mL de resina) DEAE Sheparose Fast Flow (SIGMA) que había sido previamente equilibrada con el buffer de fosfatos. La muestra fue eluida con una gradiente lineal de 0 a 0.35 M de NaCl en el mismo buffer, dicha concentración se mantuvo un volumen de columna (CV). Posteriormente, se incrementó a una concentración de 1M NaCl. El flujo se mantuvo constante de 1 mL por minuto. La corrida se realizó a temperatura ambiente.

Para detectar de manera rápida que fracciones tenían lacasa activa, se determinó cualitativamente la actividad, observando la oxidación de los distintos sustratos\*. Se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de sustrato, 100  $\mu\text{L}$  de buffer para actividad y 10  $\mu\text{L}$  de la fracción colectada, en pozos de una placa de poliestireno.

Las fracciones con actividad de lacasa fueron sometidas a diálisis toda la noche contra 10 volúmenes de buffer de fosfatos 10 mM pH 6 a 4°C. Posteriormente, se cuantificó espectrofotométricamente la actividad de lacasa con los cuatro sustratos. Además se determinó la concentración de proteína.

Se eligieron las fracciones con actividad para ser sometidas a electroforesis tanto nativa como desnaturalizante, con el objetivo de determinar el avance en la purificación.

Una vez separadas las bandas de actividad, las distintas fracciones fueron concentradas en un equipo de ultrafiltración (Stirred Ultrafiltration Cell Millipore) con una membrana de 10 kDa.

### **5.2.5.2. Cromatografía de Exclusión Molecular**

Las fracciones (banda superior o inferior) concentradas en la celda de ultrafiltración, fueron sometidas a permeación en gel utilizado una columna con Sephacryl HR300 (SIGMA), equilibrada con el buffer de la cromatografía anterior. Nuevamente se determinó tanto actividad de lacasa como concentración de proteína a las fracciones obtenidas.

---

\* La oxidación de sustratos se alternó entre las distintas fracciones y se identificó por el cambio de coloración de cada sustrato.

Las fracciones de interés se concentraron y se realizó electroforesis tanto nativa como desnaturalizante.

### **5.2.5.3. Cromatografía de Interacción Hidrofóbica**

La tercera cromatografía fue realizada por interacción hidrofóbica utilizando una resina t-Butyl HIC (Bio-Rad), equilibrada con el buffer de fosfatos 10 mM pH 6. Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal de sulfato de amonio de 2 a 0 M en buffer de fosfatos.

Las fracciones con actividad se dializaron, posteriormente se cuantificó la actividad de lacasa así como concentración de proteína y se realizó nuevamente el análisis electroforético.

## **5.2.6 Análisis de Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS**

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se realizó mediante el método descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron geles con 10% de acrilamida que fueron preparados mezclando los volúmenes de los reactivos de acuerdo a la **tabla 5.1**. Los geles se montaron y corrieron en una cámara mini-protean Bio-Rad.

Las bandas de proteína en los minigeles se revelaron con Azul de Coomassie. Para determinar los pesos moleculares las bandas fueron comparadas con marcadores de masas moleculares (BenchMark Ladder Invitrogen).

### **5.2.6.1 Preparación del gel y de las muestras**

Antes de mezclar las soluciones para elaborar el gel, se ensambla el dispositivo de moldeado del gel. Primero se adiciona el gel de separación. Después de que gelifique, se le adiciona el gel concentrador hasta llenar el molde y se coloca el peine.

La preparación de la muestra consistió en adicionar a 20  $\mu$ L de la muestra 5 $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y 2.5  $\mu$ L de SDS 10%, posteriormente se calentó en un termobloque a 95°C durante 5 min. Posteriormente se tomaron 20  $\mu$ L de la muestra preparada y se le agregaron 7 $\mu$ L del buffer de carga [**Apéndice 3**]. A cada pozo, se le adicionaron 15  $\mu$ L de la muestra.

### 5.2.6.2 Condiciones de corrida

Los geles de 0.75 mm de grosor se corrieron a un voltaje constante de 20 mA, en un amortiguador Tris-Glicina pH 8.3, durante 60 minutos.

### 5.2.6.3 Revelado de las bandas de proteína

Una vez corrido el gel fue sumergido en la solución fijadora durante 30 min. Posteriormente se realizó la tinción con azul de Coomassie por 60 min. El exceso de colorante se retiró sumergiendo el gel en una solución de desteñido [Apéndice 3].

**Tabla 5.1 Soluciones para geles de acrilamida**

SOLUCIÓN	GEL SEPARADOR 10%	GEL CONCENTRADOR 5%
Acrilamida 40%	1.74	0.30
Buffer de TRIS 1.5M pH 8.8	1.68	—
Buffer de TRIS 0.5M pH 6.8	—	0.80
Agua bidestilada	3.306	1.37
SDS 10%	0.132	0.0216
Persulfato de amonio (APS) 10%	0.06	0.0146
TEMED	0.006	0.0029

Las soluciones requeridas para preparar las soluciones de trabajo de los geles se encuentran en el apéndice 3.

### 5.2.6.4 Geles de poli(acrilamida) en condiciones nativas (ZIMOGRAMAS)

Para realizar el gel nativo se utilizaron las mismas soluciones que para geles desnaturizantes, excluyendo el SDS. La muestra no fue desnaturizada con calor y tampoco se le adicionó  $\beta$ -mercaptoetanol y SDS. Finalizada la electroforesis, el gel fue sumergido en 50 mL de buffer de acetatos pH 5, 0.1M, se adicionaron 5 mL de cada uno de los sustratos a la concentración reportada en el ensayo de actividad y se detectaron las bandas por la aparición del color de oxidación de los sustratos.

La adición de los sustratos fue de uno a la vez. Antes de incorporar el siguiente sustrato, la mezcla de reacción se eliminó y el gel fue lavado con 50 mL de buffer de acetatos. El orden de adición de

los sustratos fue: ABTS, SGZ, DMP y GUAI. La corrida se realizó bajo las mismas condiciones que los geles desnaturalizantes.

### **5.2.7 Determinación del efecto del pH sobre la actividad enzimática**

La influencia de pH sobre la actividad enzimática de las tres bandas con actividad lacasa purificadas fue estudiada espectrofotométricamente. Se determinó el pH óptimo de oxidación de los cuatro sustratos. Esto se realizó en un intervalo de pH de 2.2 a 8.0. Se utilizó el buffer glicina-HCl 0.1 M para el intervalo de 2.2 a 3.6. Buffer de acetato de sodio-ácido acético 0.1 M de 3.6 a 5.6 y finalmente en el intervalo de 5.7 a 8.0 el buffer de fosfato monobásico de sodio-fosfato dibásico de sodio 0.1 M. El sistema de reacción consistió en 1790  $\mu$ L de buffer, 200  $\mu$ L de sustrato y 10  $\mu$ L de la solución enzimática.

Las concentraciones de los sustratos utilizadas fueron las reportadas en el apartado de actividad de lacasa. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **5.2.8 Determinación del efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática**

Para determinar la temperatura óptima de oxidación para los cuatro sustratos analizados, se monitorearon las reacciones espectrofotométricamente a temperaturas de 25, 35, 45, 55 y 65 °C. La incubación se realizó en un termobloque (Thermomixer R Eppendorf).

Para cada una de las bandas con actividad de lacasa purificadas se utilizó el amortiguador al valor de pH óptimo de oxidación de cada sustrato. El sustrato fue incubado por 5 minutos a las diferentes temperaturas y una vez añadida la enzima se inició la reacción. La proporción de reactantes fue la utilizada que en el caso del efecto de pH.

### **5.2.9 Termoestabilidad**

La estabilidad térmica fue determinada siguiendo la oxidación de ABTS 0.1 M, en buffer de acetatos 0.1 M pH 3.6, por tres minutos a 25°C después de incubar la enzima. Los periodos de incubación variaron dependiendo de la banda de actividad los cuales se encontraron desde 30 segundos hasta 780 minutos. Las temperaturas evaluadas fueron 40, 50, 60 y 70°C.

### **5.2.10 Especificidad de sustrato**

La especificidad de las enzimas hacia diferentes compuestos fenólicos y no fenólicos fue determinada. Se evaluaron cuatro de los sustratos más utilizados (ABTS, DMP, SGZ y GUAI) (Palmieri *et al.*, 1997; Giardina *et al.*, 1999; Xu, 1996). El ABTS se disolvió en buffer de acetatos 0.1 M, pH 3.6. Se utilizaron amortiguadores de acetatos y de fosfatos para DMP y para SGZ dependiendo de la banda de actividad. Para el GUAI se empleó buffer de fosfatos.

Se emplearon al menos 20 diferentes concentraciones de cada sustrato, los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos se sometieron a un análisis de regresión no lineal (Origin) usando la ecuación de Michaelis-Menten y se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  [**Apéndice 10**].

## CAPÍTULO VI

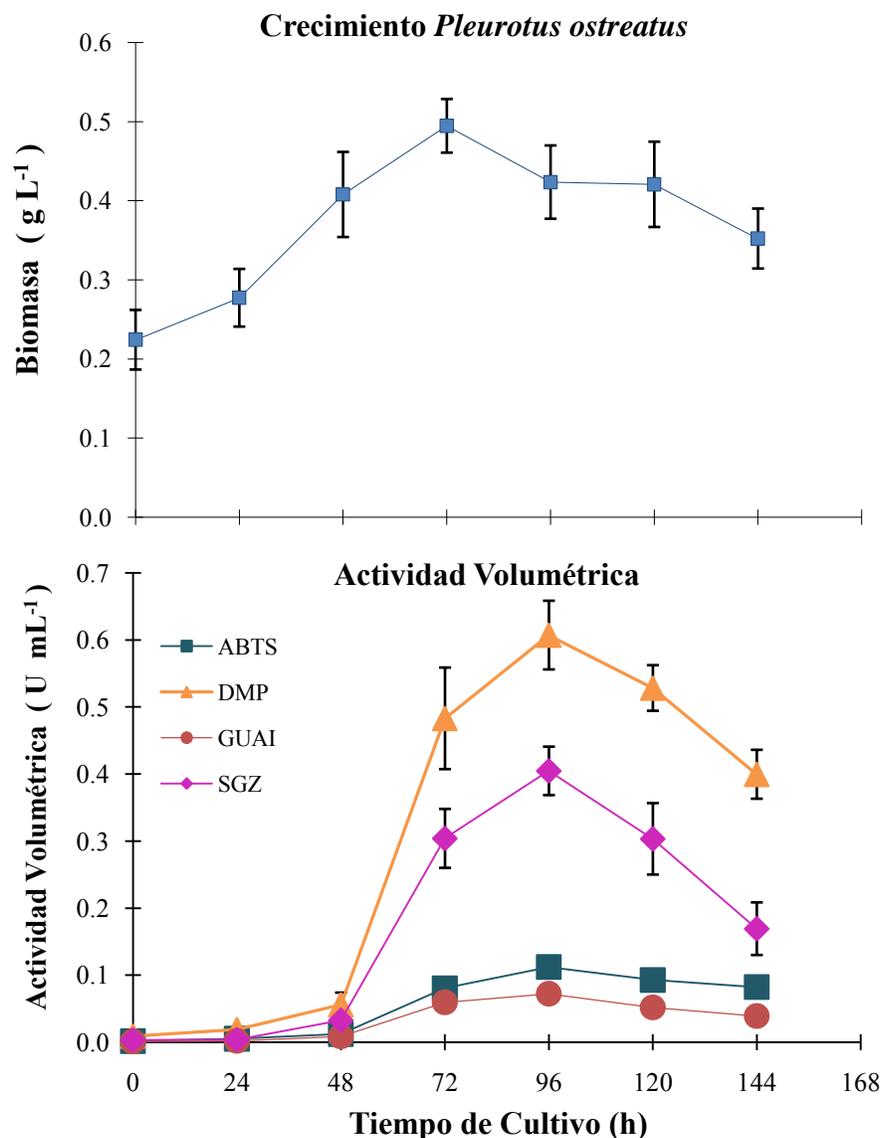
### Resultados y Discusión

#### 6.1 Crecimiento y Producción de Lacasa por *Pleurotus ostreatus* CP-50 a 200 rpm

Se inició con la caracterización de la producción de lacasas en nuestro sistema control, cultivo de *Pleurotus ostreatus* CP-50. Se realizó el cultivo bajo las condiciones mencionadas la sección de materiales y métodos. La producción de biomasa y la actividad de lacasa extracelular fueron monitoreadas como una función del tiempo durante el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en cultivo líquido. El curso de la fermentación fue seguido durante 144 h, como se observa en la **figura 6.1** al contar con un inóculo donde el microorganismo se encontraba en la fase exponencial de crecimiento, no se presentó fase de adaptación. La concentración máxima de biomasa ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) se alcanzó a las 72 horas de la fermentación y posteriormente existió un cese en el crecimiento. El bajo crecimiento alcanzado, así como el cese del mismo puede explicarse por dos fenómenos principalmente. Por una parte pudo presentarse limitación nutricional debido a que el medio de cultivo fue formulado solo con extracto de malta (2%) resultando la disponibilidad de nutrientes escasa a tiempos largos del cultivo. Por otro lado al tratarse de un hongo que su morfología en cultivo sumergido se presenta en forma de pellet, el crecimiento se verá limitado por el grosor que se alcance en la capa exterior del pellet, provocando que el pellet llegue a un tamaño determinado y posteriormente debido a limitación difusional de oxígeno, se presenta cese del crecimiento. Así que una vez que se ha detenido el crecimiento por limitación de algún nutriente puede presentarse autólisis de las células en el centro del pellet. El otro fenómeno importante a señalar, es el hecho que después de las 30 horas de la fermentación se presentó adhesión de la biomasa en la parte superior del biorreactor (paredes y rompedor de espuma) así como en los “baffles”. Por lo que al realizar la determinación del crecimiento, dicha biomasa no fue considerada en la cuantificación. De tal forma que la baja concentración de biomasa y el decremento de ésta pudieron deberse tanto a la disgregación del pellet como a la adhesión de éste en el tanque.

Para determinar la producción de la lacasa, se cuantificó espectrofotométricamente la actividad de la enzima cada 24 horas de transcurrida la fermentación. Se midió la actividad en el extracto crudo, con cuatro sustratos encontrándose una tendencia similar en la oxidación de los compuestos [**figura 6.1**]. Una vez que se presentó la formación del pellet, el hongo empezó a secretar la enzima y la actividad de lacasa fue detectable a las 24 horas de cultivo. Obteniéndose el mayor incremento después de las 48 h, aumentando la actividad entre 7 y 10 veces dependiendo del sustrato utilizado, en las 24 horas siguientes. La máxima actividad se detectó con los cuatro sustratos a las 96 horas.

Posteriormente una vez alcanzada la producción máxima de la enzima, se presentó un drástico descenso en actividad llegando a ser casi nula después de las 168 horas de cultivo.



**Figura 6.1** Cinética de producción de lacasa y crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido. (Agitación 200 rpm)

Al comparar la tendencia de síntesis de las lacasas de esta cepa de *Pleurotus ostreatus* con lo reportado tanto para otras cepas de *Pleurotus* así como para otros Basidiomicetos, encontramos solo algunos reportes donde la actividad de la lacasa es detectable en los primeros días alcanzándose la máxima actividad entre el tercer y quinto día de fermentación (Chefetz *et al.*, 1998, Iyer y Chattoo, 2003; Han *et al.*, 2005; Mansur *et al.*, 2003; Rigling *et al.*, 1993) ya que generalmente la producción de la enzima es obtenida después de 8 días de cultivo.

Con respecto al tipo de metabolito que es la lacasa, se observó que la producción de la enzima se encuentra asociada al crecimiento de *Pleurotus ostreatus*. Debido a que la actividad total se incrementó paralelamente a la producción de la biomasa. Alcanzándose la máxima actividad de la enzima una vez que el microorganismo ha llegado al punto máximo de crecimiento. Esto está apoyado con lo reportado por otros autores donde se observa que la síntesis de la lacasa es asociada al crecimiento micelial de *P. ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Cryphonectria parasitica* y *Agaricus blazei* (Mansur *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2000; Rigling *et al.*, 1993; Ullrich *et al.*, 2005).

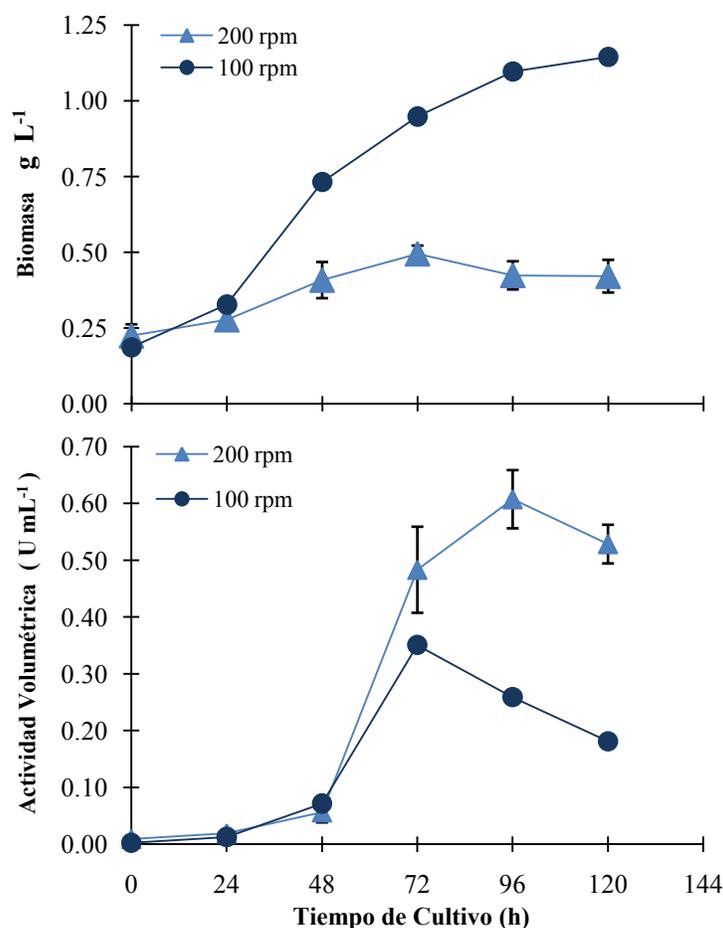
Por otra parte, el drástico decremento en la actividad de la enzima una vez que se ha alcanzado el punto máximo de actividad, es un comportamiento que se observa comúnmente en la síntesis de enzima por hongos. Esta disminución se presenta generalmente en etapas avanzadas del cultivo, cuando el microorganismo se encuentra en la fase estacionaria de crecimiento. Este fenómeno ha sido explicado por la acción de proteasas, cuya actividad se ve incrementada una vez que se ha consumido totalmente la fuente de energía (Mcneil *et al.*, 1997). Particularmente para el descenso de la actividad lignolítica, Dosoretz *et al.*, (1990) sugirieron que la actividad extracelular de una lignina peroxidasa se encontraba regulada por la actividad proteolítica presente en el caldo de cultivo. Con respecto a la actividad lacasa, Palmieri *et al.*, (2001) caracterizaron y estudiaron el papel de una proteasa extracelular de *Pleurotus ostreatus* y reportaron que esta enzima está involucrada en la regulación de lacasas a través de la degradación de una isoenzima de *Pleurotus ostreatus*.

Como se observa en la **figura 6.1** el extracto crudo de lacasa sintetizada por la cepa de *P. ostreatus* CP-50 presentó mayor actividad sobre DMP y SGZ. Con estos sustratos a las 96 horas de cultivo se detectan 0.61 y 0.41 U/mL respectivamente. Con respecto a la oxidación de Guayacol resultó la reacción menos favorecida, esto concuerda con lo reportado sobre la baja afinidad que suelen presentar sobre este sustrato las lacasas fúngicas (Baldrian, 2006).

Considerando que la biomasa adherida al tanque podría tener un efecto negativo en la producción de la enzima, disminuyéndose la actividad volumétrica. Esto debido al que al no encontrarse el hongo en contacto con el medio de cultivo (sin disponibilidad de nutrientes) la síntesis de la lacasa pudo no presentarse en esa fracción de pellets. Se realizó un cultivo modificando la velocidad de agitación de 200 a 100 rpm. Con el objetivo de evitar la adhesión de la biomasa en el fermentador.

