



**Expresión y producción de la lacasa POXA 1B  
recombinante de *Pleurotus ostreatus* como alternativa  
para el tratamiento de los subproductos líquidos que se  
obtienen en el proceso de blanqueamiento de pulpa de  
celulosa**

**Claudia Marcela Rivera Hoyos, Biól., M.Sc.**

**Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Doctorado en Ciencias Biológicas  
Bogotá D.C.  
Julio de 2016**

**Expresión y producción de la lacasa POXA 1B  
recombinante de *Pleurotus ostreatus* como alternativa  
para el tratamiento de los subproductos líquidos que se  
obtienen en el proceso de blanqueamiento de pulpa de  
celulosa**

**Claudia Marcela Rivera Hoyos, Biól., M.Sc.**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctor en Ciencias Biológicas – Biotecnología**

Director

**Raúl A. Poutou-Piñales, Bq., M.Sc., Ph.D.**

Co-Directora

**Aura Marina Pedroza Rodríguez, Bact., M.Sc., Ph.D.**

Laboratorio de Biotecnología Molecular  
Laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos  
Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI)

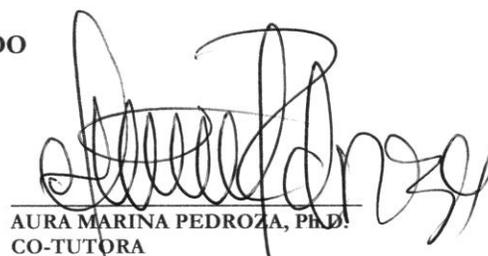
**Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Doctorado en Ciencias Biológicas  
Bogotá D.C.  
Julio de 2016**

**Expresión y producción de la lacasa POXA 1B  
recombinante de *Pleurotus ostreatus* como alternativa  
para el tratamiento de los subproductos líquidos que se  
obtienen en el proceso de blanqueamiento de pulpa de  
celulosa**

**Claudia Marcela Rivera Hoyos, Biól., M.Sc.**

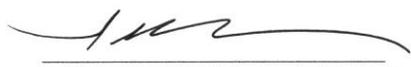
**APROBADO**

  
RAÚL POUTOU-PIÑALES, Ph.D.  
TUTOR

  
AURA MARINA PEDROZA, Ph.D.  
CO-TUTORA

  
CINZIA PEZZELLA, Ph.D.  
JURADO

  
MARÍA MERCEDES MARTÍN, Ph.D.  
JURADO

  
LUIS ALEJANDRO BARRERA, Ph.D.  
JURADO

  
MANUEL A. PATARROYO M.D., Ph.D.  
JURADO

  
HOWARD JUNCA DIAZ, Ph.D.  
JURADO

**Expresión y producción de la lacasa POXA 1B  
recombinante de *Pleurotus ostreatus* como alternativa  
para el tratamiento de los subproductos líquidos que se  
obtienen en el proceso de blanqueamiento de pulpa de  
celulosa**

**Claudia Marcela Rivera Hoyos, Biól., M.Sc.**

**ACEPTADO**

---

**Dra. Alba A. Trespacios Rangel.**  
Bact. M.Sc., Ph.D.  
Directora de Posgrado, Facultad de Ciencias  
Pontificia Universidad Javeriana (PUJ)

---

**Dra. Concepción J. Puerta Bula.**  
Bact. M.Sc., Ph.D.  
Decana Facultad de Ciencias  
Pontificia Universidad Javeriana (PUJ)

**Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946.**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

*A Dios, porque es amor.  
Y el amor revela y desvela,  
porque por amor se vive y se muere...  
Y a mis padres,  
por su amor, por ser mi mundo y mi luz.*

## Agradecimientos

*A mis padres, por ser mi soporte y mi motor para transitar en la vida, por acompañarme y apoyarme siempre en cada locura que se me ha ocurrido (eso incluye las locuras deportivas y académicas), por ser los padres más orgullosos y cariñosos, y por enseñarme el valor de la disciplina, la honradez, la lealtad y a hacer todo en la vida con amor. Y a mi mamita (Mita), por su ternura, su fe y porque a través de su bondad y su piedad, me ha mostrado siempre cómo ser una mejor persona con todos a mi alrededor.*

*A mi tutor, Raúl, por confiar y creer ciegamente en mí, porque además de transmitirme sus conocimientos académicos, me ha enseñado para la vida (de eso se trata, de buscar ser mejor en todo sentido), por sus anécdotas diarias, sus particulares analogías, por su paciencia y por tolerar mi “velocidad” para realizar cada experimento y escribir cada documento (parece que al final encontramos un punto intermedio entre su “acelere” y mi parsimonia), es decir, gracias por su amistad. A Aura, mi cotutora, a quien admiro profundamente por ser una gran investigadora y porque aun en los momentos difíciles, siempre fueron prioridad la responsabilidad, la dedicación y el trabajo en equipo (la conclusión más importante en este proceso fue descubrir que somos personas disfuncionales que como grupo, ¡funcionamos muy bien!). A mis Jurados, por su tiempo, su dedicación, su buena disposición y sus valiosos aportes que contribuyeron significativamente a la construcción de la versión final de mi tesis. A David, por ser un gran compañero en la academia y en la vida, por alegrarse con mis triunfos y apoyarme en mis fracasos, por escucharme y valorar en todo momento mi punto de vista personal y académico, por tanto amor y porque comprendimos juntos el verdadero significado de la familia y de la amistad.*

*A Andrés (Mi Lagart), por tantos años siendo grandes amigos, por crecer y aprender juntos, por su alegría, su sabiduría, su objetividad, por ser un gran soporte en los momentos difíciles, y por estar presente en cada momento importante de mi vida.*

*A mi querido Lunch 2.0 (Angelita, Melissa, David Gómez, Alba, Javier, Laura, Jorge y Lina), porque aunque nos tardamos varios años en coincidir en la senda de la amistad, llegaron en el momento indicado para sacarme de mi zona de confort y recordarme la importancia de reír a carcajadas, de la solidaridad, de la incondicionalidad, de hablar de todo y de nada, de disfrutar de la hora del almuerzo y de un café en compañía y con la tranquilidad apropiada.*

*A Alejo, porque sin proponérselo y a causa de los azares o tal vez del destino, estuvo presente nuevamente en mi camino justo antes de iniciar este reto académico, y justo antes de concluirlo, y porque a su lado (o incluso desde la distancia) y a lo largo de toda una vida, sigue siendo un vehículo fundamental en mi viaje de*

*autodescubrimiento y una pieza importante en el rompecabezas del que se compone mi historia (mi pasado, mi presente, y espero que también mi futuro).*

*A Nara, por su hermosa energía, por su ronroneo sanador en tantas crisis de migraña, por calentar mi regazo en las noches frías de estudio, lectura y escritura, por su amor, sus caprichos, y por ayudarme a darle verdadera importancia al descanso, la diversión y a la paciencia.*

*A Vivaldi, Nina Simone y B.B. King por proveer mi ambiente idóneo para la creación, la concentración y la inspiración académica y por acompañarme en tantos momentos de soledad que siempre están implícitos en un proceso largo como el que hoy estoy terminando.*

*Y a Benedetti, por sacarme tantas veces de la academia para dejar volar mi mente y explotar al máximo ese lado romántico y soñador que habita en mí. Porque en sus letras descubrí que “el amor es una bahía linda y generosa que se ilumina y se oscurece según venga la vida... una bahía donde los barcos llegan y se van, llegan con pájaros y augurios y se van con sirenas y nubarrones...”, pero más importante aun, que esa analogía, no sólo aplica para el amor, sino para todo en la vida: Porque al final (al menos desde mi perspectiva), somos producto de cada experiencia vivida y cada persona que se ha cruzado, se ha marchado, o que nos ha acompañado en algún punto de nuestro camino (algunas con mayor impacto que otras)... Así que gracias, ¡a todos! (incluso a los que no aparecen en estas líneas, pero que permanecen en mi mente y en mi corazón), porque indiscutiblemente y sin lugar a dudas, han contribuido a su manera para que hoy sea la persona, la hija, la amiga, la mujer y la profesional que soy, y para alcanzar este gran sueño académico y personal.*

*Gracias... ¡Totales!*

## Tabla de contenido

### CAPÍTULO 1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA TESIS

1.1. <b>Introducción</b> .....	18
1.2. <b>Planteamiento del problema y justificación</b> .....	18
1.3. <b>Objetivo general</b> .....	19
1.4. <b>Objetivos específicos</b> .....	20
1.5. <b>Contexto global de la metodología</b> .....	20
1.6. <b>Referencias</b> .....	20

### CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. <b>Introducción</b> .....	22
2.2. Organismos productores de lacasas y actividad biológica .....	23
2.3. Familias de genes de lacasas .....	26
2.4. Fisiología microbiana de la producción de lacasas .....	27
2.5. Diversidad estructural de lacasas fungicas; análisis bioinformático .....	29
2.6. Lacasas recombinantes .....	38
2.7. Mecanismo de acción .....	43
2.8. Lacasas y mediadores químicos: mimetizando la naturaleza .....	45
2.9. Lacasas atípicas .....	46
2.10. Producción heteróloga de lacasas .....	47
2.11. Aplicaciones biotecnológicas .....	53
2.12. <b>Conclusiones</b> .....	56
2.13. <b>Referencias</b> .....	58

### CAPÍTULO 3. ANÁLISIS COMPUTACIONAL Y EXPRESIÓN CONSTITUTIVA A BAJA ESCALA DEL GEN SINTÉTICO DE LA LACASA POXA 1B DE *Pleurotus ostreatus* EN *Pichia pastoris*

3.1. <b>Introducción</b> .....	69
3.2. <b>Materiales y métodos</b> .....	72
3.2.1. Optimización y diseño de la secuencia sintética de la lacasa de <i>P. ostreatus</i> .....	72
3.2.2. Modelación 3D .....	72
3.2.3. Evaluación y análisis del modelo .....	73
3.2.4. Modelación de ligandos y Docking molecular .....	73
3.2.5. Clonación y expresión del gen sintético <i>lacPost-Stop</i> .....	74
3.2.5.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo .....	74
3.2.5.2. Construcción del vector de expresión para la lacasa POXA 1B de <i>P. ostreatus</i> .....	74
3.2.5.3. Screening de los transformantes en <i>P. pastoris</i> X-33 .....	75
3.2.6. Determinación de actividad enzimática .....	75
3.2.7. Estudios preliminares de expresión de la lacasa recombinante en <i>Pichia pastoris</i> .....	76
3.3. <b>Resultados</b> .....	78
3.3.1. Optimización y diseño del gen <i>lacPost-Stop</i> .....	78
3.3.2. Análisis estructural del modelo construido por homología .....	79
3.3.3. Validación del model LacPost .....	81
3.3.4. Docking molecular del ligando en el sitio activo del modelo LacPost .....	