## 6.2 Crecimiento y Producción de Lacasa por *Pleurotus ostreatus* CP-50 a 100 rpm

El perfil de producción de lacasa y crecimiento micelial se presenta en la **figura 6.2**. Al reducir la velocidad de agitación, se logró disminuir la adhesión de pellets en el biorreactor, con lo cual la cantidad de biomasa suspendida en el caldo de fermentación se incrementó. Se cuantificó un crecimiento de 1.3 g/L a las 96 horas de cultivo, lo que equivale a tres veces más a lo determinado a 200 rpm. Por otra parte, al modificar la velocidad de agitación se provocaron cambios morfológicos en los pellets, siendo éstos más grandes y menos compactos. Aún cuando el tamaño de pellet no fue medido, visualmente la diferencia en tamaños resultó evidente. El aumento en el tamaño de pellet es respaldado por lo reportado por Márquez-Rocha *et al.*, (2000) donde encontraron que el tamaño del pellet de *P. ostreatus* se ve disminuido (hasta 60 % el diámetro) al aumentar la velocidad de agitación de 200 a 400 rpm. Esta disminución se debe principalmente a que al incrementar la velocidad de agitación se generan mayores fuerzas de corte, lo cual reduce la aglomeración de la hifa disminuyéndose el diámetro del pellet (Papagianni, 2004).



**Figura 6.2** Cinética de producción de lacasa y crecimiento de *P. ostreatus* CP-50 en medio líquido. La actividad fue evaluada con la oxidación de DMP. (Agitación 200 y 100 rpm)

Con respecto a la actividad volumétrica encontramos que aún cuando existió mayor biomasa suspendida en el caldo de cultivo la producción de lacasa no mostró un incremento. Como se muestra en la **figura 6.2**, el punto máximo de actividad se alcanzó a las 72 horas, posteriormente se presenta la caída en la actividad volumétrica. Al comparar las actividades máximas, a 100 rpm en la oxidación de DMP se alcanzaron  $0.35 \text{ U mL}^{-1}$ , 41% menos actividad que la lograda con 200 rpm. El comportamiento en la oxidación de los distintos sustratos fue similar, obteniéndose globalmente menores actividades volumétricas en esta fermentación. Donde la actividad máxima obtenida a una velocidad de agitación de 100 rpm (72h) es comparable con la actividad detectada a ese mismo tiempo a 200 rpm, pero no con el punto máximo de ésta condición. Es importante señalar que a menor velocidad de agitación, el descenso de la actividad se presentó en una etapa más temprana del cultivo (24 horas antes que a 200 rpm) ya que a las 72 horas de este cultivo existió un ligero incremento del crecimiento micelial. Lo cual puede ser respuesta a un cambio en el metabolismo del hongo, provocado posiblemente por el tamaño de pellet y con ello que la regulación de la actividad se presentara antes de que el microorganismo se encontrara en la fase estacionaria de crecimiento.

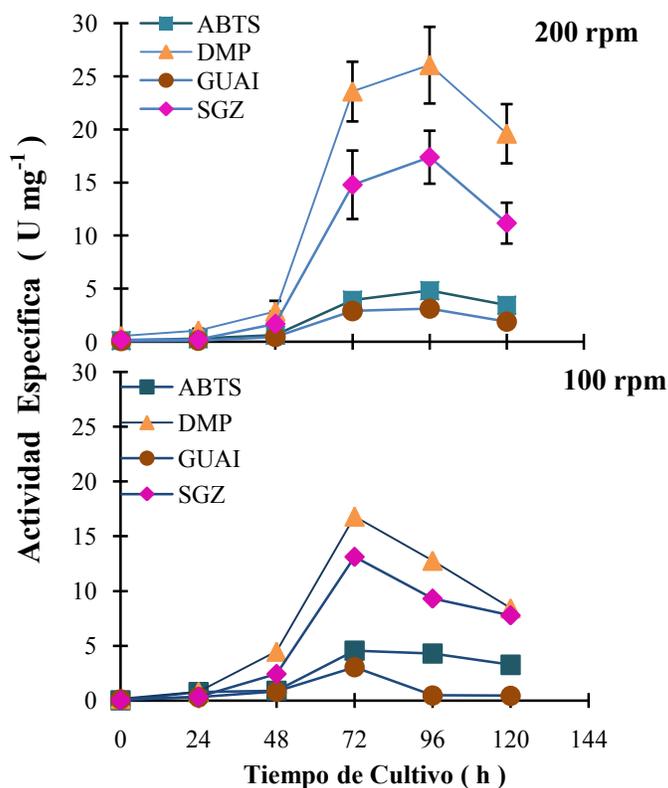
Los bajos títulos alcanzados al incrementar el tamaño de pellet, pudieron ser provocados al someter a la célula a limitaciones en el transporte de nutrientes. Se ha reportado, que los pellets de menor tamaño ofrecen menor barrera difusional al oxígeno y otros nutrientes, dando como resultado la obtención de mayores productividades en comparación con lo alcanzado con pellets de mayor diámetro. Particularmente, con respecto a la producción de enzimas se ha documentado que al producirse pellets de tamaño pequeño se ve favorecida su síntesis (Gibbs *et al.*, 2000).

Con lo anterior, se puede observar que la producción específica a 100 rpm resultó menor a la alcanzada a 200 rpm. Los valores de actividad volumétrica obtenidos en la oxidación del resto de los sustratos se encuentran en el **apéndice 4**.

Para determinar el efecto de la potencia volumétrica suministrada al cultivo, deberán realizarse las evaluaciones tanto de actividad enzimática como del tamaño de pellet (a las dos velocidades de agitación aquí ensayadas) y con ello tener mayor evidencia de su relación, debido a que en este ensayo solo se cuenta con una determinación de la actividad volumétrica a 100 rpm, por lo cual es necesario contar con las réplicas para verificar si se presentan los mismos fenómenos en la actividad y en el crecimiento.

### 6.2.2 Actividad Específica

Se calculó la actividad específica para las dos condiciones de agitación encontrándose que el punto máximo coincidió con la máxima actividad volumétrica, 96 horas de cultivo para 200 rpm y 72 horas a 100 rpm [figura 6.3]. Como se observa en el gráfico, al correlacionar la actividad volumétrica con la cantidad de proteína sintetizada, en el extracto con agitación de 200 rpm se cuantificó mayor actividad. Sin embargo, al comparar la cantidad de proteína extracelular, desde el inicio de la fermentación hasta las 72 horas, se obtuvieron concentraciones equivalentes. Esto nos indica que a 100 rpm, la proteína sintetizada con actividad de lacasa fue menos activa o se encontró en menor concentración. Posteriormente, a las 96 horas a 100 rpm, la concentración de proteína incrementó ligeramente, esto nos sugiere nuevamente que el descenso más temprano de la actividad bajo esta condición, pudo ser resultado de que la autólisis se disparara a menor tiempo de fermentación, a causa del tamaño de pellet alcanzado, provocando la acción de proteasas sobre la lacasa. La cantidad de proteína extracelular al final de la fermentación en ambas condiciones fue similar.



**Figura 6.3** Actividad específica (Agitación 200 y 100 rpm). Los valores de la velocidad a 200 rpm se calcularon por triplicado. Para la actividad a 100 rpm solo se muestra el valor de una determinación.

Como se mencionó para la actividad volumétrica el extracto de lacasa presentó mayor actividad con Siringaldazina y DMP. La alta actividad observada con SGZ concuerda con lo reportado en la caracterización de las lacasas, ya que para este sustrato se reportan valores de Km más bajos que para otros sustratos utilizados por lacasas. De manera general las lacasas combinan alta afinidad por SGZ con altas constantes catalíticas. Por lo anterior se ha considerado a la Siringaldazina como un sustrato específico de las lacasas (Baldrian, 2006).

## 6.3 Concentración del Extracto Crudo

### 6.3.1 Ultrafiltración

Con la finalidad de obtener un concentrado con actividad de lacasa, el caldo de cultivo obtenido de una fermentación a 200 rpm y 96 horas de cultivo se tamizó y posteriormente se sometió a un proceso de ultrafiltración. Esto nos permite no solo concentrar nuestro producto de interés, además nos da la posibilidad de trabajar con volúmenes más pequeños en las siguientes etapas. Se utilizaron membranas de corte de 10 y 100 kDa, las cuales fueron seleccionadas en base a lo reportado con respecto al peso molecular promedio de las lacasas fúngicas, el cual fluctúa entre 50-80 kDa (Baldrian, 2006).

El caldo tamizado fue ultrafiltrado primeramente con una membrana de 100 kDa, obteniéndose dos fracciones. Una con moléculas mayores a 100 kDa (retenido por la membrana) y la otra con moléculas con pesos promedio inferiores a los 100 kDa. Esta última fracción fue sometida nuevamente a ultrafiltración, ahora utilizando un corte de 10 kDa. En este paso, las fracciones que se obtuvieron se encontraban en pesos moleculares alrededor de 10-100 kDa (retenida) y menor a 10 kDa (eluyente).

Para conocer el avance de la purificación así como verificar si en la fracción de 10-100 kDa se retuvo la mayor actividad, se determinó actividad de lacasa, en las cuatro fracciones, con los cuatro sustratos, mencionados anteriormente. Una vez realizadas las mediciones tanto de actividad como de proteína se efectuaron los balances correspondientes. En la **tabla 6.1** se presenta el balance obtenido con la oxidación de ABTS [el resumen global se encuentra en el **apéndice 5**].

Como se esperaba, considerando los pesos reportados para lacasas, así como el análisis previo de los pesos moleculares de nuestras proteínas, en la fracción de 10-100 kDa se concentró la mayor

cantidad de actividad, sin embargo la fracción >100 kDa retuvo alrededor del 20 % de la actividad total. Considerando ambas fracciones con la oxidación de los cuatro sustratos se tiene una recuperación promedio del 80 % de la actividad total detectada en el extracto crudo tamizado. El factor de purificación para la oxidación de ABTS fue de 1.5 y 0.63 para las fracciones de 10-100 kDa y >100 kDa respectivamente. En la fracción del eluyente de la membrana de 10 kDa solo se detectó actividad residual y la cantidad de proteína osciló alrededor 35 mg.

**Tabla 6.1** Resumen de la etapa de ultrafiltración del extracto crudo de lacasa de *P. ostreatus* CP-50.

<i>Fracción</i>	<i>Sustrato</i>	<b>Volumen</b> (mL)	<b>Proteína</b> (mg/mL)	<b>Proteína</b> <b>Total</b> (mg)	<b>Actividad</b> <b>Total</b> (U)	<b>Actividad</b> <b>Específica</b> (U/mg)	<b>Factor de</b> <b>Purificación</b>	<b>Rendimiento</b> %
ABTS								
Tamizado		6925	0.0283	195.98	703.85	3.59		
>100kDa		1087.5	0.0657	71.45	160.47	2.25	0.63	23
10-100 kDa		1150	0.0753	86.60	467.88	5.40	1.50	66

La muestra denominada Tamizado es aquella obtenida del caldo de cultivo, a la que solo se le eliminó el micelio-pellet y considerada como el 100% para los balances.

### 6.3.2 Análisis Electroforético

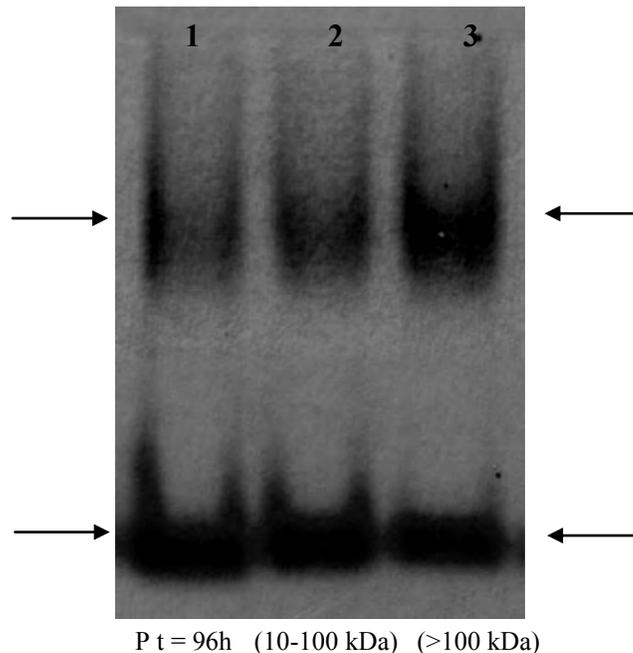
El análisis con geles de poliacrilamida se realizó en condiciones nativas y desnaturalizantes. Para visualizar por un lado, bandas activas con actividad de lacasa y por otra parte estimar de manera general el peso molecular aproximado de las lacasas producidas por *P. ostreatus* CP-50, en medio líquido bajo las condiciones estudiadas.

#### 6.3.2.1 Geles de Actividad

Las proteínas en los sobrenadantes de diferentes días de la fermentación fueron analizadas mediante geles nativos PAGE, los cuales fueron teñidos con los cuatro sustratos. En cada tinción pudieron detectarse dos bandas con actividad de lacasa [figura 6.4]. Se probaron diferentes concentraciones de proteína, de 100 a 250 µg/mL, obteniéndose en cada caso dos bandas de actividad y la misma movilidad electroforética. En las concentraciones más altas el revelado de las bandas se presentó en menor tiempo, la intensidad de ambas bandas fue mayor y la difusión de los sustratos se extendió más sobre el gel.

Muchas especies fúngicas secretan varias isoformas de lacasas principalmente como respuesta a la presencia de ciertos compuestos químicos, *Trametes villosa* produce al menos tres isoformas y

*Marasmius quercophilus* sintetiza cuatro. Con respecto a las cepas del hongo *Pleurotus ostreatus* se ha reportado que produce al menos ocho diferentes isoenzimas de lacasa. Estas isoenzimas han sido inducidas principalmente por la adición de cobre. En las condiciones de cultivo solo con extracto de malta, en el sobrenadante de *P. ostreatus* CP-50 se detectaron dos bandas con actividad de lacasa.



**Figura 6.4.** Gel Nativo PAGE revelado con DMP

Una vez que se corroboró que el patrón de bandas no cambió durante el curso del cultivo, se realizaron geles en condiciones nativas de las dos fracciones (10-100 kDa) y (>100 kDa) obtenidas por ultrafiltración. Esto con el objetivo principal de determinar si la ultrafiltración permitió que alguna de las fracciones presentara solo una de las bandas de actividad, debido a los porcentajes recuperados.

En la **figura 6.4** se muestra el gel nativo, en el primer carril del gel se cargó la muestra proveniente de la fermentación, tomada a las 96 horas de cultivo (P t=96h). En los carriles dos y tres se inyectaron las fracciones obtenidas por ultrafiltración (10-100 kDa y >100 kDa). Las muestras se estandarizaron a una concentración de proteína de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la intensidad de la banda obtenida nos indica de manera cualitativa la actividad de la enzima.

Como se observa en el gel, las dos fracciones del ultrafiltro presentaron las dos bandas de actividad. Sin embargo, la intensidad de las bandas de la fracción >100 kDa fue menor, lo cual concuerda con lo obtenido espectrofotométricamente, donde se encontró mayor actividad en la muestra

correspondiente a la fracción de 10-100 kDa. Aún cuando la diferencia en la cantidad de proteína recuperada en las dos fracciones fue solo de 10 mg, en la fracción >100 kDa solo se cuantificó un 20% de la actividad total, lo que nos permite inferir que la mayor parte de la proteína presente en esta fracción son proteínas contaminantes. El fraccionamiento de las dos bandas de actividad en los cortes 10-100 y >100 pudo deberse a una saturación de las membranas.

### 6.3.3 Liofilización

La fracción 10-100 kDa fue liofilizada para facilitar las etapas de purificación. Se decidió realizar la liofilización debido a que se ha observado que los extractos liofilizados presentan mayor estabilidad que los extractos crudos acuosos, ya que al disminuir la actividad de agua, se disminuye con ello actividad biológica (actividad de proteasas), y por lo tanto se reduce la degradación de la proteína. Se había considerado que durante la liofilización se tendría pérdida de actividad, sin embargo, el rendimiento obtenido en esta etapa fue muy bajo. La reducción de la actividad (~70%) puede explicarse a la falta de protección de la enzima durante la liofilización, ya que durante esta operación se puede presentar la desnaturalización de la proteína por congelamiento y/o deshidratación. La desnaturalización puede ser reversible o irreversible y en algunos casos puede no presentarse cambios de las proteínas, sin embargo estas conductas dependerán de la naturaleza de las enzimas. Por lo anterior, para evitar pérdidas de actividad es recomendable proteger las proteínas el uso de estabilizadores. Al comparar los rendimientos alcanzados con el uso de crioprotectantes y sin su formulación, se ha reportado que la pérdida de actividad sin ningún estabilizador puede ser del 65% y con su uso se recupera hasta el 90% de la actividad (Wang, W. 2000). En el caso de nuestras enzimas, fue evidente que será necesario el uso de protectantes si consideramos el extracto liofilizado como alternativa de almacenamiento a largo plazo. Sin embargo, después de evaluar la estabilidad de extracto líquido a -20°C, en un periodo de almacenamiento de un año, encontramos que la pérdida de actividad fue alrededor del 40%, además considerando el tiempo que nos tomó separar las dos bandas con actividad de lacasa, resulta más conveniente mantener el extracto líquido. El balance de la liofilización se presenta en la **tabla 6.2**. La actividad fue evaluada con la oxidación de ABTS.

**Tabla 6.2** Resultados de la liofilización (Fracción 10-100 kDa).

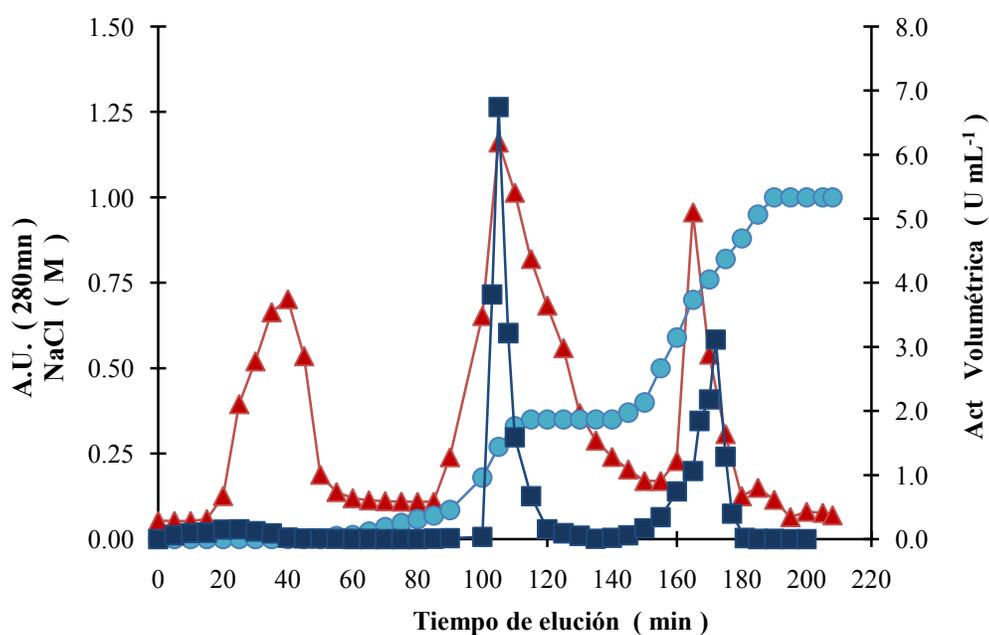
<i>Etapa</i>	<b>Proteína Total</b> (mg)	<b>Actividad Total</b> (U)	<b>Actividad Específica</b> (U/mg)	<b>Rendimiento</b> %
<b>ABTS</b>				
Ultrafiltración	62.14	220.85	3.55	100
Liofilización	43.74	74.16	1.70	34

## 6.4 Purificación de Lacasa

Posterior a la liofilización, se tomó una muestra y se resuspendió en buffer fosfatos 10 mM pH 6, para realizar tres cromatografías con la intención de separar las dos bandas de actividad detectadas en los geles nativos. Utilizando como criterio el pI preponderante de las lacasas reportadas de distintos hongos el cual es ácido (3-5) se decidió realizar como primer paso de purificación una cromatografía de intercambio iónico.

### 6.4.1 Cromatografía de Intercambio Aniónico

Se realizó la cromatografía en tres fases, en la primera fase se utilizó un gradiente salino, posteriormente se efectuó una elución isocrática durante un volumen de columna, y finalmente en la tercera fase se cambió a un segundo gradiente. El perfil de elución se muestra en la **figura 6.5**. Como se observa en el gráfico, se obtuvieron tres picos de absorbancia a 280 nm. El primero de ellos fue eluido cuando se mantuvo 1 CV de buffer de fosfatos, antes de iniciar el gradiente salino. Los dos siguientes fueron separados con el gradiente de NaCl.