.....	83
3.3.5. Construcción del vector pGAPZ $\alpha$ A-laccPost-Stop y screening de clones para la expresión de las lacasas recombinante .....	85
3.3.6. Estudios preliminares de expresión constitutiva de la lacasa LaccPost .....	86
<b>3.4. Discusión</b> .....	88
3.4.1. Optimización y diseño del gen <i>laccPost-Stop</i> .....	88
3.4.2. Análisis estructural del modelo construido por homología .....	89
3.4.3. Validación del modelo .....	90
3.4.4. Docking molecular del ligando en el sitio activo de la lacasa modelada .....	91
3.4.5. Construcción del vector pGAPZ $\alpha$ A- <i>laccPost-Stop</i> y screening de clones para la expresión de la lacasa recombinante .....	93
3.4.6. Estudios preliminares de expresión constitutiva de la lacasa LaccPost .....	93
<b>4.5. Conclusiones</b> .....	95
<b>4.6. Referencias</b> .....	97

**CAPÍTULO 4. OPTIMIZACIÓN DE MEDIO, PRODUCCIÓN A BAJA ESCALA, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA LACASA RECOMBINANTE POXA 1B EXPRESADA EN *Pichia pastoris***

<b>4.1. Introducción</b> .....	103
<b>4.2. Materiales y métodos</b> .....	107
4.2.1. Cepa .....	107
4.2.2. Preparación del inóculo .....	107
4.2.3. Diseño experimental Plackett-Burman (PBED) .....	107
4.2.4. Diseño experimental One Factor (OFED) .....	108
4.2.5. Concentración del sobrenadante .....	108
4.2.6. Caracterización del sobrenadante concentrado .....	109
4.2.6.1. SDS-PAGE e identificación funcional de la enzima .....	109
4.2.6.2. Estabilidad a temperatura .....	109
4.2.6.3. Estabilidad a pH .....	109
4.2.6.4. Constantes cinéticas .....	110
4.2.7. Técnicas analíticas .....	110
4.2.7.1. Determinación de la concentración de azúcares reductores totales residuales .....	110
4.2.7.2. Determinación de la concentración de proteínas totales extracelulares .....	110
4.2.7.3. Determinación de actividad enzimática .....	111
<b>4.3. Resultados</b> .....	112
4.3.1. Diseño estadístico .....	112
4.3.1.2. Diseño experimental Plackett-Burman (PBED) .....	112
4.3.1.3. Diseño experimental One Factor (OFED) .....	117
4.3.2. Caracterización del sobrenadante concentrado .....	119
4.3.2.1. Identificación funcional de la enzima recombinante .....	119
4.3.2.2. Estabilidad a temperatura y pH .....	120
4.3.2.3. Caracterización genética del sobrenadante concentrado .....	121

4.4. <b>Discusión</b> .....	122
4.4.1. Diseño experimental Plackett-Burman (PBED) .....	122
4.4.2. Diseño experimental One Factor (OFED) .....	124
4.4.3. Caracterización del sobrenadante concentrado .....	126
4.4.3.1. SDS-PAGE e identificación funcional de la enzima .....	126
4.4.3.2. Estabilidad a temperatura y pH .....	126
4.4.3.3. Caracterización cinética del sobrenadante concentrado .....	127
4.5. <b>Conclusiones</b> .....	128
4.6. <b>Referencias</b> .....	129

## **CAPÍTULO 5. PRUEBAS PRELIMINARES DE TRATABILIDAD DE LICOR NEGRO SINTÉTICO OBTENIDO A PARTIR DE ASERRÍN DE PINO**

5.1. <b>Introducción</b> .....	135
5.2. <b>Materiales y métodos</b> .....	138
5.2.1. Microorganismos y medios de cultivo .....	138
5.2.2. Técnicas analíticas .....	138
5.2.3. Obtención y caracterización del licor negro pos pulpeo químico .....	139
5.2.4. Efecto de la concentración del licor negro sobre la capacidad de remoción de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Pichia pastoris</i> (X33/pGAPZ $\alpha$ A-LaccPost-Stop).....	139
5.2.5. Decoloración, remoción de COT y TOC del efluente SBL por <i>P. ostreatus</i> y <i>P. pastoris</i> .....	140
5.2.6. Determinación del índice de germinación con semillas de <i>Lactuca sativa</i> .....	140
5.2.7. Numero de ciclos de operación .....	141
5.2.8. Análisis estadístico .....	141
5.3. <b>Resultados y discusión</b> .....	142
5.3.1. Caracterización del SBL .....	142
5.3.2. Efecto de la concentración del licor negro sobre la capacidad de remoción de <i>P. ostreatus</i> y <i>P. pastoris</i> .....	143
5.3.3. Decoloración, remoción de COT y TOC del efluente SBL por <i>Pleurotus ostreatus</i> and <i>Pichia pastoris</i> .....	145
5.3.4. Actividad lacasa, consumo de glucosa y pH .....	148
5.3.5. Cromatografía de gases acoplada a masas .....	150
5.3.6. Determinación del índice de germinación para <i>Lactuca sativa</i> .....	152
5.3.7. Ciclos de operación .....	154
5.4. <b>Conclusiones</b> .....	156
5.5. <b>Referencias</b> .....	157