**Figura 6.5** Perfil de separación de la proteína producida por *Pleurotus ostreatus*, en cromatografía de intercambio iónico. Las fases móviles fueron: amortiguador de fosfatos, pH 6, 10 mM y el mismo amortiguador con 0.35 M y 1 M de NaCl, con un flujo de 1 mL/min.

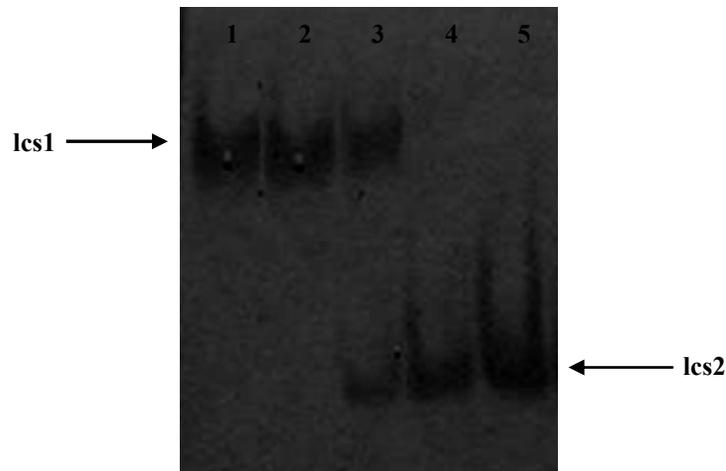
- Actividad Volumétrica (medida con ABTS)
- ▲ Absorbancia 280 nm
- NaCl

Para lograr separar las dos bandas de actividad fue necesario realizar la cromatografía con un gradiente escalonado, el uso de un solo gradiente, provocaba que las dos bandas de actividad copurificaran, encontrándose pocas fracciones con una sola banda de actividad. Aún cuando se utilizaron bajos flujos, así como diferentes valores de pH.

Al analizar las fracciones de cada pico, espectrofotométricamente se resolvieron dos picos de actividad bien definidos. En las muestras pertenecientes al primer pico de absorbancia solo se presentó actividad residual. La baja actividad en estas fracciones nos deja inferir que se trata principalmente de proteínas contaminantes, las cuales presentaron menos cargas externas negativas, siendo poco afines a la resina DEAE Sepharose y eluidas solo con el buffer. La mayor parte de la enzima con actividad de lacasa se unió a la matriz de DEAE, además como se mencionó anteriormente fue necesario mantener 0.35 de NaCl por 1 CV para permitir que se resolviera el primer pico de actividad. Al incrementar la concentración de sal hasta 1 M se consiguió resolver el segundo pico. Por otra parte, con el incremento de la concentración salina se logró la separación de contaminantes no proteicos los cuales se eluyeron en las fracciones finales no mostrando absorbancia a 280 nm.

Al realizar el análisis mediante geles nativos PAGE [**figura 6.6**], encontramos que con el gradiente escalonado las fracciones provenientes del primer pico de actividad presentan solo la banda con menor movilidad electroforética y aquella con mayor movilidad se observa en las fracciones que forman el segundo pico. Una característica importante encontrada al teñir el gel con los diferentes sustratos encontramos que la actividad eluida a 0.3 M de NaCl fue más reactiva con ABTS, mientras las fracciones de la segunda (eluidas a 0.7) mostraron mayor reactividad con DMP, GUAI y SGZ. Lo cual concuerda con las actividades volumétricas cuantificadas espectrofotométricamente. Esto nos permite inferir que dichas bandas de actividad pueden corresponder a dos isoformas diferentes de lacasa, debido a que muestran una actividad diferente sobre los sustratos.

Para identificar más clara y fácilmente las dos bandas con actividad de lacasa, la proteína con menor movilidad electroforética se denominó **lcs1** y la proteína que presentó mayor movilidad **lcs2**. En el balance de proteína así como de la actividad enzimática, se obtuvo un porcentaje de recuperación de 43.8 y 75.5% respectivamente. El balance de la cromatografía se encuentra en la **tabla 6.3** donde se reporta el balance individual para lcs1 y lcs2. Los valores de actividad reportados fueron obtenidos por la oxidación de ABTS.



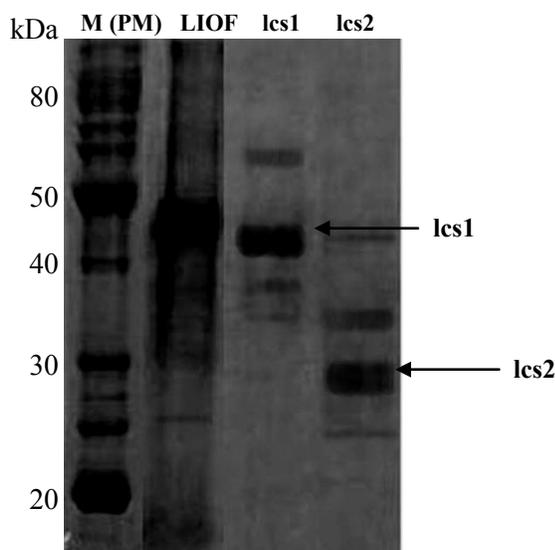
**Figura 6.6.** Gel nativo PAGE. En el carril 1 y 2 se cargaron las muestras correspondientes a los minutos 103 y 110 respectivamente (primer pico de actividad). En el carril 3 se colocó la muestra liofilizada y los carriles 4 y 5 corresponden a los minutos 165 y 175 (segundo pico de actividad).

**Tabla 6.3** Purificación de lcs1 y lcs2. (Cromatografía intercambio aniónico)

<i>Etapa</i>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Actividad Total (U)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg)</b>	<b>Factor de Purificación</b>	<b>Rendimiento %</b>
Liofilizado	22.24	37.6	1.69	--	100
DEAE-SEPHAROSE (lcs1)	5.65	17.2	3.04	1.80	45.7
DEAE-SEPHAROSE (lcs2)	4.10	11.2	2.73	1.62	29.8

Posteriormente se realizó el gel en condiciones desnaturalizantes para observar si las bandas de actividad separadas por la matriz DEAE lograron ser purificadas a homogeneidad, o bien existía la presencia de otras proteínas contaminantes. Además estimar por SDS PAGE los pesos moleculares de las lacasas. En la **figura 6.7** se muestra el gel desnaturalizante, en la muestra proveniente del liofilizado se pueden observar siete bandas de proteínas. En las muestras de lcs1 y lcs2 se detectaron cinco bandas a diferentes intensidades, sin embargo aquellas correspondientes tanto a lcs1 y a lcs2 mostraron la mayor intensidad, sus pesos se estimaron en 44 y 27 kDa respectivamente. La curva para la estimación del peso molecular se encuentra en el **apéndice 6**.

Para identificar la banda con actividad lacasa se realizó un gel en condiciones desnaturalizantes suaves, sin adicionar  $\beta$ -mercaptoetanol y calentando solo por dos minutos a 70°C la muestra, esto nos permitió diferenciar entre las distintas bandas de proteínas nuestras enzimas de interés, identificándolas por la oxidación de los distintos sustratos. Para obtener un mayor grado de pureza, eliminando las proteínas contaminantes se realizó una cromatografía de filtración en gel.



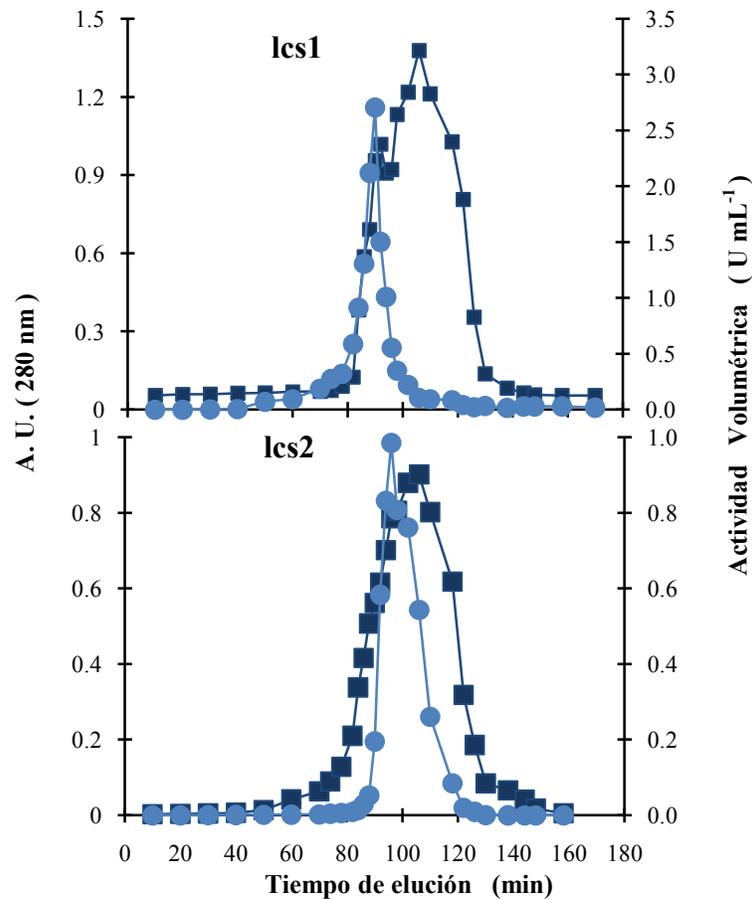
**Figura 6.7** Gel SDS- PAGE. En el carril 1 se encuentra el marcador de pesos moleculares. En el carril 2 la muestra liofilizada y en los carriles 3 y 4 las muestras con lcs1 y lcs2 respectivamente.

Para identificar la banda con actividad lacasa se realizó un gel en condiciones desnaturalizantes suaves, sin adicionar  $\beta$ -mercaptoetanol y calentando solo por dos minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  la muestra, esto nos permitió diferenciar entre las distintas bandas de proteínas nuestras enzimas de interés, identificándolas por la oxidación de los distintos sustratos. Para obtener un mayor grado de pureza, eliminando las proteínas contaminantes se realizó una cromatografía de filtración en gel.

#### 6.4.2 Cromatografía de Exclusión Molecular

Para eliminar las proteínas contaminantes se decidió realizar una cromatografía de filtración en gel, se optó por esta técnica debido a que por medio del intercambio iónico se logró separar las dos bandas de actividad, sin embargo las proteínas contaminantes copurificaron con nuestras enzimas. Esto nos indica que las proteínas presentan carga muy similar, a las condiciones en que se realizó la cromatografía de intercambio iónico. Además el gel desnaturalizante nos permitió observar que existe una diferencia de al menos 5 kDa, con respecto al peso de nuestras proteínas de interés. Se concentraron las fracciones en una celda de ultrafiltración, para formar los “pools” de lcs1 y lcs2. Cada uno de los concentrados fue cargado en una columna con resina Sephacryl 300HR. El perfil de elución se muestra en la **figura 6.8**. Cada pool se resolvió en un solo pico de absorbancia, sin embargo, al realizar el análisis por espectrofotometría se obtiene que la actividad se encuentra dentro de las primeras fracciones. En el perfil de elución de lcs1 se observa que la actividad se encuentra dentro de un pequeño hombro del pico de absorbancia a 280 nm. Las dos corridas se

realizaron bajo las mismas condiciones, la elución de lcs2 al tener menor peso, se retrasó ligeramente con respecto al tiempo en que eluyó lcs1 (mayor peso molecular). En ambos casos se recolectaron fracciones que mostraron absorbancia (280 nm) al final de la corrida, pero éstas no fueron reactivas con ninguno de los sustratos evaluados. Sin embargo, presentaron la pigmentación café que se había observado en el extracto crudo y que anteriormente parte de éste se había eliminado al mantener la muestra a 4°C y con el intercambio iónico.



**Figura 6.8** Perfil de Absorbancia y Actividad Volumétrica de lcs1 y lcs2, sometidas a cromatografía de Exclusión Molecular.

- Absorbancia a 280 nm
- Actividad Volumétrica (Oxidación de ABTS)

Se realizó el gel en condiciones desnaturizantes de lcs1 y lcs2, el cual se muestra en la **figura 6.9**. Sin embargo, en ambas muestras aún se encuentran otras bandas de proteína contaminante. Por lo anterior se decidió someter a las fracciones a una cromatografía de interacción hidrofóbica. El avance de purificación se reportó en la **tabla 6.4**. La actividad se evaluó con la oxidación de ABTS.

**Tabla 6.4** Purificación de lcs1 y lcs2. (Intercambio aniónico y exclusión molecular)

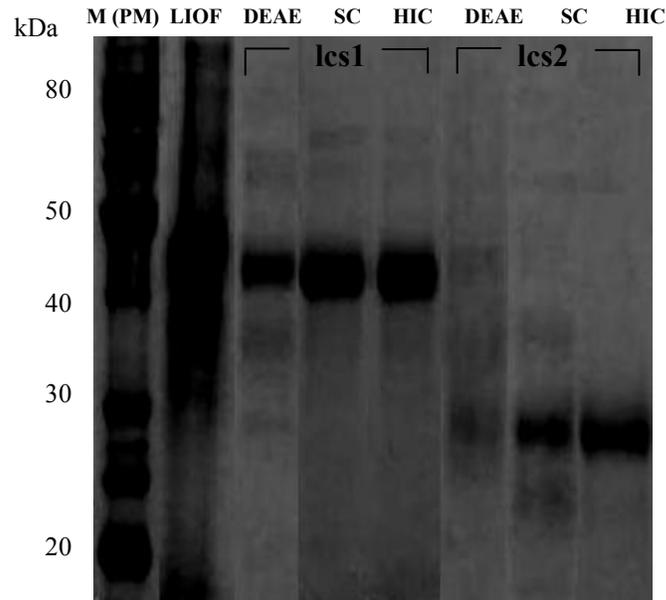
<i>Etapa</i>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Actividad Total (U)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg)</b>	<b>Factor de Purificación</b>	<b>Rendimiento %</b>
Liofilizado	22.24	37.6	1.69	--	100
DEAE-SEPHAROSE (lcs1)	5.65	17.2	3.04	1.80	45.7
SEPHACRYL 300 HR (lcs1)	1.70	11.5	6.76	4.0	30.6
DEAE-SEPHAROSE (lcs2)	4.10	11.2	2.73	1.62	29.8
SEPHACRYL 300 HR (lcs2)	1.23	4.0	3.25	1.92	10.6

### 6.4.3 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Para purificar nuestras enzimas de interés se habían utilizado los criterios de peso molecular (ultrafiltración y tamiz molecular) y pI (intercambio aniónico), lográndose separar las dos bandas con actividad lacasa y eliminar la mayor cantidad de proteínas contaminantes. Sin embargo, se buscaba afinar más la purificación, así que se decidió utilizar como tercer paso cromatográfico interacción hidrofóbica. Con esta técnica, la separación de nuestras enzimas y las proteínas contaminantes sería en base a su grado de hidrofobicidad, el cual es dependiente de la secuencia de aminoácidos. Además, las interacciones hidrofóbicas que pueda formar la proteína en su estado nativo, dependerán de la presencia de aminoácidos no-polares en su superficie. Por lo cual, la distribución de esas regiones es una característica de cada proteína. Con este criterio de purificación, las proteínas contaminantes detectadas, se encuentran en muy baja concentración, considerando la intensidad de ellas con respecto a nuestras proteínas de interés y la concentración de proteína total cargada en el gel [figura 6.9]. Además, al realizar el gel nativo PAGE de lcs1 y lcs2, se obtiene una sola banda de actividad. Por lo anterior, la presencia de la proteína contaminante no representa un factor que pueda alterar las determinaciones para caracterizar a nuestras enzimas. Es decir, no contribuye en la oxidación de los sustratos, por lo cual se procedió a realizar una caracterización parcial de las dos bandas de actividad lacasa (lcs1 y lcs2). El rendimiento obtenido en esta etapa se encuentra resumido en la **tabla 6.5**.

En la **figura 6.9** se muestra el avance de la purificación de las enzimas lcs1 y lcs2 sometidas a tres pasos cromatográficos. Al comparar los pesos moleculares estimados para lcs1 y lcs2 (44 y 27 kDa) con los reportados para lacasas fúngicas encontramos que presentan pesos más pequeños al

promedio reportado (50-80 kDa Mayer y Staples, 2002; Baldrian, 2006). Sin embargo, el peso molecular de lcs1 es coincidente con lo reportado para lacasas pequeñas, como el de una isoenzima de *Pleurotus pulmonarius* con masa molecular de 46, el peso de 43 kDa de una lacasa de *Tricholoma giganteum* y una isoforma de *Pleurotus ostreatus* se estimó en 43.7 kDa (Baldrian, 2006; Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2008).



**Figura 6.9.** Gel SDS-PAGE (10%) de lcs1 y lcs2. En el carril 1, se encuentran los marcadores de peso molecular. En el carril 2 se cargó la muestra liofilizada. Los carriles 3, 4 y 5 corresponden a la purificación lcs1. Los carriles 6, 7 y 8 contienen las fracciones de lcs2.

DEAE Cromatografía de intercambio iónico

SC Cromatografía de tamiz molecular

HIC Cromatografía de interacción hidrofóbica

**Tabla 6.5** Resumen de las etapas de purificación de lcs1 y lcs2. (Balance global)

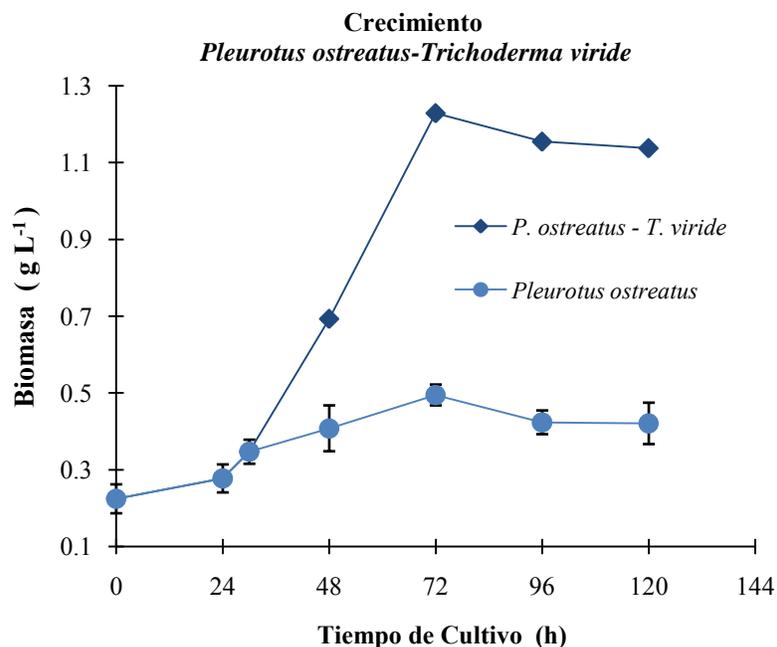
<i>Etapa</i>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Actividad Total (U)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg)</b>	<b>Factor de Purificación</b>	<b>Rendimiento %</b>
Liofilizado	22.24	37.6	1.69	--	100
DEAE-SEPHAROSE (lcs1)	5.65	17.2	3.04	1.80	45.7
SEPHACRYL 300 HR (lcs1)	1.70	11.5	6.76	4.0	30.6
HIC (lcs1)	0.97	7.6	7.84	4.63	20.2
DEAE-SEPHAROSE (lcs2)	4.10	11.2	2.73	1.62	29.8
SEPHACRYL 300 HR (lcs2)	1.23	4.0	3.25	1.92	10.6
HIC (lcs2)	0.67	3.5	5.22	3.08	9.3

## 6.5 Co-Cultivos *Pleurotus ostreatus*-*Trichoderma viride*

Una vez caracterizado el perfil de lacasas en el cultivo control se llevo a cabo la inducción biológica. La fermentación de los co-cultivos se realizó bajo las mismas condiciones que los cultivos control a 200 rpm. El tiempo de infección así como la concentración de esporas de *Trichoderma* se evaluaron previamente.

### 6.5.1 Cinética de Crecimiento de *Pleurotus ostreatus*-*Trichoderma viride*

En la **figura 6.10**, se muestra el perfil de crecimiento obtenido en los co-cultivos. Primeramente, se inició la fermentación inoculando solo *P. ostreatus*. Esto se realizó con la finalidad de permitir que el hongo productor de la lacasa se encontrará en una etapa de su crecimiento, la cual le permitiera responder ante la presencia de *Trichoderma viride*. Debido a que la velocidad de crecimiento de *P. ostreatus* es menor a la de *T. viride*. Cumplidas las 30 horas de cultivo de *P. ostreatus* se inoculó la cepa de *T. viride* en forma de esporas. Una vez germinadas las esporas y desarrollados los pellets (36 h) se observa como el crecimiento en el co-cultivo se incrementa hasta las 72 horas y posteriormente entra a una fase estacionaria.



**Figura 6.10.** Cinética de crecimiento de cultivo control (*P. ostreatus*) y en co-cultivos (*P. ostreatus*-*T. viride*) en medio líquido. La adición de esporas de *T. viride* se realizó a las 30 h de la fermentación de *P. ostreatus*.

En esta fermentación nuevamente gran parte de la biomasa se adhirió al fermentador. Sin embargo, como se observa en el gráfico la concentración de biomasa llegó a 1.2 g L<sup>-1</sup>. Esto significa un

incremento del cien por ciento con respecto a lo alcanzado en los cultivos control bajo las mismas condiciones de fermentación. Lo cual nos indica que si existió la germinación de las esporas de *Trichoderma*. Esto se corroboró mediante microscopía donde se observó que a las 72 h del co-cultivo ya no había presencia de esporas y se encontraba en el caldo solo micelio disperso y en forma de pellets. Por lo cual, el incremento en la biomasa fue causado por el crecimiento de *Trichoderma viride*.

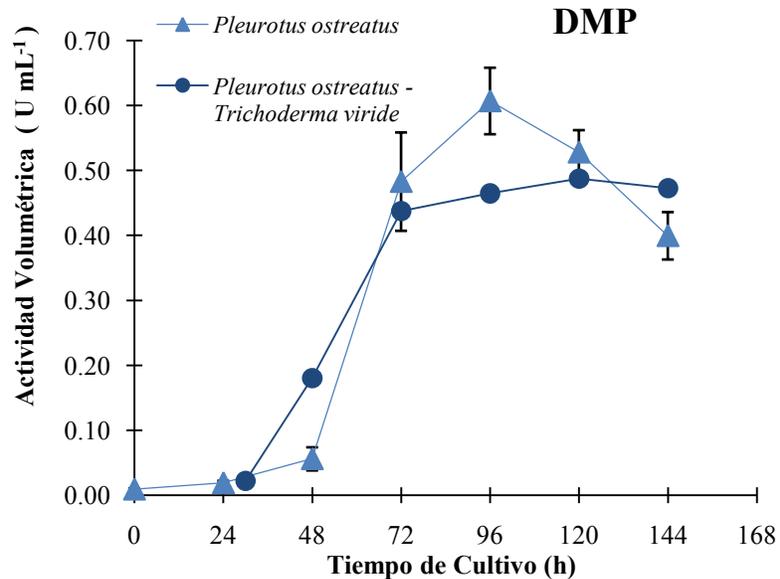
## 6.5.2 Producción de Lacasa

Para determinar la influencia de la presencia de *Trichoderma viride* en la enzima sintetizada por *Pleurotus ostreatus*, se evaluó la producción de la lacasa, midiendo la actividad enzimática con los distintos sustratos, cada 24 horas de transcurrida la fermentación.

### 6.5.2.1 Evaluación de la Actividad Enzimática

El perfil de actividad se muestra en la **figura 6.11**, donde se puede observar que no existió incremento en la producción de la enzima. Sin embargo, como se muestra en el gráfico la síntesis de la enzima se incrementó ligeramente con respecto al control después de la inoculación de *T. viride*. El aumento de la actividad (evaluada con DMP), fue 3 veces más con respecto al control a las 18 horas de iniciado el co-cultivo. El efecto de una síntesis más temprana de la enzima por inducción biológica fue reportado previamente en co-cultivos de *Pleurotus ostreatus-Trichoderma longibrachiatum* (Velázquez-Cedeño, 2004). Posteriormente a las 72 h la actividad en ambos cultivos fue igual y en el co-cultivo la actividad se mantiene sin aumentar significativamente.

A diferencia del descenso de actividad encontrado en los cultivos control, en los co-cultivos se observó que una vez que se ha alcanzado la actividad máxima no se presentó una disminución significativa de la actividad enzimática. La tendencia de estabilidad en la actividad se encontró en la oxidación de los cuatro sustratos. Esta estabilidad obtenida con interacción biológica se reportó en cultivos de *P. ostreatus* y *Trametes sp.* con *Trichoderma sp.* (Velázquez-Cedeño, 2007; Zhang *et al.*, 2006). Las actividades volumétricas obtenidas con ABTS, GUAI y SGZ se encuentran en el **apéndice 7**.



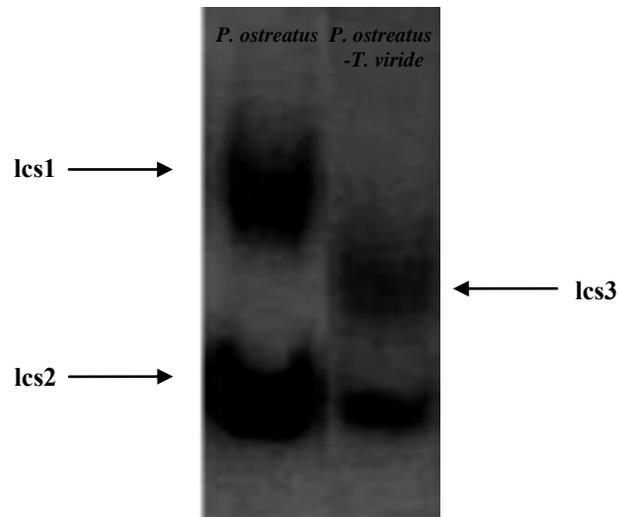
**Figura 6.11.** Actividad Volumétrica de lacasa evaluada con DMP, producida por *P. ostreatus* y en co-cultivo con *T. viride*, medio líquido.

### 6.5.3 Concentración del Extracto Crudo

Para obtener el extracto crudo de la lacasa producida en el co-cultivo se siguió la misma estrategia que la realizada en los cultivos control. Primeramente se eliminó el micelio, después se sometió al extracto crudo a ultrafiltración obteniéndose dos fracciones (10-100kDa y >100kDa) y se realizó el balance de actividad con los cuatro sustratos. Posteriormente se realizó la liofilización. Debido a que se obtuvieron mayores rendimientos en la fracción de 10-100 kDa, ésta se utilizó en las siguientes etapas. El balance tanto de ultrafiltración y liofilización se reportan en el **apéndice 8**.

### 6.5.4 Análisis Electroforético

Para conocer el perfil de lacasas obtenidas en los co-cultivos se realizaron los gels de actividad. Como podemos observar en la **figura 6.12**, continúan presentándose dos bandas de actividad. No obstante, el patrón de éstas cambió. Si bien la banda inferior presenta la misma movilidad electroforética que lcs2, la banda superior tiene una mayor migración que lcs1.

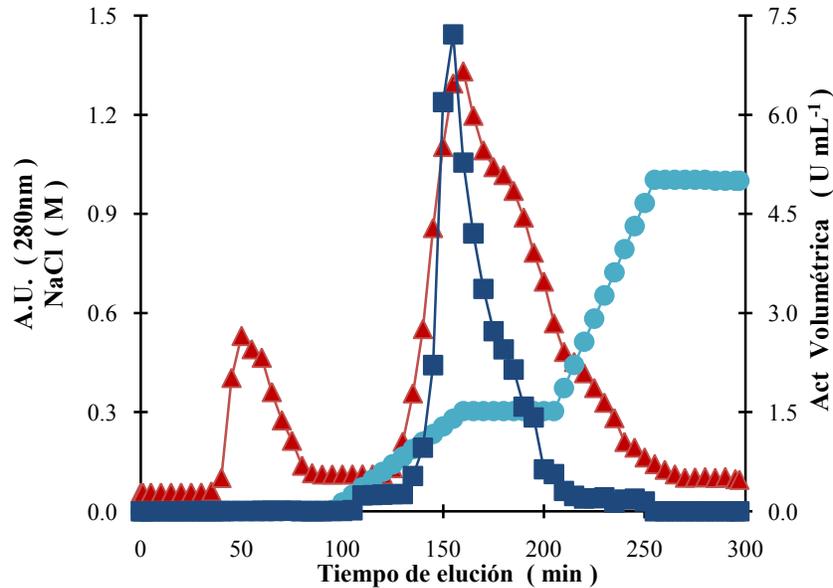


**Figura 6.12.** Gel nativo de poliacrilamida revelado con DMP.

La modificación en el Rf puede sugerir la presencia de una enzima con actividad lacasa distinta a lcs1. Este cambio en el patrón de bandeo puede explicarse por dos efectos, la inducción de una nueva proteína o bien la modificación de una proteína ya sintetizada (Zhang *et al.*, 2006; Savoie *et al.*, 1998). En este caso, con los tiempos de muestreo, en los geles nativos no se observó claramente en qué momento se inició la represión de lcs1 y la inducción de la nueva banda denominada lcs3. Por lo cual, se decidió realizar un cultivo sólo con el sobrenadante donde creció *P. ostreatus* e inocular *T. viride*, con esto, se buscaba verificar si el cambio se debía a una modificación sobre la proteína sintetizada previamente. Con el experimento se obtuvieron nuevamente dos bandas de actividad y la movilidad electroforética de la banda superior se encontró muy cercana a la de lcs3 (gel no mostrado). Aún cuando el Rf no fue exactamente el mismo, con esa evidencia consideramos que lcs3 fue generada durante el co-cultivo debido a la acción de *Trichoderma viride* sobre la isoforma lcs1, a través de la acción de proteasas o glicosidasas, sin alterar significativamente la actividad. Se realizó la purificación y caracterización de lcs3 para conocer si el procesamiento al que fue sometida esta enzima tuvo impacto en alguna de sus propiedades.

### 6.5.5 Purificación

Para la purificación de lcs3 se utilizaron los mismos pasos cromatográficos que en el caso de las enzimas del cultivo control. Como primer paso se realizó una cromatografía de intercambio iónico, con DEAE. El primer gradiente salino se llevó a cabo de 0-0.3 M NaCl y se mantuvo durante 1 CV, posteriormente se incrementó la concentración a 1 M NaCl.

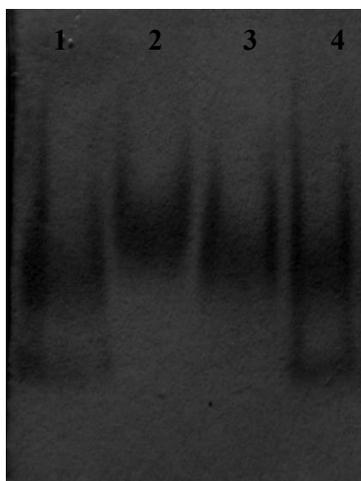


**Figura 6.13.** Perfil de separación de las enzimas con actividad lacasa, producida por *P. ostreatus*, en cultivo con *T. viride*. Cromatografía de intercambio aniónico. Las fases móviles fueron: amortiguador fosfatos, pH 6, 10 mM y el mismo amortiguador con 0.3 M NaCl y 1 M de NaCl, con un flujo de 1 mL/min.

- Actividad Volumétrica (medida con ABTS)
- ▲ Absorbancia 280 nm
- NaCl

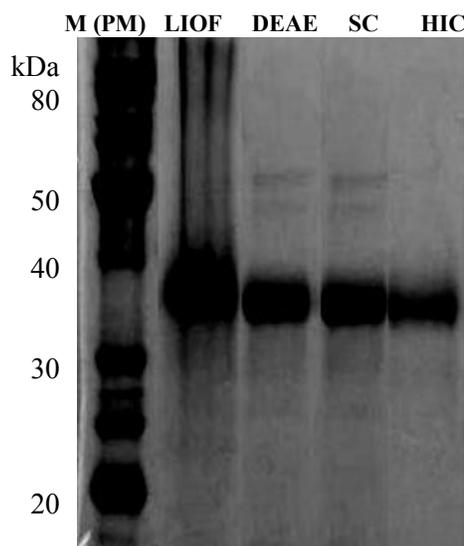
El perfil de elución se muestra en la **figura 6.13**, se detectaron dos fracciones de proteínas por absorbancia a 280 nm. La primera fue eluida solo con buffer de fosfatos y la segunda durante el gradiente salino. Sin embargo, se resolvió un solo pico de actividad, el cual se obtuvo a una concentración de 0.15 – 0.3 M de NaCl. El incremento de la concentración salina fue necesario para eliminar fracciones con pigmento que no fueron reactivas con los distintos sustratos, pero si presentaron absorbancia a 280 nm.

El análisis con geles nativos PAGE [**figura 6.14**] reveló que las primeras fracciones del pico de actividad presentan solo la banda lcs3 y posteriormente se encuentran ambas bandas en el resto de las fracciones. Posteriormente, se realizaron diversas cromatografías modificando el gradiente, ya sea haciéndolo de manera lineal, o escalonado a diversas concentraciones salinas. También se llevo a cabo la cromatografía a otros valores de pH (5, 7, 8). No obstante, con estas modificaciones nuevamente solo algunas fracciones presentaban lcs3 y en el resto se encontraban lcs2 y lcs3. Sin embargo, como el objetivo principal con esta cromatografía era el separar lcs3, lo cual se logró, se decidió continuar con los siguientes pasos de purificación de la enzima lcs3.



**Figura 6.14.** Gel nativo PAGE. En el carril 1 se colocó la muestra liofilizada. En el carril 2 se cargó la muestra correspondiente al tiempo del minuto 140, en el carril 3 la del minuto 155 y el carril 4 corresponde al minuto 165.

La cromatografía de tamiz molecular nos permitió nuevamente eliminar el pigmento café rojizo. Finalmente, con la cromatografía de interacción hidrofóbica se obtiene una sola banda intensa de proteína y dos más en muy baja concentración. Como en este caso nuevamente solo una de las bandas presentó actividad se decidió iniciar la caracterización de lcs3. Con respecto al peso molecular éste se estimó en 35 kDa. La curva para la estimación del peso molecular se encuentra en el **apéndice 6**. En la **figura 6.15** se muestra el gel SDS PAGE del avance de la purificación de lcs3 y el resumen de los tres pasos cromatográficos se encuentran en la **tabla 6.6**.



**Figura 6.15.** Gel SDS PAGE (10%). Carril 1 marcadores de pesos moleculares. En el carril 2 muestra liofilizada, en los carriles 3, 4 y 5 lcs3 sometida a los tres pasos cromatográficos.  
 DEAE Cromatografía de intercambio iónico  
 SC Cromatografía de tamiz molecular  
 HIC Cromatografía de interacción hidrofóbica

**Tabla 6.6** Resumen de las etapas de purificación de la enzima lcs3 (Balance Global).

<i>Etapa</i>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Actividad Total (U)</b>	<b>Actividad Específica (U/mg)</b>	<b>Factor de Purificación</b>	<b>Rendimiento %</b>
Liofilizado	30.0	75.76	2.53	--	100
DEAE-SEPHAROSE	7.85	30.0	3.82	1.51	39.6
SEPHACRYL 300 HR	3.54	23.12	6.53	2.58	30.5
HIC	1.82	16.76	9.21	3.64	22.1

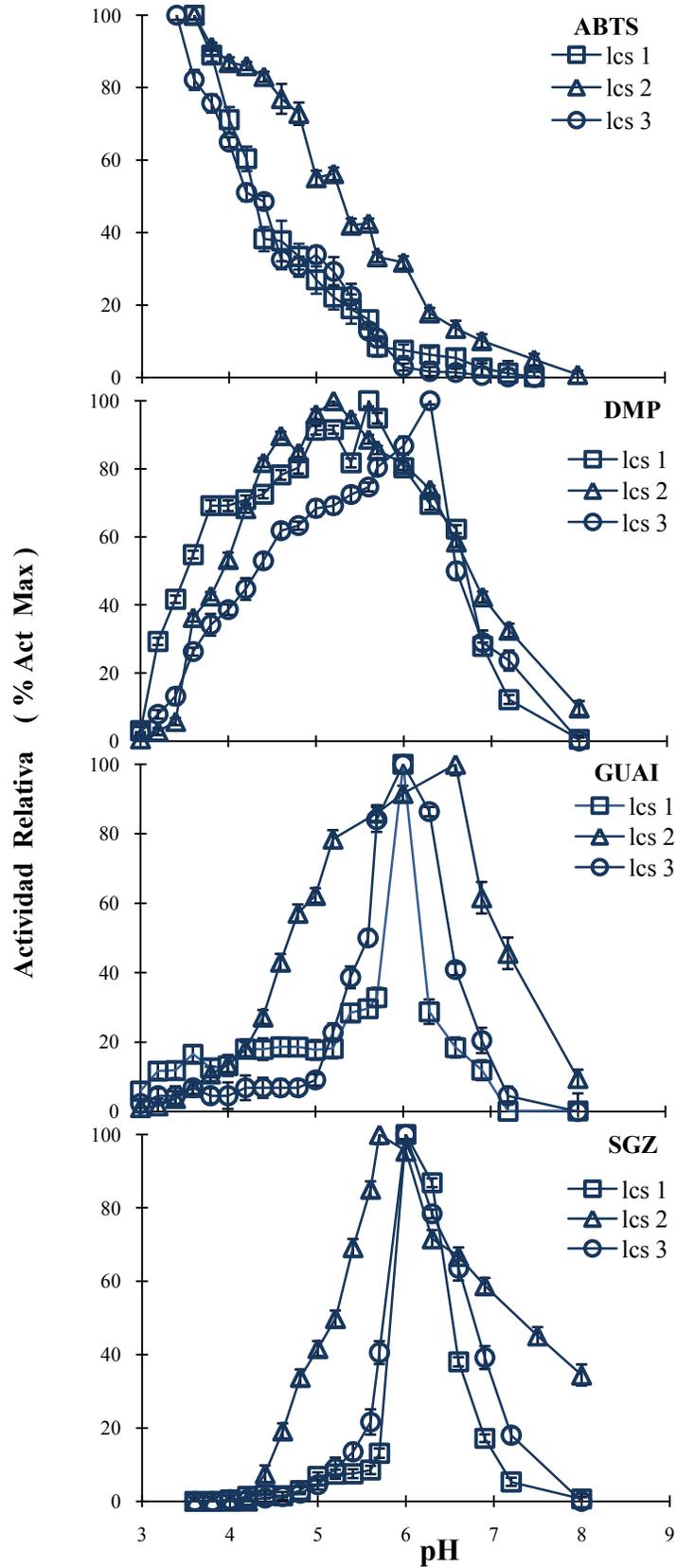
## 6.6 Caracterización de las enzimas con actividad Lacasa

Para la caracterización de pH, temperatura y afinidad por sustratos de lcs1, lcs2 y lcs3, se utilizaron cuatro de los sustratos típicos de lacasa: ABTS, DMP, GUAI y SGZ.

### 6.6.1 Perfil de pH

Debido a que la actividad enzimática está influida significativamente por el valor del pH, se evaluó la actividad utilizando soluciones amortiguadoras en el intervalo de 2.2 a 8.

Con respecto a la oxidación de ABTS, se puede observar en la **figura 6.16** que la actividad máxima para las tres enzimas se encuentra localizada en el intervalo ácido y al incrementar el pH la actividad disminuye constantemente. Este comportamiento de la actividad en función del pH, en la oxidación de sustratos no fenólicos, es una característica de las lacasas, debido a que al tratarse de una oxidación la cual no involucra protones, el decaimiento monotónico al incrementar el pH se debe principalmente a la unión de  $\text{OH}^-$  al centro T2/T3 causando inhibición (Xu, 1997). El valor obtenido para las tres enzimas es comparable con la mayoría de las lacasas fúngicas, las cuales presentan un pH óptimo alrededor de 3 (Das *et al.*, 2001; Farnet *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2002; Palmieri *et al.*, 1997). La máxima actividad para las tres enzimas se encontró alrededor de 3.6, sin embargo, lcs2 fue más activa en un mayor intervalo, a pH 6.0, lcs2 mantiene el 30% de la actividad máxima mientras lcs1 y lcs3 solo exhiben aproximadamente el 5%. Esto nos indica que lcs2 es más tolerante que lcs1 y lcs3 a la inhibición por iones hidroxilo. La modificación a la cual fue sometida lcs1 durante el co-cultivo, ahora caracterizada como lcs3, no tuvo efecto sobre el perfil de actividad-pH en la oxidación de ABTS.