## **CAPITULO 6. ANEXOS**

6.1. Presentaciones en congresos relacionadas con la tesis .....	161
6.2. Otras publicaciones hechas o sometidas en el período de tesis .....	162

## Listado de Tablas

### CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

**Tabla 2.1.** Estructuras de lacasas de hongos Basidiomicetes y Ascomicetes reportadas en el Protein Data Bank obtenidas usando Cristalografía y Difracción de Rayos X (resolución in Å). ..... 40

**Tabla 2.2.** Lista de algunas lacasas fúngicas expresadas de forma heteróloga en levaduras y hongos filamentosos. .... 49

### CAPÍTULO 3. ANÁLISIS COMPUTACIONAL Y EXPRESIÓN CONSTITUTIVA A BAJA ESCALA DEL GEN SINTÉTICO DE LA LACASA *POXA 1B* DE *Pleurotus ostreatus* EN *Pichia pastoris*

**Tabla 3.1.** Medidas de las distancias que se forman entre los átomos de los residuos que coordinan los iones de cobre con los mismos cobres de los modelos y el molde. .... 80

**Tabla 3.2.** Resultados para seis descriptores de QMEAN del modelo obtenido por homología. .... 81

**Tabla 3.3.** Predicción por VADAR de las características moleculares del modelo. .... 83

**Tabla 3.4.** La tabla muestra los parámetros cinéticos calculados en el estudio cinético de los clones productores de lacasa recombinante (X33/pGAPZαA-*laccPost-Stop*). .... 87

### CAPÍTULO 4. OPTIMIZACIÓN DE MEDIO, PRODUCCIÓN A BAJA ESCALA, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA LACASA RECOMBINANTE *POXA 1B* EXPRESADA EN *Pichia pastoris*

**Tabla 4.1.** Factores y sus respectivos niveles para la evaluación de la respuesta en actividad lacasa del PBED. .... 108

**Tabla 4.2.** Análisis de varianza de la actividad lacasa en distintos tiempo. El siguiente ANOVA se realiza para responder la búsqueda jerárquica del efecto principal de las variables. .... 114

**Tabla 4.3.** Efecto y porcentaje de contribución de los factores evaluados sobre la actividad lacasa obtenida en el PBED. .... 115

**Tabla 4.4.** Matriz de comparación para los datos observados en el PBED y los resultados predichos como consecuencia de los factores que tienen influencia sobre la actividad lacasa. .... 116

**Tabla 4.5.** Análisis de varianza de la actividad lacasa producto de la influencia de las diferentes concentraciones de extracto de levadura evaluadas en el Diseño Experimental One Factor (OFED). ..... 118

## **CAPÍTULO 5. PRUEBAS PRELIMINARES DE TRATABILIDAD DE LICOR NEGRO SINTÉTICO OBTENIDO A PARTIR DE ASERRÍN DE PINO**

**Tabla 5.1.** Synthetic Black Liquor characterization. .... 142

**Tabla 5.2.** Phenolyc Compound identified by CG-MS from initial SBL and *P. ostreatus* and *P. pastoris* treated samples. .... 152

**Tabla 5.3.** Operative cycles: Percent discoloration with viable Biomass of *P. ostreatus* and *P. pastoris*. .... 155

## Listado de figuras

### CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

<b>Figura 2.1.</b> Ciclo catalítico de la lacasa. ....	25
<b>Figura 2.2.</b> Representación de los 3 dominios cupredoxin en la estructura de una lacasa. ....	31
<b>Figura 2.3.</b> Alineamiento con ClustalW2 de secuencias proteicas de lacasas que cuentan con estructuras obtenidas por cristalografía. ....	33
<b>Figura 2.4.</b> Ilustración del sitio activo de una lacasa mostrando la orientación relativa de los átomos de cobre y las distancias con los ligandos en azul (distancias en Å). ....	43
<b>Figura 2.5.</b> Oxidación de las subunidades fenólicas de lignina por la lacasa. ....	44

### CAPÍTULO 3. ANÁLISIS COMPUTACIONAL Y EXPRESIÓN CONSTITUTIVA A BAJA ESCALA DEL GEN SINTÉTICO DE LA LACASA *POXA 1B* DE *Pleurotus ostreatus* EN *Pichia pastoris*

<b>Figura 3.1.</b> Construcción de pGAPZ $\alpha$ A- <i>laccPost-Stop</i> . ....	78
<b>Figura 3.2.</b> Diagrama en cintas del modelo LaccPost. ....	79
<b>Figura 3.3.</b> Validación del modelo computacional. ....	82
<b>Figura 3.4.</b> Superficie del bolsillo del sitio activo T1. ....	84
<b>Figura 3.5.</b> Diagrama en cintas de la interacción del ABTS con el modelo de lacasa LaccPost visualizado en AutoDock. ....	85
<b>Figura 3.6.</b> Cinética de crecimiento de los clones productores de lacasa. ....	86