**Figura 6.16.** Perfiles de pH de las enzimas lcs1, lcs2 y lcs3 con la oxidación de ABTS, DMP, SGZ y GUAI. (Las determinaciones se realizaron por triplicado).

Cuando la actividad es evaluada con la oxidación de sustratos fenólicos, la mayoría de las lacasas fúngicas presentan pH óptimo entre 4 y 6, y se pierde rápidamente la actividad, cuando el pH se incrementa por arriba de 6 (Chefetz *et al.*, 1998; Palmieri *et al.*, 1993; Xu, 1997). Las tres enzimas, presentaron el típico perfil de campana en la oxidación de los sustratos fenólicos. Este comportamiento bifásico puede ser explicado por dos fenómenos. El primero es la diferencia del potencial redox entre el sustrato y el cobre Tipo 1 en el centro catalítico de la enzima. Aquí la velocidad de transferencia es favorecida para los sustratos fenólicos a pH ácido. El segundo es generado por la unión de iones hidróxido al centro de cobre Tipo 2/Tipo 3, lo cual inhibe la unión de O<sub>2</sub> y por lo tanto se inhibe la actividad a pH alcalino (Wahleithner *et al.*, 1996; Xu, 1997).

El comportamiento de lcs3 en la oxidación de sustratos fenólicos, no mostró gran diferencia al presentado por lcs1, con lo que se corrobora que el procesamiento de ésta enzima no alteró su actividad en función del cambio de pH. La enzima lcs2 presentó un perfil de actividad más amplio con los tres sustratos fenólicos, esta conducta como mencionamos para la oxidación de ABTS, puede indicar que para la inhibición por OH<sup>-</sup> se requiere una mayor concentración de estos iones para lcs2. De manera general, se observó que mientras lcs2 mantiene del 30 al 60% de la actividad máxima a valores de pH altos (7-8), lcs1 y lcs3 presentan solo el 25% o no hay actividad, dependiendo del sustrato utilizado.

Particularmente, las tres enzimas presentaron actividades máximas con DMP a un valor de pH ligeramente menos ácido (5.2 - 6.3) al valor promedio (pH 4.0) reportado para otras lacasas fúngicas (Baldrian, 2006).

### 6.6.2 Perfil de Temperatura

Para determinar la temperatura óptima de oxidación de los cuatro sustratos ensayados para las tres enzimas, se evaluó la actividad enzimática en un intervalo de 15 a 75°C. Los perfiles obtenidos se muestran en la **figura 6.17**. Con los cuatro sustratos, las tres enzimas fueron activas en todo el intervalo de temperatura ensayado. Se detectó actividad significativa desde 15 hasta 75°C. Una característica comúnmente observada en catálisis de enzimas, es que la actividad enzimática de las lacasas incrementa al aumentar la temperatura alrededor de 55°C, posteriormente se presenta termoinactivación.

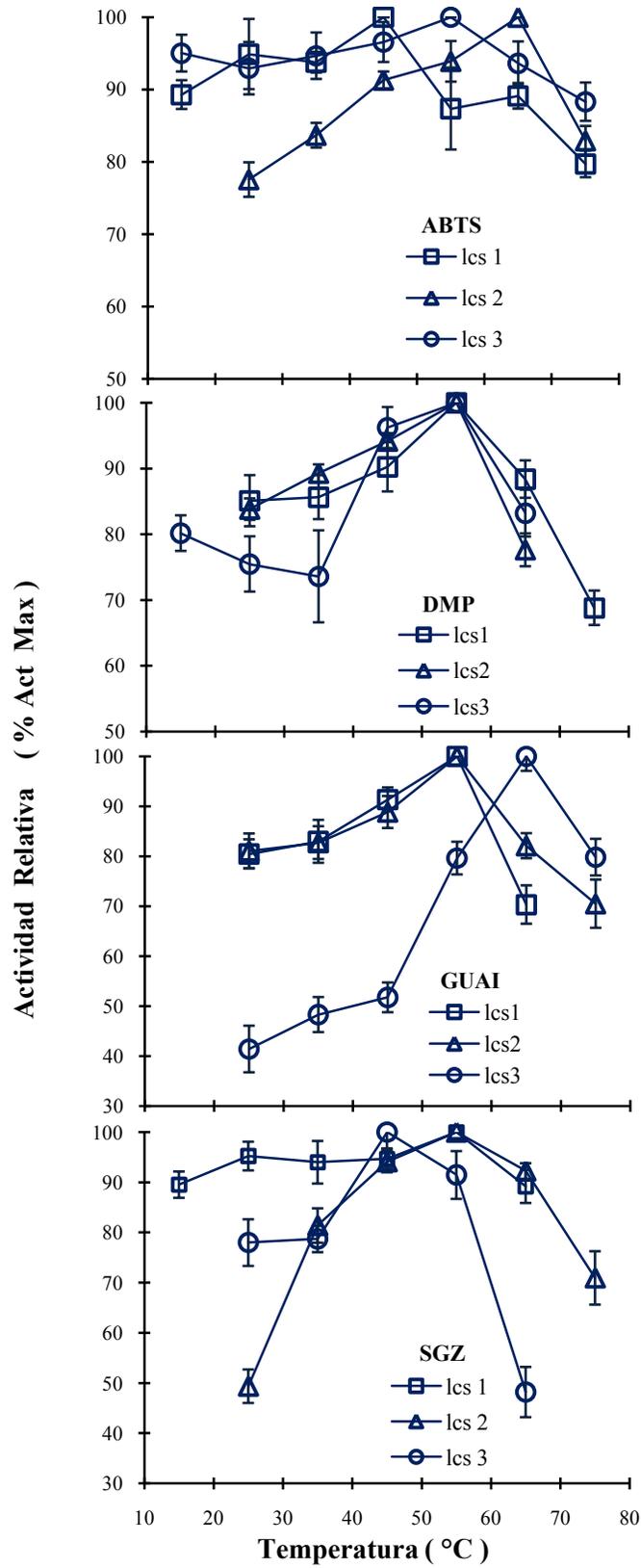


Figura 6.17. Perfiles de Temperatura de lcs1, lcs2 y lcs3 con la oxidación de ABTS, DMP, GUAI y SGZ. (Las determinaciones se realizaron por triplicado).

El incremento de la actividad lacasa al aumentar la temperatura, fue observado en la oxidación de los de cuatro sustratos con las tres enzimas, encontrándose las máximas actividades en el intervalo de los 45 a 55°C. Estas temperaturas óptimas de actividad se encuentran dentro del intervalo reportado para distintas lacasas fúngicas. Donde generalmente la temperatura óptima se presenta entre 50 y 60°C, sin embargo existen reportes de enzimas con actividad máxima a los 35 y 25°C (Baldrian, 2006). Un comportamiento importante de señalar, es que las enzimas mantuvieron alrededor del 60% (promedio de las tres enzimas con los cuatro sustratos) de la actividad máxima por arriba de los 60°C, temperatura a la cual se ha documentado que se presenta una caída drástica en la actividad. Esta pérdida de actividad enzimática, se ha reportado es causada por cambios conformacionales de los cobres T1 y T2, principalmente por la liberación del cobre T2 a 70°C (Koroleva *et al.*, 2001).

### 6.6.3 Termoestabilidad

Para determinar la estabilidad de las tres enzimas con respecto a la temperatura, se incubaron a 40, 50, 60 y 70°C. A 40°C no se presentó una caída significativa de la actividad, se decidió iniciar los ensayos de termotolerancia a partir de esta temperatura debido los perfiles de algunas lacasas fúngicas, cuya vida media se encuentra alrededor de 7 horas a 40°C o 30 minutos a 50°C. Contrario a esto, las tres enzimas fueron estables, especialmente lcs1 aún cuando se mantuvo en incubación por 24 horas, no mostró pérdida de actividad. Por tal motivo, no se presenta la vida media de las enzimas a esa temperatura. El  $t_{1/2}$  de las tres enzimas esta reportado en la **tabla 6.7**. Los perfiles de estabilidad térmica se encuentran en el **apéndice 9**.

El comportamiento de las tres enzimas a 50, 60 y 70°C mostró diferencias de estabilidad, particularmente lcs1 y lcs3 fueron más termoestables que lcs2. La disminución en la actividad de lcs2 a 50°C, llevó a esta enzima a conservar el 50% de su actividad máxima a 1.8 horas de incubación. A 60 y 70°C lcs2 mostró una drástica pérdida de actividad, por lo cual su vida media se redujo a 20 minutos y minuto y medio respectivamente. Esta estabilidad de lcs2 es comparable a lo reportado para otras lacasas fúngicas donde la vida media fluctúa entre 10 y 30 minutos a 50 y 60°C (Marques de Souza y Peralta, 2003; Nagai *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2000; Quarantino *et al.*, 2007; Ullrich *et al.*, 2005).

**Tabla 6.7** Tiempos de vida media determinados para las enzimas (lcs1, lcs2 y lcs3) de *P. ostreatus* CP-50.

Temperatura (°C)	$t_{1/2}$ ( h )		
	lcs1	lcs2	lcs3
50	57.8	1.8	42.7
60	1.9	0.4	2.2
70	0.3	0.01	0.5

Los valores de vida media para lcs1 y lcs3 a las distintas temperaturas fueron muy similares, encontrándose en ambas enzimas alta estabilidad tanto a 50 y 60°C. Al comparar con otras isoformas de lacasas tanto lcs1 y lcs3 fueron más estables a 60°C (Das *et al.*, 2001; Galhaup *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2005; Iyer y Chattoo 2003; Jung *et al.*, 2002; Palmieri *et al.*, 1993; Palmieri *et al.*, 1997; Wood, 1980). Además la estabilidad a 50 y 70°C fue similar a la reportada para lacasas de hongos termófilos de los géneros *Chaetomium thermophilum* y *Melanocarpus albomyces* (Chefetz *et al.*, 1998; Kiiskinen *et al.*, 2002).

Con respecto al procesamiento al que fue sujeta lcs1 en el co-cultivo y denominada como lcs3, encontramos en este ensayo que no se alteró su termoestabilidad, así que al comparar la vida media de ambas enzimas ésta no difiere significativamente.

Para explicar la disminución de actividad a 60 y 70°C de lcs2, se debe recordar que las lacasas suelen presentar un perfil muy característico de actividad en función de la temperatura, donde al incrementarse ésta, la actividad enzimática se ve favorecida hasta llegar a un valor en el cual la actividad disminuye drásticamente. Esta caída en la actividad se presenta generalmente en el intervalo de 55-65°C y puede ser causada por cambios conformacionales en los sitios de cobre T1 y T2. Se ha reportado que la termoinactivación se debe particularmente a la liberación del cobre T2 y que los cobres del sitio T1 y T3 se encuentran desintegrados a temperaturas la actividad de lacasas mayores de 70°C (Koroleva *et al.*, 2001).

La pérdida de cobres a temperaturas superiores a 65°C, resulta contradictorio con la estabilidad térmica mostrada por lcs1 y lcs3, sin embargo, en la literatura de enzimas termotolerantes se ha postulado que existen varios factores físico-químicos que proveen la termoestabilidad, entre los que se encuentran: grado de hidrofobicidad, alto contenido de estructuras alfa, mayor densidad de puentes de hidrogeno y salinos, distribución de residuos cargados en la superficie y proporción de ciertos aminoácidos. Existe en particular un reporte de estudios estructurales de una lacasa

termoestable y al ser comparada con otras oxidasas multicobre, muestra numerosas interacciones hidrofóbicas entre los tres dominios y un alto contenido de prolina, lo cual puede actuar en coordinación con el alto grado de compactación y con ello proporcionar alta termoestabilidad (Enguita *et al.* 2003).

#### 6.6.4 Especificidad de Sustratos

Las velocidades iniciales de reacción de la actividad de las enzimas fueron determinadas a diferentes concentraciones de sustrato. Para ABTS se utilizó de 0-4 mM, con DMP de 2-20 mM, de 0-40 mM para GUAI y con SGZ de 0-100  $\mu$ M. Las velocidades fueron graficadas contra la concentración de sustrato para determinar si la concentración de enzima obedece a una cinética de Michaelis-Menten. La velocidad de reacción a las diferentes concentraciones de los distintos sustratos mostró que las tres enzimas exhiben una cinética de Michaelis-Menten. Los valores de las constantes  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron determinadas mediante un ajuste no lineal por medio del programa Origin (Microcal, USA).

Los valores de  $K_m$  (**Tabla 6.8**) de lcs1 hacia los distintos sustratos fue en el orden de SGZ<ABTS<GUAI<DMP, la afinidad de lcs2 se encontró SGZ>DMP>ABTS>GUAI y con lcs3 la afinidad mostrada fue SGZ>ABTS>DMP>GUAI. Las tres enzimas presentaron diferencias en la afinidad por los sustratos. Particularmente, lcs2 mostró mayor actividad que las otras enzimas, con los sustratos fenólicos, por ejemplo la oxidación de DMP se ve favorecida 19 y 10 veces comparando con lo observado con lcs1 y lcs3 respectivamente. Con respecto a la oxidación del ABTS el valor de  $K_m$  para lcs2 fue 3.7 veces mayor que el obtenido tanto para lcs1 y lcs3.

Al analizar la influencia del número de sustituyentes del anillo aromático se observa que al comparar GUAI y DMP la adición de un segundo grupo metoxi incrementa la afinidad tanto en lcs2 y lcs3. El mismo efecto se observó con SGZ, obteniéndose los valores más bajos de  $K_m$  con las tres enzimas, siendo este sustrato un dímero del DMP.

Las distintas afinidades por los sustratos fenólicos de las tres enzimas, pueden ser explicadas por diferencias en sus potenciales redox. Esta hipótesis surge por el comportamiento de las lacasas en la oxidación de sustratos fenólicos, se ha documentado que la afinidad por el sustrato tiende a incrementar cuando el  $\Delta E_o$  incrementa, ya sea por el incremento en  $E_o$  [lacasa] o por la

disminución de  $E_o$  [sustrato] (Xu *et al.*, 2000). Con este fenómeno, se puede explicar el porqué se obtienen valores de  $K_m$  menores con una misma enzima al disminuirse el potencial redox, debido al sustrato evaluado. Por otra parte, al comparar las diferencias de afinidades por un mismo sustrato con las tres enzimas, podemos inferir de manera general que lcs2 debe presentar un mayor potencial redox, ya que con los tres sustratos fenólicos ensayados esta enzima exhibió los valores más bajos de  $K_m$ .

**Tabla 6.8** Parámetros cinéticos lcs1, lcs2 y lcs3 para cuatro sustratos.

Enzima	lcs1		lcs2		lcs3	
	Km ( $\mu\text{M}$ )	Vmax ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	Km ( $\mu\text{M}$ )	Vmax ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	Km ( $\mu\text{M}$ )	Vmax ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
ABTS	40	223.1	132	385.3	35	524.7
DMP	1864	196.35	96.6	393	983	189.4
GUAI	910	6.4	354	1236.5	1208	7.0
SGZ	18.7	41.9	2.1	19.95	4.1	10.8

Para determinar el efecto del procesamiento de una de las enzimas por parte de *Trichoderma viride* se compararon lcs1 y lcs3. Siendo ésta última la enzima procesada durante el co-cultivo, observándose principalmente un incremento en la afinidad en DMP y SGZ. Donde se obtuvieron disminuciones del valor de  $K_m$  del 50 y 20 por ciento respectivamente. Este aumento en la reactividad podría estar relacionado con un corte generado en alguno de los extremos de la proteína. Como se mencionó en el apartado 6.5.4, por acción de enzimas de *Trichoderma viride*. Esta hipótesis surge tomando como antecedente estudios con lacasas truncadas, en los cuales se ha encontrado que la eliminación de algunos aminoácidos en la región C terminal provocó cambios en el potencial redox de la proteína (Gelo-Pujic *et al.*, 1999). Además análisis realizados con mutantes de lacasas, mostraron que el cambio de ciertos aminoácidos puede conducir no solo a modificaciones en el potencial redox, también a una disminución o incremento en la afinidad de la proteína por ciertos sustratos, (Xu *et al.*, 1998; Festa *et al.*, 2007).

Al comparar las afinidades obtenidas de las tres enzimas con otras lacasas fúngicas (**Tabla 6.9**), encontramos que en la oxidación de SGZ el valor de  $K_m$  obtenido con lcs2 es más bajo al mínimo

reportado hasta ahora. Al realizar la comparación particularmente con otras isoformas de *Pleurotus ostreatus*, se observó que las tres enzimas exhibieron al menos con alguno de los sustratos valores de Km más bajos. Específicamente la enzima lcs2 es más reactiva con DMP, GUAI y SGZ.

Los datos experimentales y el ajuste por regresión no-lineal de las tres enzimas para cada uno de los cuatro sustratos se encuentran ilustrados en el **apéndice 10**.

**Tabla 6.9** Comparación de Km de las enzimas de *Pleurotus ostreatus* (CP-50) con otras lacasas fúngicas y con isoenzimas de otras cepas de *Pleurotus ostreatus*.

Enzima	Km ( $\mu\text{M}$ )			
	ABTS	DMP	GUAI	SGZ
Isoenzimas (Fúngicas) *	4	26	4	3
	-	-	-	-
	770	14 720	30 000	4 307
Isoformas <sup>+</sup> ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	70	230	550	20
	-	-	-	-
	280	14 000	3 100	220
<b>lcs1</b>	40	1864	910	18.7
<b>lcs2</b>	132	96.6	354	2.1
<b>lcs3</b>	35	983	1208	4.1

\* Baldrian, P (2006) *FEMS Microbiology Reviews* **30**:215-242.

<sup>+</sup> Palmieri *et al.*, (1993) *Appl Microbiol Biotechnol.* **39**:632-636; Palmieri *et al.*, (1997) *J Biol Chem.* **272**: 31301-31307; Palmieri *et al.*, (2003) *Enzyme Microb Technol.* **33**:220-230.

Para cada sustrato se presentan los valores mínimos y máximos reportados.

**Tabla 6.10** Resumen de las propiedades determinadas de las enzimas lcs1, lcs2 y lcs3.

Enzima	MW (kDa)	t <sub>1/2</sub> (h) (60°C)	Km ( $\mu\text{M}$ )			
			ABTS	DMP	GUAI	SGZ
<b>lcs1</b>	44	1.96	40	1864	910	18.7
<b>lcs2</b>	27	0.34	132	96.6	354	2.1
<b>lcs3</b>	35	2.19	35	983	1208	4.1

En la **tabla 6.10** se presentan las propiedades más relevantes de la caracterización de las tres enzimas con actividad de lacasa purificadas de los cultivos de *P. ostreatus* y *P. ostreatus*- *T. viride*. Al realizar un análisis de estas características con lo reportado sobre otras lacasas fúngicas, encontramos que los pesos moleculares son evidentemente más pequeños, sin embargo presentaron actividad con los cuatro sustratos más representativos de las lacasas. Además mostraron los perfiles de oxidación para sustratos fenólicos y no-fenólicos (en función del pH) característicos de lacasas.

Como mencionamos anteriormente existen algunos reportes de lacasas fúngicas cuyos pesos moleculares oscilan entre los 43 y 46 kDa (Baldrian, 2006; Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2008). Si bien se han caracterizado estas enzimas con respecto a sus propiedades catalíticas, no se ha realizado un estudio estructural detallado que nos indique el porqué de la diferencia en peso molecular, al promedio reportado que se encuentra entre los 60 y 80 kDa. Estos pesos moleculares tan pequeños podrían indicarnos que se trata de una lacasa distinta estructuralmente a las reportadas, las cuales regularmente presentan tres dominios. Hasta ahora se ha reportado, en algunas bacterias la presencia de oxidasas multicobre, cuyos pesos moleculares se determinaron en 34 y 37 kDa. Sin embargo, la característica estructural de estas enzimas es que están formadas solo por dos dominios. La diferencia de pesos en proteínas de dos y tres dominios es evidente siendo de 60-75 kDa y de 30-40 kDa respectivamente. Otra característica importante de señalar de estas oxidasas pequeñas, es que además de mostrar actividad sobre los sustratos típicos de lacasas, presentan cuatro átomos de cobre por monómero como las lacasas de 60-80 kDa, no obstante la coordinación del cobre es diferente. Se ha documentado además del peso molecular otra diferencia importante, el análisis de secuencia del amino terminal ha evidenciado que en un mismo número de dominios se presenta alta identidad, sin embargo al comparar oxidasas de dos y tres dominios el grado de identidad es bajo (Komori *et al.*, 2009; Nakamura y Go, 2005). Con estas referencias podríamos hipotetizar que las enzimas de *Pleurotus ostreatus* CP-50 pueden encontrarse entre las oxidasas multicobre de dos dominios y para tener evidencias más firmes de esto deberán realizarse los análisis de secuencia, así como del contenido de cobre y con ello definir a qué grupo de oxidasas multicobre pertenecen.