### CAPÍTULO 4. OPTIMIZACIÓN DE MEDIO, PRODUCCIÓN A BAJA ESCALA, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA LACASA RECOMBINANTE *POXA 1B* EXPRESADA EN *Pichia pastoris*

<b>Figura 4.1.</b> Diseño experimental Plackett-Burman (PBED). ....	112
<b>Figura 4.2.</b> Comparación de medias entre los tratamientos. ....	117
<b>Figura 4.3.</b> Diseño experimental One Factor (OFED). ....	118
<b>Figura 4.4.</b> Resultados del One Factor Design (OFD). ....	119

**Figura 4.5.** Identificación funcional de la enzima recombinante POXA 1B en el sobrenadante concentrado y Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática relativa de la lacasa POXA 1B pura de *P. ostreatus* expresada en *P. pastoris* X33.. ..... 120

**Figura 4.6.** Resultados cinéticos del sobrenadante concentrado, conteniendo la enzima recombinante POXA 1B ..... 121

## **CAPÍTULO 5.** PRUEBAS PRELIMINARES DE TRATABILIDAD DE LICOR NEGRO SINTÉTICO OBTENIDO A PARTIR DE ASERRÍN DE PINO

**Figura 5.1.** Efecto de diferentes concentraciones de SBL sobre la capacidad de remoción de *P. ostreatus* y *P. pastoris*. ..... 145

**Figura 5.2.** Curvas de remoción *P. ostreatus* viable (VB) y no viable (NLB/P.O) ..... 146

**Figura 5.3.** Remoción de lignina para *P. ostreatus* viable (VB), no viable (NLB/P.O), *P. pastoris* viable (VB) y no viable (NLB/P.P) en SBL al 10%, 5% y 1% (v/v). ..... 147

**Figura 5.4.** (a) Actividad lacasa. (b) pH y (c) glucosa residual para *P. ostreatus* en SBL al 10% (v/v) y *P. pastoris* en SBL al 1 y 5 % (v/v). ..... 150

**Figura 5.5.** Determinación del índice de germinación para biomasa viable de *P. ostreatus* y *P. pastoris* viable a las 192 h (sección a de la gráfica). ..... 154

## Resumen

Las lacasas están generando un gran interés debido a sus potenciales aplicaciones en biotecnología. Son oxidasas multicobre que catalizan compuestos aromáticos y no-aromáticos, con la subsecuente reducción del oxígeno molecular a agua. En el presente trabajo se seleccionó el gen codificante para la lacasa *POXA 1B* del hongo *Pleurotus ostreatus*. Éste gen se optimizó para el uso de codones en *Pichia pastoris*, contenido de GC y regiones que generen estructuras secundarias. Se evaluó la interacción del modelo computacional obtenido y su interacción con el sustrato ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-ácido sulfónico)] realizando un docking molecular. Luego de realizar un diseño experimental Plackett-Burman, seguido de un diseño One Factor, se obtuvo una actividad lacasa de  $1,343.52 \pm 40.3 \text{ UL}^{-1}$  a las 168h de cultivo en frascos de 500mL. El sobrenadante concentrado conteniendo la enzima *POXA 1B* mantuvo su estabilidad entre 10-50 °C y retuvo más del 70% de la actividad enzimática residual a 60°C y del 50% a 70°C. Adicionalmente, la enzima fue más estable a pH  $4 \pm 0.2$  con una actividad residual de más del 90%. La actividad residual más baja del 60% se obtuvo a pH  $10 \pm 0.2$ . Adicionalmente, los parámetros cinéticos fueron  $V_{\max}$  de  $3.163 \times 10^{-2} \text{ mM s}^{-1}$ , y  $K_M$  de 1.720 mM. La decoloración del licor sintético a los 5 días de tratamiento fue de 19, 53 y 59%, para las concentraciones de licor de 10, 5 y 1% (v/v), y la remoción de DQO de 5, 30 y 53%, respectivamente; con actividades lacasa de 1399, 1346 y 1327  $\text{UL}^{-1}$  para cada una de las concentraciones evaluadas. Toda esta información reunida, puede considerarse como hallazgos importantes a la luz de la expresión de enzimas recombinantes para su uso en sistemas ambientalmente amigables, debido al amplio rango de sustratos que pueden ser transformados por las lacasas. Contribuyendo a una gran gama de productos en diversos entornos: la industria, el uso clínico y química y aplicaciones ambientales.

**Palabras clave:** tratamiento de licor negro, industria papelera, Diseño Plackett-Burman, Diseño One Factor, *Pichia pastoris*, lacasa recombinante, estabilidad enzimática, purificación, caracterización, cinética enzimática.

## Abstract

Laccases are generating a great interest due to their biotechnological potential applications. They are multicopper oxidases that catalyze aromatic and non-aromatic compounds, concomitantly with molecular oxygen reduction to water. In this work was selected the encoding gene for POXA 1B laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus*. This gene was optimized for codon use in *Pichia pastoris*, GC content, and regions generating secondary structures. Laccase proposed computational model, and their interaction with ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] substrate was evaluated by molecular docking. After using a Plackett-Burman Design followed by a One Factor it was obtained a laccase activity of  $1,343.52 \pm 40.3 \text{ UL}^{-1}$  at 168h of culture in a 500 mL shake-flask. The concentrated supernatant, containing the POXA 1B enzyme, remained stable between 10 and 50°C and retained over 70% residual enzymatic activity at 60°C and 50% at 70°C. Besides the enzyme was more stable at pH  $4 \pm 0.2$  with a residual activity greater than 90%. The lowest residual activity of 60% was obtained at pH  $10 \pm 0.2$ . Furthermore, kinetic parameters were  $V_{\max}$  of  $3.163 \times 10^{-2} \text{ mM s}^{-1}$  and  $K_M$  of 1.720 mM. The decolorization of syntetic black liquor at 5 days of treatment was 19, 53 y 59%, for 10, 5 y 1% (v/v) liquor concentrations, and the DQO removal 5, 30 y 53%, respectively; with a lacase activity of 1399, 1346 y 1327  $\text{UL}^{-1}$  for each different concentration. All this information together can be considered as important findings in light of recombinant enzyme expression system utility for environmentally friendly designed expression systems, because of the wide range of substrates that laccases can transform. Contributing to a great gamut of products in diverse settings: industry, clinical and chemical use, and environmental applications.

**Key words:** Black liquor treatment, paper industry, Plackett-Burman Design, One Factor Design, *Pichia pastoris*, recombinant laccase, enzyme stability, purification, enzyme characterization, enzyme kinetics.

# CAPÍTULO 1.

## DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA TESIS

### 1.1. Introducción

A nivel mundial, la industria de producción de papel puede consumir hasta 4.000 millones de árboles cada año, emplea anualmente alrededor de 3 millones de toneladas de cloro para blanquear la pasta, emite a la atmósfera 100.000 toneladas métricas de dióxido de azufre y 20.000 toneladas de cloroformo y se vierten a los ríos aproximadamente 950.000 toneladas métricas de organoclorados; generando uno de los efluentes más tóxicos que se conocen. Actualmente, entre las estrategias prometedoras para implementar tecnologías en la industria papelera que sean amigables con el ambiente, se encuentra el uso de hongos de podredumbre blanca ya que son los degradadores más eficientes de lignina presentes en la naturaleza. Sin embargo, la producción de enzimas ligninolíticas a partir de las fuentes nativas se ve limitada por los largos tiempos de producción y las concentraciones bajas a las cuales se obtienen, generando desventajas económicas y productivas para el sector. Por esta razón, es necesario diseñar nuevos sistemas de expresión que permitan la producción heteróloga de estas enzimas a bajo costo, en un menor tiempo y en concentraciones superiores a las secretadas naturalmente por los hongos.

### 1.2. Planteamiento del problema y justificación

La industria papelera consume importantes cantidades de agua, energía y productos químicos. Dependiendo del grado de tecnificación de las empresas se pueden utilizar entre 15 y 700 m<sup>3</sup> de agua potable por tonelada de papel. Adicionalmente, los efluentes generados presentan concentraciones variables de DQO (1000-10000 mgL<sup>-1</sup>), DBO5 (500-5000 mgL<sup>-1</sup>), color (1000-8000 UC), pH (6.5-11), Clorofenoles totales (20-50 mgL<sup>-1</sup>), entre otros [1]. La función más estudiada de las lacasas es su participación en el proceso de deslignificación natural, por lo que se ha propuesto emplearlas en la industria de pasta de papel en procesos de biopulpeo, bioblanqueo y tratamiento de los efluentes generados por las operaciones unitarias. Este interés, surge de la necesidad de generar tecnologías de producción más limpia y amigables con el planeta ya que a nivel mundial, la industria de producción de papel puede consumir hasta

4.000 millones de árboles cada año, emplea anualmente alrededor de 3 millones de toneladas de cloro para blanquear la pasta, emite a la atmósfera 100.000 toneladas métricas de dióxido de azufre y 20.000 toneladas de cloroformo y se vierten a los ríos aproximadamente 950.000 toneladas métricas de organoclorados; generando uno de los efluentes más tóxicos que se conocen [2]. Así, el uso de lacasas podría llegar a sustituir total o parcialmente el uso de reactivos químicos como el hipoclorito y dióxido de cloro con la consecuente disminución del impacto ambiental por el vertimiento de residuos líquidos con presencia de cloroligninas y clorofenoles, que generan contaminación principalmente asociada con demanda química y biológica de oxígeno, color, pH y alcalinos.

Estudios recientes han mostrado que el uso directo de lacasas puede alcanzar una degradación rápida y significativa de los sustratos de interés [3]. Sin embargo, es necesario producirlas a bajo costo, disminuir los tiempos de producción y obtenerlas en concentraciones superiores a las secretadas naturalmente por los hongos; ya que su producción a partir de fuentes nativas se encuentra obstaculizada por el hecho de que, en la mayoría de los casos, los hongos secretan estas enzimas como metabolitos secundarios bajo condiciones limitantes de oxígeno u otros nutrientes, y por lo tanto, su expresión puede llegar a ser difícil de regular [4].

En este sentido, la ingeniería de proteínas permite mejorar la estabilidad, actividad y especificidad de una enzima, ajustándose a requerimientos específicos de los usuarios o procesos. Sumado a esto, las levaduras ofrecen la rapidez del crecimiento microbiano y facilidad en la manipulación genética, junto con la habilidad para llevar a cabo modificaciones postraduccionales específicas de eucariotas, como el procesamiento proteolítico, formación de puentes disulfuro y glicosilaciones. Adicionalmente, el crecimiento de levaduras es económico, presenta altos rendimientos y son poco exigentes en términos de tiempo y esfuerzo [5], representando una ventaja para la producción a mayor escala de una lacasa y su posterior utilización en procesos industriales amigables con el planeta.