## Conclusiones

La producción de la lacasa por la cepa de *Pleurotus ostreatus* (CP-50), bajo las condiciones establecidas en este estudio, se presenta asociada al crecimiento y una vez que el microorganismo ha entrado a la fase estacionaria, la actividad de la enzima disminuye considerablemente.

Durante los co-cultivos no existió incremento en la actividad enzimática, sin embargo se modificó el patrón de enzimas con actividad de lacasa sintetizadas por *Pleurotus ostreatus* CP-50.

La columna con DEAE-SEPHAROSE permitió separar las tres enzimas con actividad lacasa, con rendimientos y factores de purificación promedios del 37% y 1.6 respectivamente.

La Cromatografía de Exclusión Molecular permitió la eliminación del pigmento anaranjado asociado a las enzimas con actividad de lacasa.

Los pesos moleculares se determinaron en 44 para lcs1, 27 lcs2 y 35 kDa para lcs3. Siendo particularmente lcs2 la enzima fúngica con actividad de lacasa más pequeña hasta ahora reportada.

Las enzimas lcs1 y lcs3 mostraron remarcable estabilidad a altas temperaturas, siendo su termoestabilidad comparable con lacasas sintetizadas por hongos termófilos.

La enzima lcs2 exhibió alta reactividad hacia los sustratos fenólicos estudiados, siendo sus valores de Km menores a los reportados para otras isoformas de *Pleurotus ostreatus*.

Las enzimas lcs1 y lcs3 fueron más reactivas que lcs2 con ABTS, encontrándose el valor de Km entre los más bajos reportados.

La edición de lcs3 generada por la acción de *Trichoderma viride*, no provocó cambios en la estabilidad térmica, ni en su perfil de oxidación con los sustratos evaluados, sin embargo se incrementó la afinidad por los sustratos fenólicos DMP y SGZ.

## Perspectivas

Con el estudio realizado con la cepa de *Pleurotus ostreatus* (CP-50), se observó que el crecimiento del hongo en las dos condiciones de fermentación (agitación) ensayadas fue muy pobre, llegando a afectar negativamente la productividad del cultivo. Por lo cual, resultaría conveniente estudiar el efecto de algunos nutrientes en el medio de cultivo para incrementar la biomasa y por consiguiente mejorar la productividad. Entre algunas de las modificaciones que se pueden ensayar son fuentes alternas de carbono como la glucosa, celobiosa, papa dextrosa y xilosa. Además, la adición de fuentes orgánicas externas de nitrógeno como son la peptona, el extracto de levadura, triptona, asparagina. Entre otras modificaciones que pudieran realizarse al medio de cultivo se encuentran el uso de compuestos químicos tales como el Cobre, el ácido ferúlico, la vainillina, así como algunos compuestos fenólicos derivados de lignina y determinar su efecto sobre la actividad y el patrón de isoformas.

Con respecto al análisis realizado en este trabajo de las enzimas con actividad de lacasa, se propone efectuar una caracterización más detallada de las tres proteínas. Primeramente, se deberán purificar a homogeneidad las enzimas. Entre los estudios que nos permitirían una comparación más crítica de las enzimas, se sugiere el análisis del contenido de metal, con lo cual conoceremos si existen los tres tipos de cobre o bien se trata de enzimas con otros metales como es el caso de una lacasa amarilla de una cepa de *P. ostreatus*. La determinación del potencial redox nos dejará explicar al menos en parte las diferencias de afinidad entre las enzimas con un mismo sustrato. También deberán realizarse análisis estructurales, para conocer el porcentaje y tipo de azúcares, composición y secuencia de aminoácidos. Al conocer la secuencia se podrá determinar la homología entre las tres proteínas, así como con otras lacasas fúngicas y otras oxidasas multicobre de dos o tres dominios.

Para evaluar las capacidades catalíticas sería conveniente examinar el efecto de inhibidores y mediadores de lacasas. Así como la oxidación de sustratos no fenólicos y fenólicos con diferentes potenciales redox, especialmente compuestos xenobióticos. Además evaluar la dependencia de las enzimas sobre la especificidad en la reducción del oxígeno molecular.

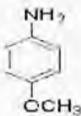
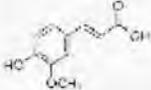
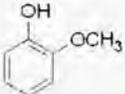
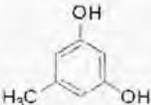
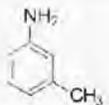
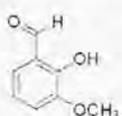
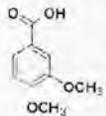
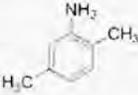
En relación a la generación de lcs3, deberá también caracterizarse al grado que podamos explicar la edición a la que fue sometida, comparando con lcs1 y buscando aquella secuencia que fue reconocida por los metabolitos de *T. viride* (proteasas/glucanasas) y que seguramente no se encuentra en lcs2, ya que ésta no fue procesada. La secuencia de lcs3 y su potencial redox nos darán evidencia para explicar el

incremento en las afinidades por DMP y SGZ. Para entender más claramente el procesamiento ocurrido en los co-cultivos se propone realizar cultivos con inhibidores de proteasas y con esto definir la naturaleza del corte.

Al caracterizar detalladamente y evaluar las capacidades de las diferentes enzimas podremos sugerir algunas aplicaciones particulares en las distintas áreas biotecnológicas, donde la catálisis oxido-reducción se realiza.

## Apéndice 1

## Toxicidad de inductores

Compuesto	Estructura Química	Toxicidad	Efectos Potenciales para la Salud		
			Inhalación	Piel	Ojos
p-Anisidina		LD50 (ipr-mus) 806 mg/kg Exposición crónica: cancerígeno (IARC)	Mortal. Irritante para mucosas y tracto respiratorio superior.	Mortal al absorberse. Irritación.	Irritación.
Ac Ferúlico		DL50 (ipr-mus) 194 mg/kg	Nocivo. Irritación del tracto respiratorio.	Nocivo. Irritación.	Irritación.
Guayacol		DLLo (orl-man) 43 mg/kg	Nocivo. Destructivo para mucosas y tracto respiratorio superior.	Nocivo. Provoca quemaduras.	Provoca quemaduras.
Orcinol		DL50 (orl-rat) 844 mg/kg	Nocivo. Irritación del tracto respiratorio.	Nocivo. Irritación.	Irritación.
p-Toludina		DL50 (orl-rat) 336 mg/kg	Mortal. Irritación del tracto respiratorio	Tóxico.	Irritación.
Vainillina		LD50 (ipr-rat) 347 43 mg/kg Exposición crónica: probablemente cancerígeno (IARC)	Nocivo. Irritante para mucosas y tracto respiratorio superior. Convulsiones.	Nocivo.	Irritación.
Ac Veratrico		LD50 (ipr-mus) 800 mg/kg	Nocivo. Irritación del tracto respiratorio.	Nocivo. Irritación.	Irritación.
Xilidina		LD50 (orl-rat) 467 mg/ kg	Altamente tóxico.	Tóxico. Se absorbe fácilmente.	Irritación.

Dosis letal más baja publicada (DLL<sub>0</sub>)

Dosis Letal 50. Dosis individual de una sustancia que provoca la muerte del 50% de la población animal (DL50)

Intraperitoneal (ipr), Oral (orl), Hombre (man), Rata (rat), Raton (mus)

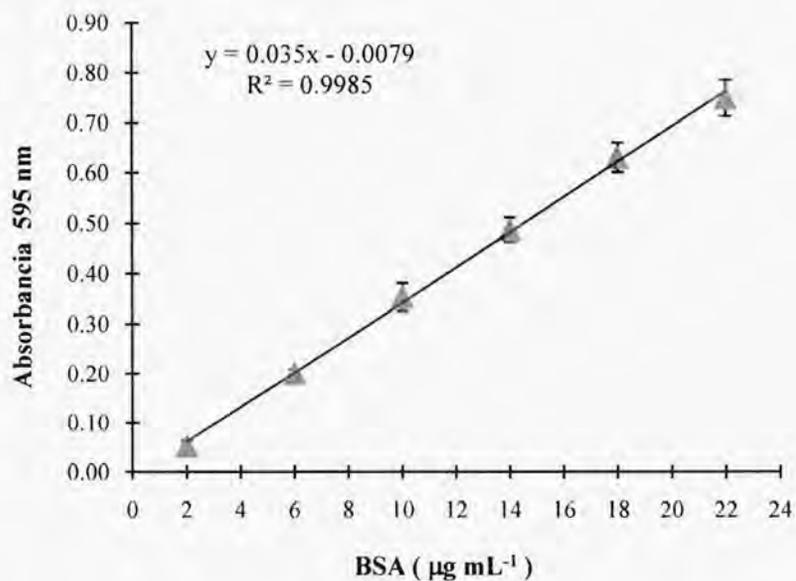
International Agency for Research on Cancer; Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC)

Datos tomados de Corporación Sigma-Aldrich

## Apéndice 2

## Curva Estándar de BSA

La proteína se determinó por el método de Bradford (Sección 5.2.4)



[Albúmina Sérica Bovina] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Absorbancia 3 (nm)	Promedio (nm)
2	0.039	0.057	0.061	0.0523
6	0.191	0.203	0.208	0.2007
10	0.334	0.341	0.385	0.3533
14	0.469	0.476	0.515	0.4867
18	0.598	0.635	0.656	0.6297
22	0.716	0.739	0.787	0.7473

### Apéndice 3

#### Soluciones de Trabajo para Preparar Geles de Electroforesis

- **Condiciones Desnaturalizantes SDS-PAGE.**

1. **ACRILAMIDA 40%**

Pesar 40 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida, aforar a 100 mL con agua bidestilada. Guardar la solución en un frasco ámbar y almacenar a 4°C.

2. **BUFFER DE TRIS 1.5 M pH 8.8**

Pesar 18.17 g de TRIS y disolverlos en 50 mL de agua bidestilada, ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N, posteriormente aforar a 100 mL. Guardar la solución en un frasco ámbar y almacenar a 4°C.

3. **BUFFER DE TRIS 0.5 M pH 6.8**

Pesar 6.06 g de TRIS y disolverlos en 50 mL de agua bidestilada y ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N, posteriormente aforar a 100 mL. Guardar la solución en un frasco ámbar y almacenar a 4°C.

4. **SDS 10%.**

Pesar 10 g de SDS y disolverlos en 100 mL de agua bidestilada.

5. **PERSULFATO DE AMONIO (APS) 10%**

Pesar 10 mg de APS y disolverlos en 100 µL de agua bidestilada.

6. **β-Mercaptoetanol 1%**

Pesar 0.5 g y disolverlos en 50 mL de agua bidestilada.

7. **BUFFER DE CARGA.**

Mezclar:      2.5 mL de Buffer de TRIS 0.5 M pH 6.8.  
                  2 mL de Glicerol.  
                  4 mL de SDS 10%.  
                  2 mg de Azul de Bromofenol.

Aforar la mezcla a 15 mL.

## 8. BUFFER DE CORRIDA.

Pesar:

0.025M de TRIS.

0.19M de glicina.

0.1% de SDS.

Aforar a 1L con agua bidestilada

## 9. SOLUCIÓN FIJADORA.

Mezclar:       50% Metanol.  
                  10% Acido acético.  
                  40% Agua bidestilada.

## 10. SOLUCIÓN DE TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE.

Mezclar:       30% Metanol.  
                  10% Acido acético.  
                  59.7% Agua bidestilada.  
                  0.3% Azul brillante.

## 11. SOLUCIÓN PARA DESTENIR.

Mezclar:       40% Metanol.  
                  10% Acido acético.  
                  50% Agua bidestilada.

- **Condiciones No Desnaturalizantes Tris-Glicina.**

Se utilizan los mismos reactivos que para geles desnaturizante, pero se excluye el SDS de todas las soluciones.

### 1. BUFFER DE CARGA.

Mezclar:       2.5 mL de Buffer de TRIS 0.5 M pH 6.8.  
                  2 mL de Glicerol.  
                  2 mg de Azul de Bromofenol.

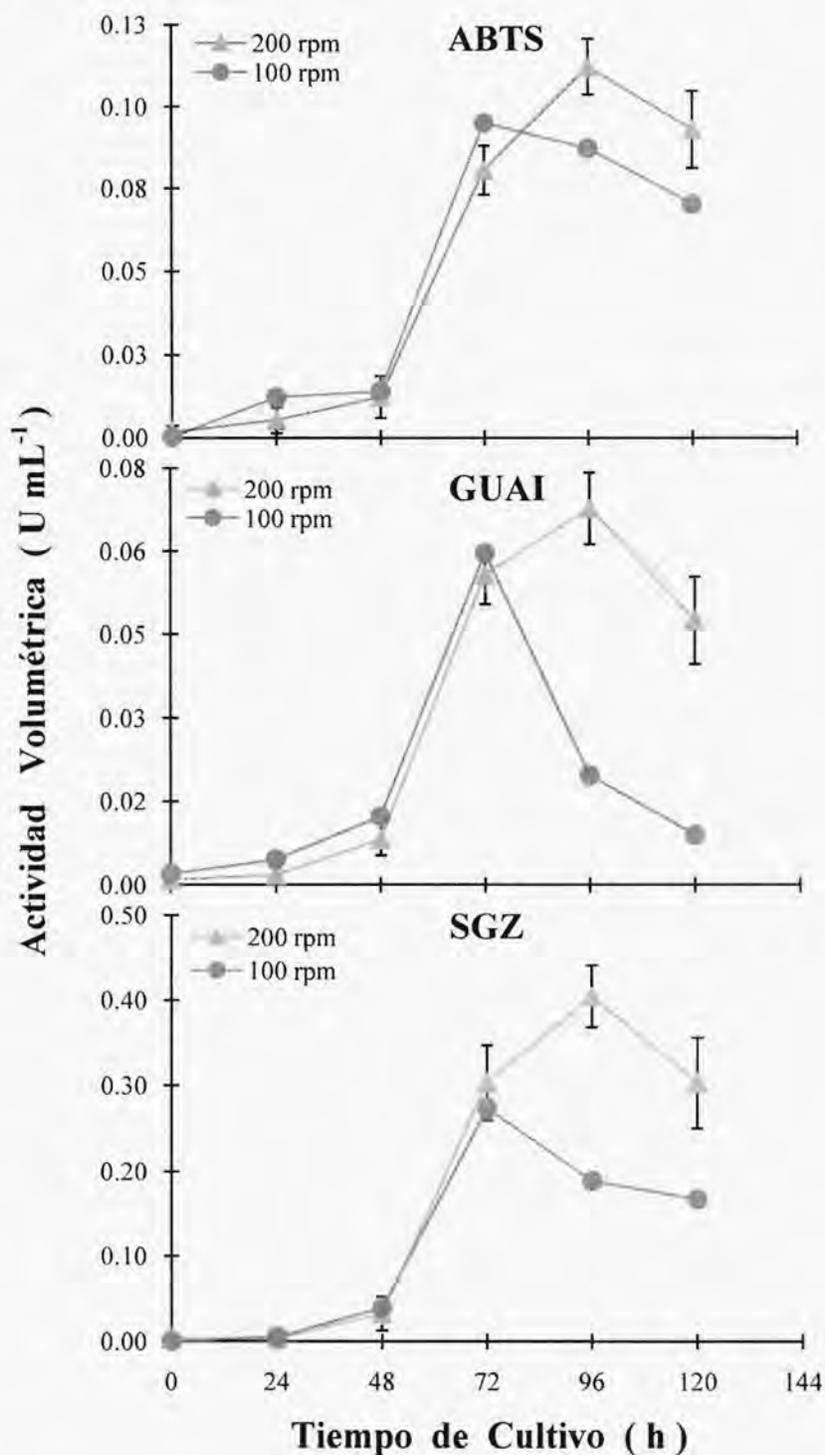
Aforar la mezcla a 15 mL.

### 2. BUFFER DE CORRIDA (50Mm TRIS + 380 Mm GLICINA).

Pesar 60.57 g de TRIS y 28.52 g de Glicina, aforar a 1 L.

Apéndice 4

Comparación de la Actividad Volumétrica obtenida a 200 y 100 rpm



Los valores de actividad a 200 rpm se calcularon por triplicado. Para la actividad a 100 rpm solo se muestra el valor de una determinación.

## Apéndice 5

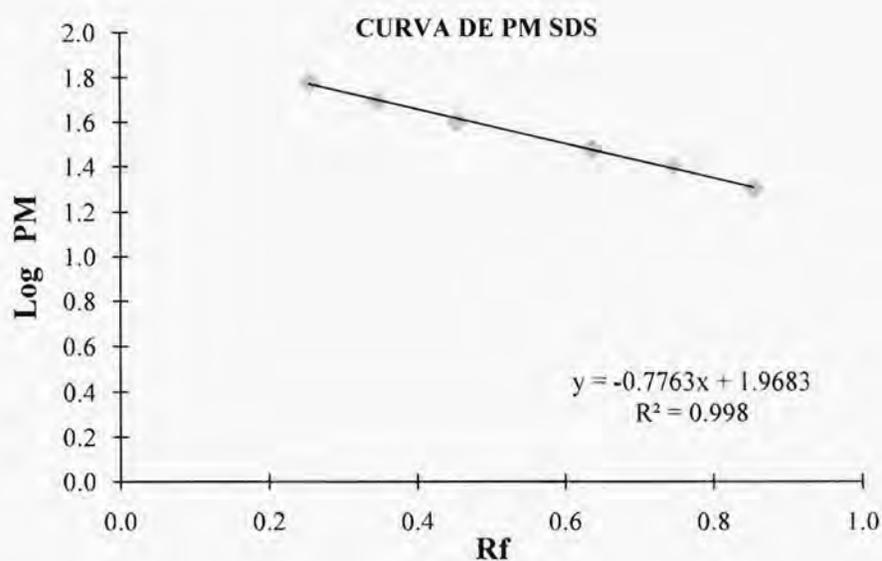
Resumen de la etapa de ultrafiltración del extracto crudo de lacasa de *Pleurotus ostreatus*

<i>Fracción</i>	<i>Sustrato</i>	Volumen (mL)	[Proteína] (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Actividad Específica (U/mg)	Factor de Purificación	Rendimiento %
<b>DMP</b>								
Tamizado		6925	0.0283	195.98	3891.76	19.86	-----	
(> 100 kDa)		1087.5	0.0657	71.45	971.55	13.60	0.68	25
(10-100 kDa)		1150	0.0753	86.60	2017.00	23.29	1.17	52
<b>SGZ</b>								
Tamizado		6925	0.0283	195.98	2592.45	13.23	-----	
(> 100 kDa)		1087.5	0.0657	71.45	401.46	5.62	0.42	15
(10-100 kDa)		1150	0.0753	86.60	1582.92	18.28	1.38	61
<b>ABTS</b>								
Tamizado		6925	0.0283	195.98	703.85	3.59	-----	
(> 100 kDa)		1087.5	0.0657	71.45	160.47	2.25	0.63	23
(10-100 kDa)		1150	0.0753	86.60	467.88	5.40	1.50	66
<b>GUAI</b>								
Tamizado		6925	0.0283	195.9775	489.74	2.50	-----	
(> 100 kDa)		1087.5	0.0657	71.44875	72.35	1.01	0.41	15
(10-100 kDa)		1150	0.0753	86.595	306.16	3.54	1.41	63

La muestra denominada Tamizado es aquella obtenida del caldo de cultivo, a la que solo se le eliminó el micelio-pellet y considerada como el 100% para los balances.