### **1.3. Objetivo general**

Producir de forma recombinante la lacasa POXA 1B (E.C. 1.10.3.2) de *Pleurotus ostreatus* a escala de laboratorio y evaluar su efecto sobre el tratamiento de los subproductos líquidos que se obtienen en el proceso de blanqueamiento de pulpa de celulosa.

## 1.4. Objetivos específicos

1.4.1. Diseñar una secuencia nucleotídica optimizada a partir de la lacasa POXA 1B de *P. ostreatus* que permita la expresión heteróloga de la enzima recombinante en *Pichia pastoris*.

1.4.2. Estudiar la cinética de crecimiento de *P. pastoris* recombinante y la cinética de producción de la lacasa POXA 1B.

1.4.3. Mejorar el medio de cultivo para la producción de la lacasa recombinante POXA 1B, purificar y caracterizar cinéticamente la enzima.

1.4.4. Evaluar la acción de la lacasa recombinante POXA 1B en el tratamiento del licor negro que se genera en el proceso de blanqueamiento de la pulpa de celulosa.

## 1.5. Contexto global de la metodología

Se realizó un análisis bioinformático inicial para optimizar la secuencia del gen *POXA 1B* en el uso de codones para la expresión constitutiva bajo el promotor *pGAP* en *P. pastoris*, contenido de GC, elementos reguladores *cis* y secuencias repetitivas. El gen sintético optimizado se insertó en el vector de expresión pGAPZ $\alpha$ A, integrándose al genoma de la levadura. Posteriormente, se llevó a cabo la producción, optimización de las condiciones de cultivo, purificación y caracterización de la enzima recombinante, para finalmente realizar las pruebas preliminares de tratabilidad sobre los residuos líquidos que se producen en el proceso de producción de pasta de celulosa en la industria papelera (licor negro de pulpeo).

## 1.6. Referencias

1. Kamali M, Khodaparast Z. Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2015; 114: 326-342.
2. Sakurai T, Kataoka K: Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007, 64: 2642-2656.
3. Ruiz-Dueñas FJ, Martínez ÁT: Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology* 2009, 2: 164-177.
4. Thurston CF: The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 1994, 140: 19-26.
5. Nakamura K, Goa N: Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005, 62: 2050-2066.

**CAPÍTULO 2.**  
**MARCO TEÓRICO**

## 2.1. Introducción

Las lacasas (E.C. 1.10.3.2) también llamadas p-difenol: dióxido oxidoreductasas forman parte del subgrupo más amplio de oxidasas azules multi-cobre (MCOs). Este subgrupo tiene la capacidad de catalizar la oxidación de una gran variedad de compuestos orgánicos aromáticos (orto y para-difenoles, fenoles metoxi-substituidos, polifenoles, aminas aromáticas, bencenotioles, hidroxindoles, el 1-naftol, la siringaldazina y diferentes compuestos no fenólicos) de manera concomitante con la reducción del oxígeno molecular a agua [1,2]. Otros sustratos que también pueden ser transformados por las lacasas incluyen los compuestos metálicos inorgánicos/orgánicos, el  $Mn^{3+}$  y el  $Fe(EDTA)^{2-}$  [3]. Existen más de 200 tipos de oxidasas, oxidorreductasas y sólo 6 clases de enzimas (citocromo-*c* oxidasa, lacasas, *L*-ascorbato oxidasa, ceruloplasmina, bilirrubin oxidasa y fenoxazinona sintetasa) que tienen la capacidad de catalizar este tipo de reacción del oxígeno [4]. Debido al amplio rango de compuestos que pueden ser oxidados por las lacasas, es difícil clasificarlas de acuerdo al sustrato reductor; sobre todo si se tiene en cuenta que el tipo de sustrato puede cambiar de una lacasa a otra (debido a su alta variación en el potencial redox ( $E^0$ ) de las lacasas) [5,6].

En los últimos años, se ha incrementado el uso industrial de las enzimas; las de origen fúngico y en especial las lacasas, son de gran interés en ciertos procesos biotecnológicos ya que a diferencia de otras peroxidadas, no utilizan el peróxido de hidrógeno en su proceso catalítico, presentando además una alta estabilidad y la posibilidad de usarlas de forma inmovilizada, empleando diferentes tipos de soportes orgánicos o inorgánicos [7]. Aunque la mayoría de los sustratos de las lacasas son compuestos fenólicos, la actividad de la enzima puede extenderse a compuestos no fenólicos con el uso de mediadores como el ABTS (2,2'azino bis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)) y el HBT (1-hidroxibenzotriazol) [8]. La adición de estos mediadores amplía la posibilidad de utilización de lacasas en procesos industriales relacionados con biorremediación; incluyendo deslignificación de la pulpa de celulosa, decoloración y detoxificación de colorantes industriales, biorremediación de compuestos xenobióticos, tratamiento de aguas residuales y, tratamiento de otros contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), plaguicidas, explosivos y antibióticos [9].