## Apéndice 6

## Curva Estándar de Pesos Moleculares



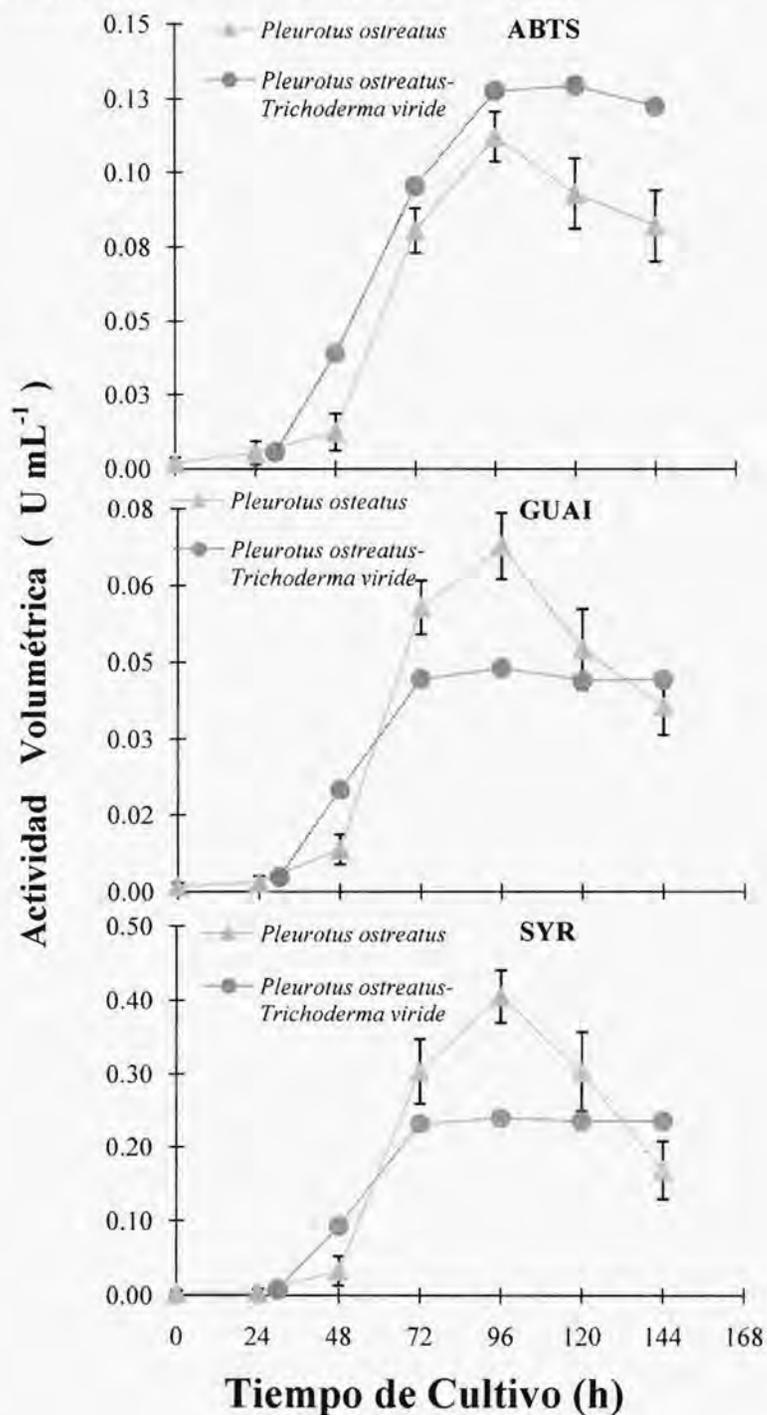
P M (Kda)	Distancia (cm)	Rf	Log PM
60	1.4	0.255	1.78
50	1.9	0.345	1.70
40	2.5	0.455	1.60
30	3.5	0.636	1.48
25	4.1	0.745	1.40
20	4.7	0.855	1.30

Migración del frente de corrida 5.5 cm

$Rf = \frac{\text{Distancia de migración de la proteína}}{\text{Distancia de migración del frente de corrida}}$

Apéndice 7

Actividades volumébricas de lacasa evaluada con ABTS, GUAI y SGZ, producida por *Pleurotus ostreatus* y en co-cultivo con *Trichoderma viride*, medio líquido.



## Apéndice 8

Resumen de ultrafiltración y liofilización de la lacasas producida por *Pleurotus ostreatus* en co-cultivo con *Trichoderma viride*

## ULTRAFILTRACIÓN

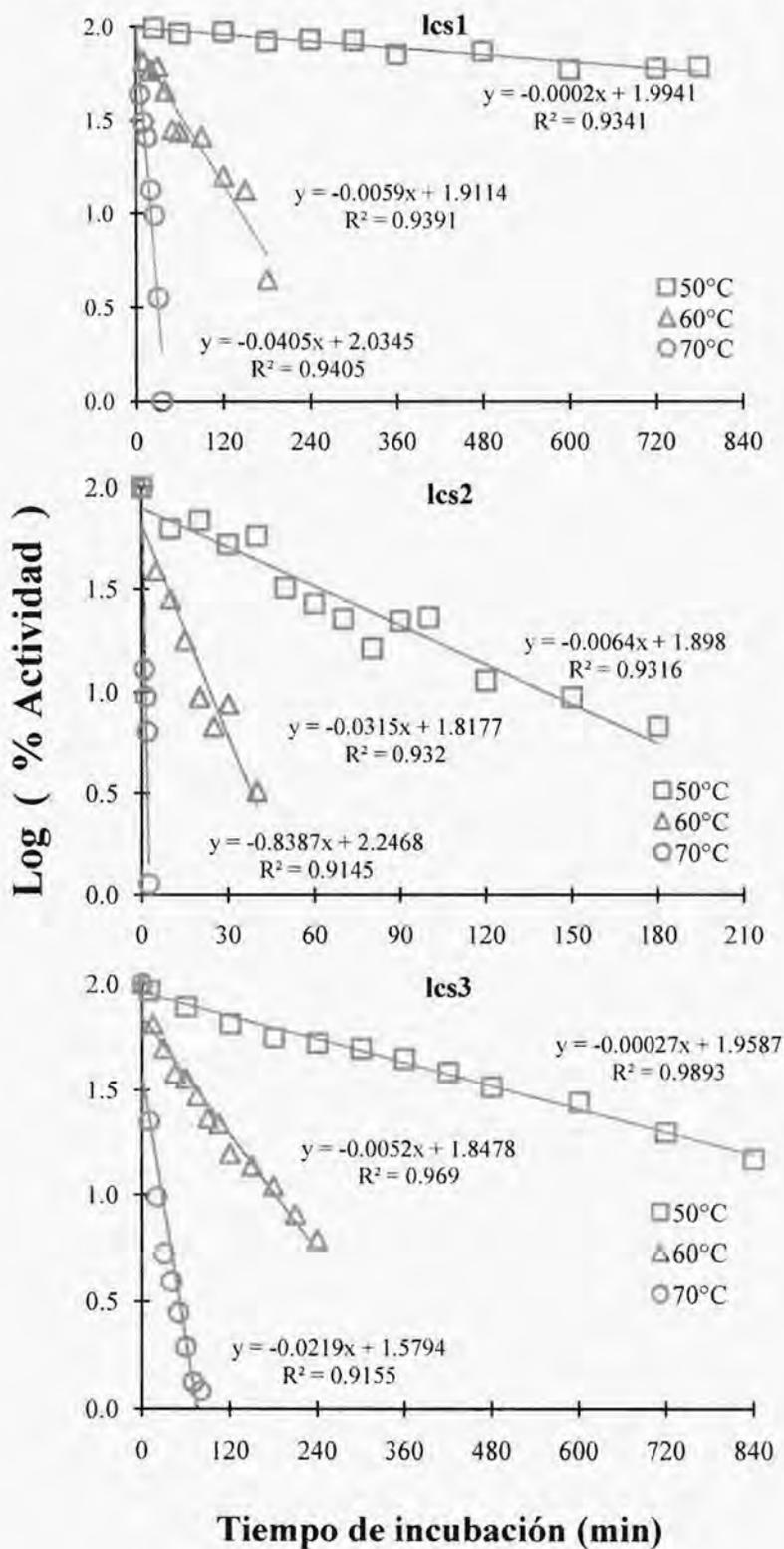
<i>Fracción</i>	<i>Sustrato</i>	Volumen (mL)	[Proteína] (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Actividad Específica (U/mg)	Factor de Purificación	Rendimiento %
<b>DMP</b>								
Tamizado		7500	0.0279	209.25	3084.55	14.74	-----	100
(> 100 kDa)		1250	0.0419	52.37	749.27	14.29	0.97	24
(10-100 kDa)		1000	0.0584	58.40	1563.82	26.80	1.82	51
<b>SGZ</b>								
Tamizado		7500	0.0279	209.25	1735.38	8.29	-----	100
(> 100 kDa)		1250	0.0419	52.37	440.00	8.39	1.01	25
(10-100 kDa)		1000	0.0584	58.40	801.82	13.74	1.66	46
<b>ABTS</b>								
Tamizado		7500	0.0279	209.25	750.41	3.59	-----	100
(> 100 kDa)		1250	0.0419	52.37	228.26	4.35	1.21	30
(10-100 kDa)		1000	0.0584	58.40	290.95	4.99	1.39	39
<b>GUA1</b>								
Tamizado		7500	0.0279	209.25	355.26	1.70	-----	100
(> 100 kDa)		1250	0.0419	52.37	87.22	1.66	0.98	25
(10-100 kDa)		1000	0.0584	58.40	169.17	2.90	1.71	48

## LIOFILIZACIÓN (fracción 10-100 kDa).

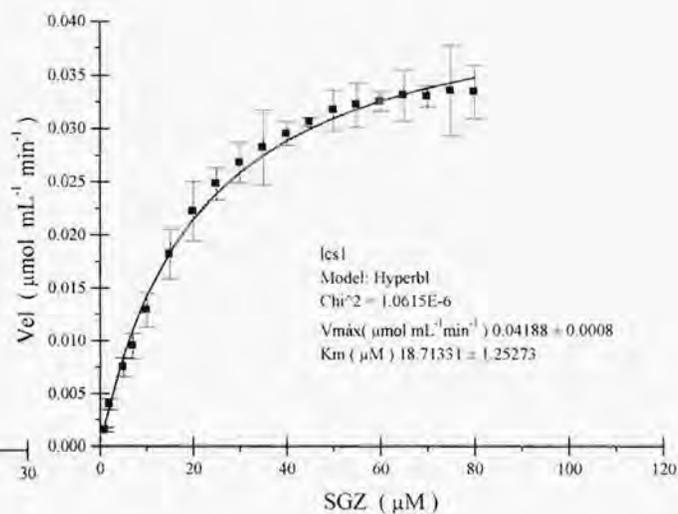
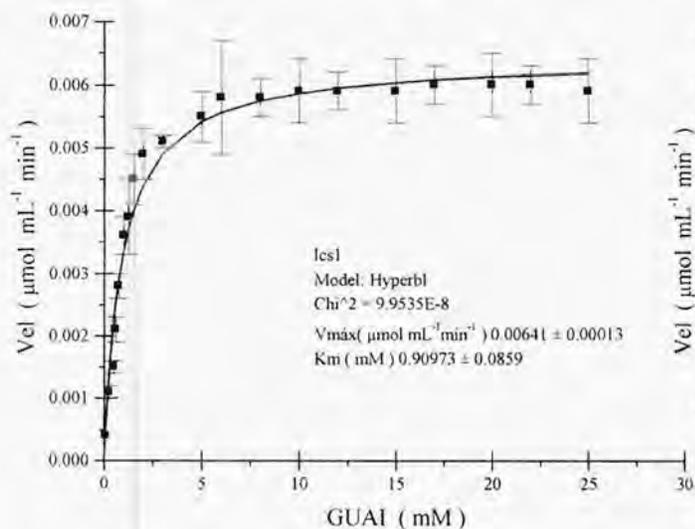
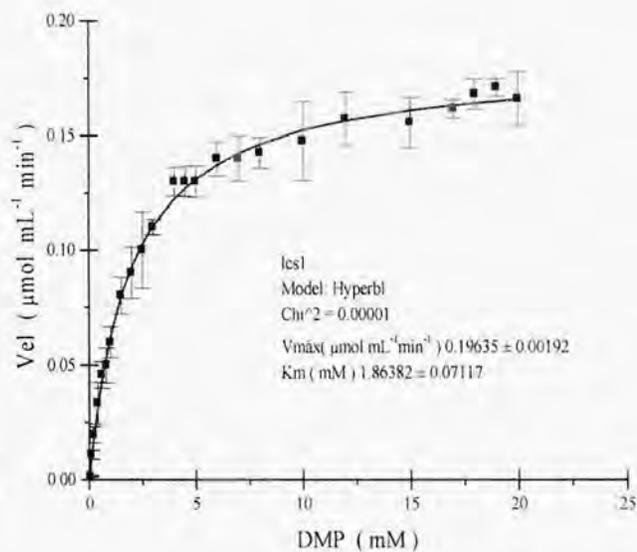
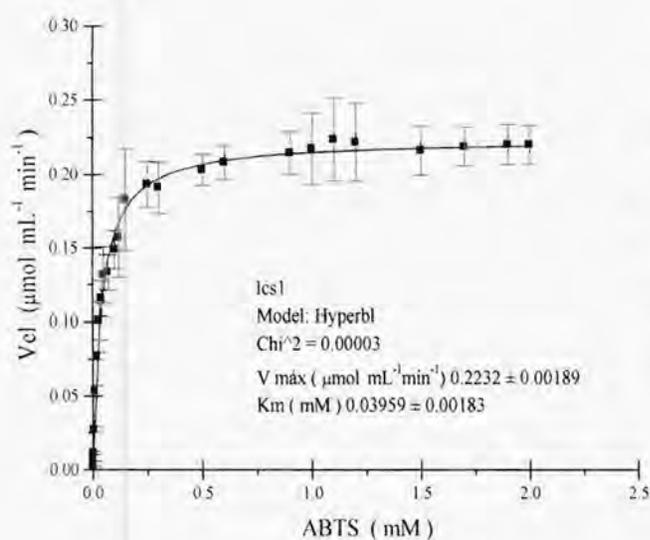
<i>Etapas</i>	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Actividad Específica (U/mg)	Rendimiento %
<b>ABTS</b>				
Ultrafiltración	40.14	190.95	4.76	100
Liofilización	35.84	90.51	2.53	47

Apéndice 9

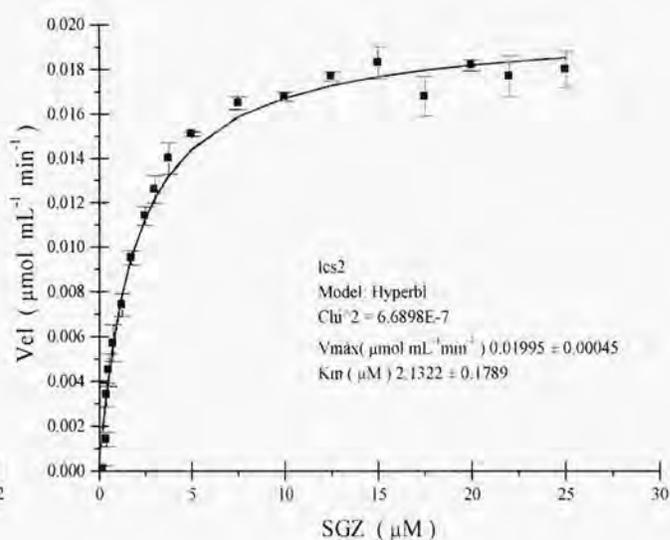
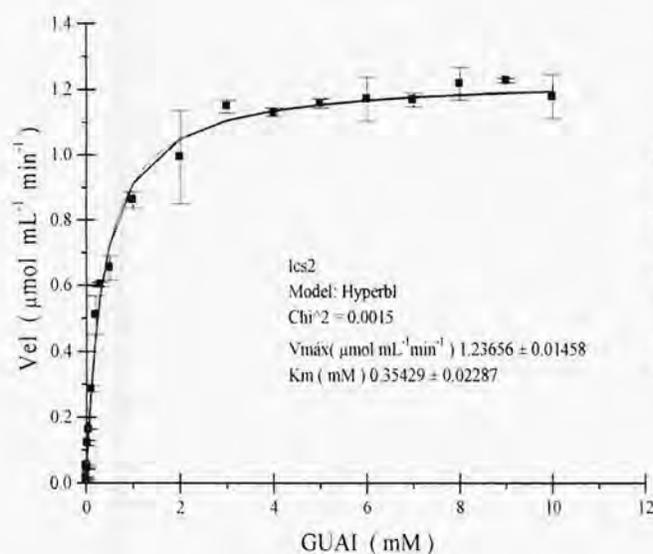
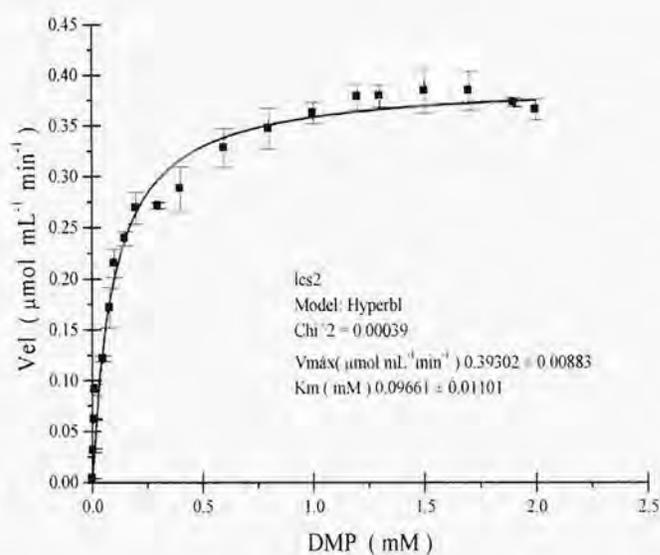
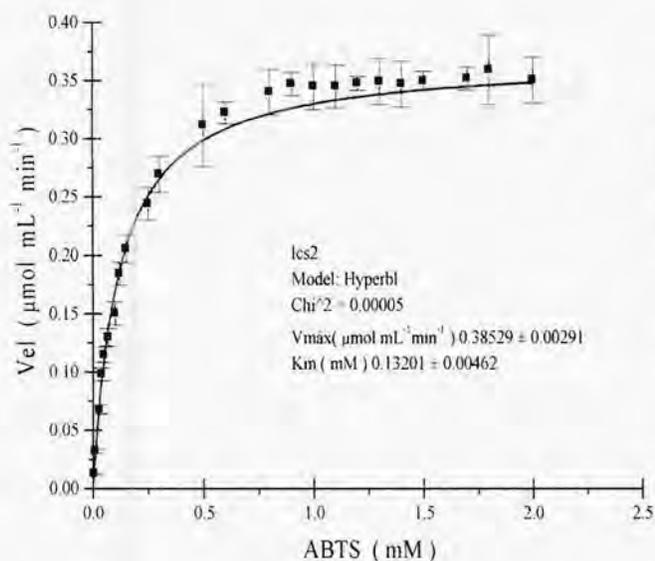
Perfiles de estabilidad térmica de las enzimas lcs1, lcs2 y lcs3 de *Pleurotus ostreatus* CP-50



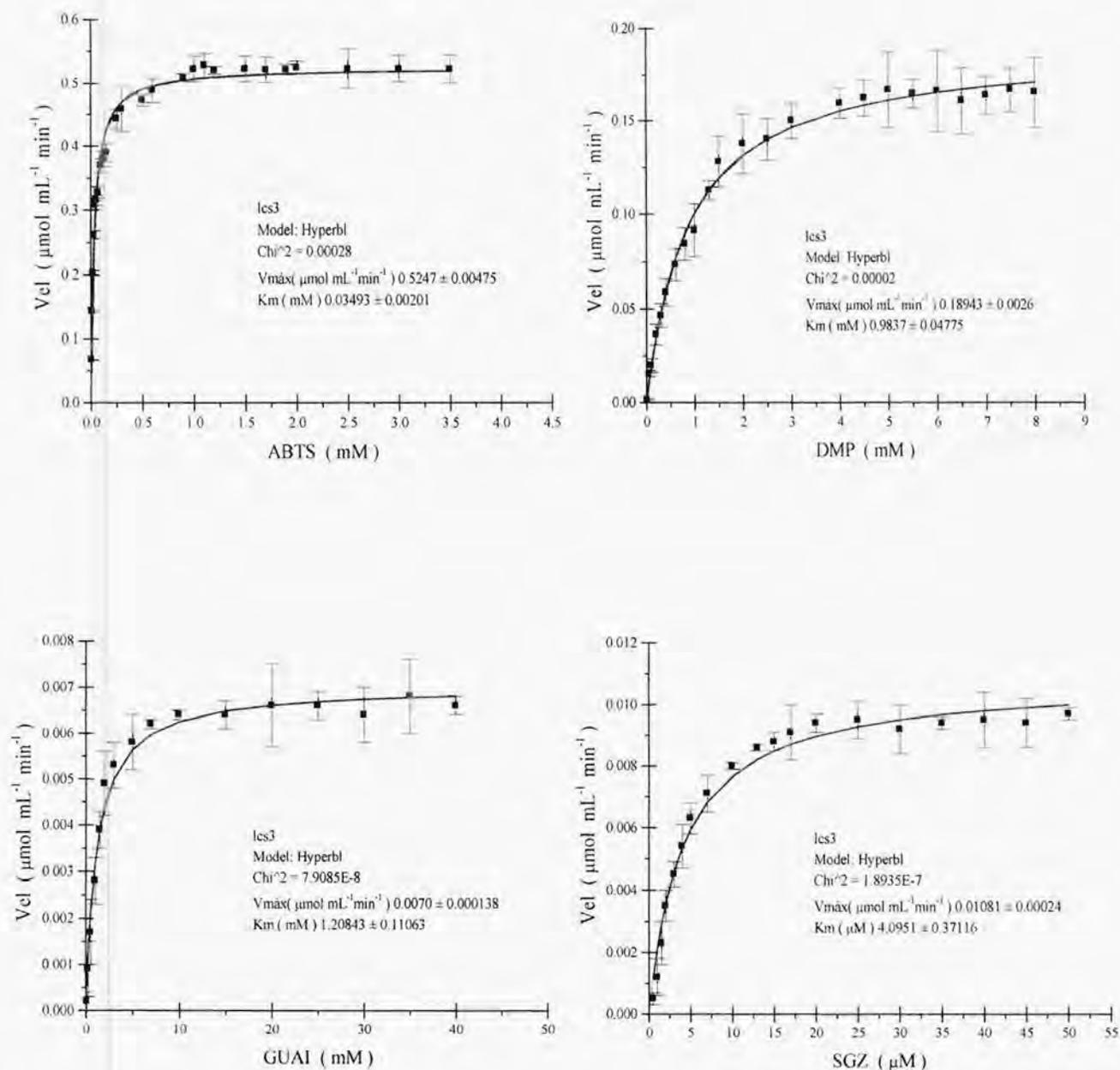
## Apéndice 10



Representación de las cinética ( Michaelis –Menten ) de la oxidación de ABTS, DPM, GUAI y SGZ catalizada por la enzima lcs1 de *Pleurotus ostreatus* CP-50.



Representación de las cinética ( Michaelis –Menten ) de la oxidación de ABTS, DPM, GUAI y SGZ catalizada por la enzima lcs2 de *Pleurotus ostreatus* CP-50.



Representación de las cinética ( Michaelis –Menten ) de la oxidación de ABTS, DPM, GUA1 y SGZ catalizada por la enzima lcs3 de *Pleurotus ostreatus* CP-50.

## CAPÍTULO VII

## Bibliografía

- Andreasson L E, and Reinhammar B (1979) The mechanism of electron transfer in laccase-catalysed reactions. *Biochim Biophys Acta*. **568**:145-56.
- Aitken M D (1993) Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. *Chem Eng J*. **52**:B49-B58.
- Aramayo R, and Timberlake W E (1993) The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. *EMBO J*. **12**:2039-2048.
- Baldrian, P (2004) Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiol Ecol*. **50**: 245–253.
- Baldrian P (2006) Fungal Laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*. **30**: 215–242.
- Bauer C, Kühn A, Gajovic N, Skorobogatko O, Holt P, Bruce N, Makower A, Lowe C, and Scheller F (1999) New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius J Anal Chem*. **364**:179–183.
- Bertrand G (1896) Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *C. R. Hebd. Seances Acad Sci*. **123**: 463–465.
- Bertrand T, Jolival C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, and Mougine C (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* **41**:7325-7333.
- Blaich R, and Esser K (1975) Function of enzymes in wood destroying fungi. 2. Multiple forms of laccase in white rot fungi. *Arch Microbiol*. **103**: 271–277.
- Bonnen A, Lori H, and Orth A (1994) Lignin-Degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol*. **60**: 960-965.
- Bollag JM, Chu HL, Rao MA, and Gianfreda L (2003) Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. *J Environ Qual*. **32**: 63–69.

Bourbonnais R, Paice M G, Freiermuth B, Bodie E, and Borneman S (1990) Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* **267**: 99–102.

Bourbonnais R, and Paice M G (1997) Reactivities of various mediators and laccases with Kraft pulp and lignin model. *Appl Environ Microbiol.* **63**:4627–4632.

Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, and Martínez AT (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 1775–1784.

Castro A I R P, Evtuguin D V, and Xavier A M B (2003) Degradation of lignin model compounds by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and heteropolyanion (SiW<sub>11</sub>VO<sub>40</sub>)<sup>5-</sup>. *J Mol Cat B Enz.* **22**:13-20.

Chefetz B, Chen Y, and Hadar Y (1998) Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl Environ Microbiol.* **64**:3175–3179.

Collins P J, Kotterman M J J, Field M A, and Dobson A D W (1996). Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol.* **62** (12): 4563-4567.

Das N, Sengupta S, and Mukherjee M (1997) Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Appl Environ Microbiol.* **63**:4120–4122.

Das N, Chakraborty T, and Mukherjee, M (2001) Purification and characterization of a growth-regulating laccase from *Pleurotus florida*. *J Basic Microbiol.* **41**: 261–267.

De Pillis G D, Sishta B P, Mauk, A G, and Ortiz de Montellano P R (1991) Small substrates and cytochrome c are oxidized at different sites of cytochrome c peroxidase. *J Biol Chem.* **266**: 19334-19341.

D'Annibale A, Stazi S R, Vinciguerra V, and Giovannozzi Sermanni G (2000) Oxirane-immobilized laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive-mill wastewater. *J Biotechnol.* **77**:265–273.

D' Acunzo F, Gallic C, and Masci B (2002) Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. Solubility and steric issues. *Eur J Biochem.* **269**:5530-5335.

Dekker R, Vasconcelos A, Barbosa A, and Paccola-Meirelles G (2001) A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria sp.*; influence of carbon source. *Biotechnol Lett.* **23**: 1987–1993.

Doerge D, Divi R, and Churchwell M (1997) Identification of the colored guaiacol oxidation product. *Anal Biochem.* **250**:10–17.

Dosoretz C G, Dass B, Reddy A, and Grethlein H E (1990) Protease-mediated degradation of lignin peroxidase in liquid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* **56**:395–400.

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

Durán N, and Esposito E (2000) Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl Catal B Environ.* **28**:83–99.

Eggert C, Temp U, and Eriksson K E L (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol.* **62**:1151-1158.

Enguita F J, Martins L O, Henriques A O, and Carrondo M A (2003) Crystal structure of a bacterial endospore coat component. *J Biol Chem.* **278**:19416–19425.

Farnet AM, Criquet S, Tagger S, Gil G, and Le Petit J (2000) Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Can J Microbiol.* **46**:189–194.

Farnet AM, Criquet S, Tagger S, Gil G, and Ferre E (2002) Purification of a new isoform of laccase from a *Marasmius quercophilus* strain isolated from a cork oak litter. *Mycologia* **94**:735–740.

Farnet A M, Criquet S, Cigna M, Gil G and Ferre E (2004) Purification of a laccase from *Marasmius quercophilus* induced with ferulic acid: reactivity towards natural and xenobiotic aromatic compounds. *Enzyme Microb Technol.* **34**: 549–554.

- Festa G, Autore F, Fraternali F, Giardina P, and Sannia G (2007) Development of new laccases by directed evolution: Functional and computational analyses. *Appl Microbiol Biotechnol.* **27**:25-34.
- 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.
- Garavaglia S, Cambria MT, Miglio M, Ragusa S, Lacobazzi V, Palmieri F, D'Ambrosio C, Scaloni A, and Rizzi M (2004) The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J Mol Biol.* **342**: 1519–1531.
- Garzillo A M, Colao M C, Buonocore V, Oliva R, Falcigno L, Saviano M, Santoro A M, Zappala R, Bonomo R P, Bianco C, Giardina P, Palmieri G, and Sannia G (2001) Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. *J Protein Chem.* **20**:191-201.
- Gelo-Pujic M, Kim H H, Butlin N G, and Palmore G T (1999) Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol.* **65**:5515-5521.
- Gianfreda L, Xu F, and Bollag J M (1999) Laccases: useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J.* **3**: 135-143.
- Giardina P, R, Cannio L, Martitani L, Marzullo G, Palmieri G, Sannia (1995) Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 2408–2413.
- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G, and Sannia G (1999) Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem J.* **341**: 655–663.
- Gibbs P A, Seviour R J, and Schmid F (2000) Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol.* **20**:17–48.
- Goffner, D (1999) Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases in a divergent gene family in poplar. *Eur J Biochem.* **259**: 485-49.
- Golz-Berner K, Walzel B, Zastrow L, and Doucet O. Cosmetic and dermatological preparation containing copper-binding proteins for skin lightening. Int Pat Appl WO2004017931.

Han M, Choi H, and Song H (2005) Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *J Microbiol.* **43**: 555-560.

Harkin J M, Larsen M J, and Obst J R (1974) Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia* **66**: 469–476.

Hatvani N, Kredics L, Antal Z, and Mécs I (2002) Changes in activity of extracellular enzymes in dual cultures of *Lentinula edodes* and mycoparasitic *Trichoderma* strains. *J App. Microbiol.* **92**:287-291.

Hermann T, Berman M, and Champe S (1983) Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol.* **154**: 955-964.

Hoffmann P, and Esser K (1977) The phenol oxidases of the Ascomycete *Podospora anserina*. *Arch. Microbiol.* **112**:111-114.

Hoshida H, Nakao M, Kanazawa H, Kubo K, Hakukawa T, Morimasa K, Akada R, and Nishizawa Y, (2001) Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the yeast cDNA in yeasts. *J Biosci Bioeng.* **92**:372–380.

Iakovlev A, and Stenlid J (2000) Spatiotemporal Patterns of Laccase Activity in Interacting Mycelia of Wood-Decaying Basidiomycete Fungi. *Microb Ecol.* **39**:236–245

Ikehata K, Buchanan I D, and Smith D W (2004) Recent developments in the production of fungal peroxidases and laccases. *J Environ Eng Sci.* **3**:1-19.

Iyer G and Chattoo BB (2003) Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol Lett.* **227**: 121–126.

Johannes C, Majcherczyk A, and Hutterman A (1998) Oxidation of acenaphtalene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system. *J Biotechnol.* **61**: 151-156.

Johannes C, and Majcherczyk A (2000) Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J Biotechnol.* **78**: 193-199.

Jung H, Xu F, and Li K (2002) Purification and characterization of laccase from Wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme Microb Technol.* **30**: 161-168.

- Karam J, and Nicell J (1996) Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *J Chem Tech Biotechnol.* **69**: 141-153.
- Kiiskinen L L, Viikari L, and Kruus K (2002) Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **59**:198-204.
- Kirk T K and Farrell R L (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol.* **41**: 465–505.
- Klonowska A, Le Petit J, and Tron T (2001) Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. *FEMS Microbiol Lett.* **200**:25-30.
- Komori H, Miyazaki K, and Higuchi Y (2009) X-ray structure of a two-domain type laccase: A missing link in the evolution of multi-copper proteins. *FEBS Lett.* **583**:1189–1195.
- Koroleva O, Stepanova E, Binukov V, Timofeev V, Pfeil W (2001) Temperature-induced changes in copper centers and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus*. *Biochim Biophys Acta.* **1547**: 397-407
- Lang G, and Cotteret J. Hair dye composition containing a laccase. (L'Oreal, Fr.). Int Pat Appl WO9936036.
- Levine, W G (1965) Laccase, a review. In: The biochemistry of copper. *Academic Press Inc.*, New York: 371-385.
- Leontievsky A, Myasoedova N, Pozdnyakova N, and Golovleva L (1997) 'Yellow' laccase of *Panus tigrinus* oxidises non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. *FEBS Lett.* **413**: 446-448.
- Liu L, Dean J F D, Friedman W E, and Eriksson K E L (1994) Laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissue. *Plant J.* **6**: 213–224.
- Lorenzo M, Moldes D, Rodríguez C S, and Sanromán M A (2005) Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere* **60**:1124–1128.
- Maheshwari R, Bharadwaj G, and Bhat M K (2000) Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**: 461- 488.

Majcherczyk A, Johannes C, and Hutterman A (1998) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microbial Technol.* **22**: 335-341.

Mansur M, Arias M, and Flärdh M (2003) The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia* **95**: 1013-1020.

Marbach I, Harel E, and Mayer A M (1984) Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochemistry* **23**: 2713–2717.

Marques de Souza C G, Tychanowicz G K, Farani de Souza D, and Peralta R M (2004) Productions of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonaris* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J Basic Microbiol.* **44**:129-136.

Marques de Souza C G and Peralta RM (2003) Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *J Basic Microbiol.* **43**: 278–286.

Marquez-Rocha F, Guillén G, Sánchez J, and Vázquez-Duhalt R (1999) Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. *Biotechnol Techniques* **13**: 29-32.

Mata G, Murrieta Hernández D M, and Iglesias Andreu L G (2005) Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus spp.* strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma spp.* *World J Microbiol Biotechnol.* **21**: 143–150.

Mayer A M and Staples R C (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551–565.

McNeil B, Berry D R, Harvey L M, Grant A, and White S (1997) Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng.* **57**:297-305.

Messerschmidt, A (1997) Copper metalloenzymes. In: Comprehensive biological catalysis. Vol. 3 (Sinnert, M., Ed.) Academic Press Limited, London. Pp. 401-426.

Munteanu F, Basto C, Gübitz G, and Cavaco-Paulo A (2006) Staining of wool using the reaction products of ABTS oxidation by Laccase: Synergetic effects of ultrasound and cyclic voltammetry. *Ultrasonics Sonochem.* **14**:363–367.

- Muñoz C, Guillen F, Martinez A T, and Martinez M J (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 2166–2174.
- Nagai M, Sato T, Watanabe H, Kawata M, and Enei H (2002) Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes* and decolorization of chemically different dyes. *Appl Microbiol Biotechnol.* **60**: 327-335.
- Nakamura K, and Go N. (2005) Function and molecular evolution of multicopper blue proteins Review. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **62**:2050–2066.
- Niku-Paavola M L, Raaska L, and Itävaara M (1990) Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. *Mycol Res.* **94**: 27-31.
- Okamoto K, Yanagi S, and Sakai T (2000) Purification and characterization of extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* **41**: 7-13
- Palmieri G, Giardina P, Marzullo L, Desiderio B, Nitti G, Cannio R, and Sannia G (1993) Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **39**: 632–636.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, and Sannia G (1997) A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J Biol Chem.* **272**: 31301–31307.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, and Sannia G (2000) Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 920–924
- Palmieri G, Bianco C, Cennamo G, Giardina P, Marino G, Monti M, and Sannia G (2001) Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol.* **67**: 2754–2759.
- Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G, and Giardina P (2003) Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb Technol.* **33**: 220–230.

- Papagianni, M (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotech Adv.* **22**: 189-259.
- Perry C R, Smith M, Britnell C H, Wood D A, and Thurston C F (1993) Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol.* **139**:1209–1218.
- Pickard M, Roman R, Tinoco R, and Vazquez-Duhalt R (1999) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism by White Rot Fungi and Oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 Laccase. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 3805–3809.
- Piontek 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. *J Biol Chem.* **277**:37663-37669.
- Quarantino D, Federici F, Petruccioli M, Fenice M, and D'Annibale A (2007) Production, purification and partial characterisation of a novel laccase from the white-rot fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79 *Antonie van Leeuwenhoek* **91**:57–69.
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes M, Boudet A, and Goffner D (1999) Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases in a divergent gene family in poplar. *Eur J Biochem.* **259**: 485-49.
- Rigling D, and Van Alfen N (1993) Extra-and intracellular laccases of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 3634-3639.
- Rodriguez C S, and Toca H J (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotech Adv.* **24**: 500–513.
- Sanchez-Amat A, and Solano F (1997) A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas sp* shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. *Biochem Biophys Res Commun.* **240**: 787-792.
- Saparrat M C N, Guillen F, Arambarri A M, Martinez AT, and Martinez M J (2002) Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 1534–1540.
- Savoie JM, and Mata G (1999) The antagonistic action of *Trichoderma sp* hyphae to *Lentinula edodes* hyphae changes lignocellulolytic activities during cultivation in wheat straw. *World J Microbiol Biotechnol.* **15**:369–373.

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

Shleev S V, Morozova O, Nikitina O, Gorshina E S, Rusinova T, Serezhenkov V A, Burbaev D S, Gazaryan I G, and Yaropolov A I (2004) Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie* **86**: 693–703.

Schlosser D, Grey R, and Fritsche W (1997) Patterns of ligninolytic enzymes in *T. versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Appl Microbiol Biotechnol.* **47**: 412–418.

Setti L, Giuliani S, Spinozzi G, and Pifferi P G (1999) Laccase catalyzed-oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme Microb Technol.* **25**: 285–9.

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

Solomon E I, Sundaram U M, and Machonkin T E (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev.* **96**: 2563–2605.

Tlecuitl-Beristain S, Sanchez C, Loera O, Robson G, and Diaz-Godinez G (2008) Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoforma. *Mycol Res.* **112**:1080–1084.

Thakker G D, Evans C S, and Rao K K (1992) Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Appl Microbiol Biotechnol.* **37**: 321–323.

Thurston, CF (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.* **140**: 19–26.

Tien M, and Kirk T K (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete crysosporium*. *Methods Enzymol.* **161**: 238-249.

Tokimoto, K (1980) Polyphenoloxidase activation of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. induced by *Trichoderma* invasion. *Proc Jap Acad.* **56B**: 221-225.

Tokimoto, K (1982) Lysis of the mycelium of *Lentinus edodes* caused by mycolytic enzymes of *T. harzianum* when the two fungi were in an antagonistic state. *Trans Mycol Soc Jpn.* **23**, 13-20.

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

Ullrich R, Huong L, Dung N, and Hofrichter M (2005) Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol.* **67**: 357-363.

Velázquez-Cedeño M, Farnet A M, Ferré E, and Savoie J-M (2004) Variation of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw. *Mycologia* **96**:712–719.

Velázquez-Cedeño, M, Farnet A M, Billette C, Mata G, and Savoie J-M (2007) Interspecific interactions with *Trichoderma longibrachiatum* induce *Pleurotus ostreatus* defence reactions base on the production of laccase isozymes. *Biotechnol Lett.* **29**:1583–1590.

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

Wang, W (2000) Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm.* **203**:1–60.

White N, and Boddy L (1992) Differential extracellular enzyme production in colonies of *Coriolus versicolor*, *Phlebia radiate* and *Ohebia rufa*: effect of gaseous regime. *J Gen Microbiol.* **138**: 2589-2598.

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

Xu, F (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* **35**:7608-7614.

Xu F, Shin W, Brown S H, Wahleitner J A, Sundaram U M, and Solomon E I (1996) A study of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim Biophys Acta.* **1292**: 303-311.

Xu, F (1997) Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J Biol Chem.* **272**:924-928.

- Xu F, Berka R M, Wahleithner J A, Nelson B A, Shuster J R, Brown S H, Palmer A E, and Solomon E I (1998) Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem J.* **334**:63–70.
- Xu F, Kulys J J, Duke K, Li K, Krikstopaitis K, Deussen H J, Abbate E, Galinyte V, and Schneider, P (2000) Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl Environ Microbiol.* **66**:2052-2056.
- Xu, F (2001) Dioxygen reactivity of laccase: dependence on laccase source, pH, and anion inhibition. *Appl Biochem Biotechnol.* **95**:125-133.
- Yaver D S, Xu F, Golightly E J, Brown K M, Brown S H, Rey M W, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, and Dalboge H (1996) Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl Environ Microbiol.* **62**:834–841.
- Yaver D S, Overjero M J, Xu F, Nelson B A, Brown K M, Halkier T, Bernauer S, Brown S H, and Kauppinen, S (1999) Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase lcc1. *Appl Environ Microbiol.* **65**:4943-4948.
- Yoshida, H (1883) Chemistry of lacquer (Urushi). *J Chem Soc.* **43**: 472–486.
- Yoshitake A, Katayama Y, Nakamura M, Iimura Y, Kawai S, and Morohoshi N (1993) N-Linked carbohydrate chains protect laccase-III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *J Gen Microbiol.* **139**: 179–185.
- Zavarzina A G, Leontievsky A A, Golovleva L A, and Trofimov S Y (2004) Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an in vitro study. *Soil Biol Biochem.* **36**: 359–369.
- Zhang H, Hong Y, Xiao Y, Yuan J, Tu X, and Zhang X (2006) Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain. *Appl Microbiol Biotechnol.* **73**:89-94.
- Zhukhlistova N, Zhukova Y, Lyashenko A, Zaietsev V, and Mikhailov A (2008) Three-Dimensional Organization of Three-Domain Copper Oxidases: A Review. *Crystallography Rep.* **53**:92-110.