La enzimología general de las lacasas ha sido discutida en numerosas revisiones y varias de ellas presentan descripciones con respecto al rango tan amplio de aplicaciones biotecnológicas [9-

16]. Sin embargo, la intención de esta revisión se centra en ofrecer una panorámica de los aspectos aún no concluyentes relacionados con las lacasas, vistas desde el gen hasta la proteína; así como una presentación detallada de la diversidad estructural de las lacasas obtenidas por cristalografía.

## 2.2. Organismos productores de lacasas y actividad biológica

La primera descripción de una lacasa fue realizada por Yoshida en 1883, descubierta en el látex del árbol *Rhus vernicifera* [17]; posteriormente, se describió su mecanismo de acción luego de que fue aislada y purificada por Bertrad (1894) [18], (hechos que corresponden a una de las descripciones más antiguas de una enzima). Inicialmente se atribuía este tipo de actividad de manera exclusiva a plantas superiores y hongos. Sin embargo, actualmente se reconoce que las lacasas son enzimas casi ubicuas [5], pues se han aislado de plantas, hongos (Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes), procariontas y artrópodos.

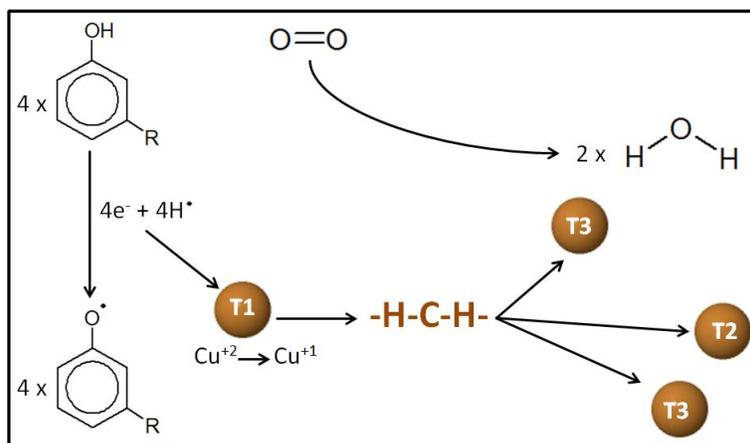
En plantas, las lacasas se pueden encontrar en coles, nabos, papa, pera, manzana, y otros vegetales [16]; participando en la biosíntesis de lignina para la formación de la pared celular [14]; sin embargo, la purificación desde extractos crudos vegetales es compleja razón por la cual no se ha estudiado mucho [6]. En el caso de las lacasas presentes en insectos, la función principal se encuentra relacionada con el proceso de esclerotización en la formación de la cutícula en la epidermis [1,4]. En bacterias, parece ser que las lacasas se encuentran involucradas en procesos de morfogénesis, homeostasis del cobre, biosíntesis de pigmentos y en la protección de las esporas contra la luz UV y el peróxido de hidrógeno [6,19].

Las lacasas mejor caracterizadas corresponden a los hongos, debido a su alto potencial redox. Por esta razón, han sido de gran interés en aplicaciones industriales como deslignificación de compuestos lignocelulósicos, biopulpeo y bioblanqueo, transformación de colorantes de la industria textil, tratamiento de aguas residuales y degradación de diferentes compuestos recalcitrantes [10,14,16]. Las lacasas de los hongos están implicadas en procesos de deslignificación, esporulación, producción de pigmentos como melaninas, formación del cuerpo fructífero, y patogénesis en plantas [20]. Se destacan los *Basidiomycetes* de podredumbre blanca por ser eficientes degradadores de lignina, celulosa y hemicelulosa, llevándola a dióxido de carbono [21] y por lo tanto los más estudiados en la actualidad (Tabla 2.1). Hasta el

momento se han purificado y caracterizado más de 100 lacasas a partir de hongos *Basidiomycetes* y *Ascomycetes* [6].

En el proceso catalítico llevado a cabo por las lacasas, los radicales libres resultantes sufren diferentes reacciones dependiendo de su estructura original y de las condiciones de reacción. Las reacciones más frecuentes son el acoplamiento de radicales libres el cual genera productos diméricos o poliméricos y las carboxilaciones oxidativas. La oxidación de los sustratos va acoplada a la reducción del oxígeno molecular a dos moléculas de agua. Esto significa que por cada molécula de oxígeno reducida, se oxidan 4 moléculas de sustrato sin producir peróxido de hidrógeno ( $4\text{H}^+ + 4\text{sustrato} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{sustrato}^+$ ) [22]. Por esta razón, las lacasas se consideran catalizadores “verdes ideales” ya que emplean  $\text{O}_2$  como co-sustrato generando únicamente  $\text{H}_2\text{O}$  como subproducto.

La reacción descrita se lleva a cabo por un grupo de 4 átomos de cobre (un cobre tipo I, un cobre tipo II y 2 cobres tipo III). El cobre tipo I (Cu T1) es el que le confiere a la enzima el color azul típico, lo que genera la absorción a 605nm, como consecuencia de la unión covalente Cu-Cys. En el cobre tipo I ocurre la oxidación monoeléctrica del sustrato y por lo tanto es el primer aceptor de electrones. Los cobres tipo II y III (Cu T2 y Cu T3 respectivamente) forman un grupo trinuclear, a los cuales son transferidos los electrones y donde tiene lugar la reducción del  $\text{O}_2$ . El mecanismo de reacción funciona de manera similar a una batería; almacenando electrones de las reacciones de oxidación individuales para reducir el oxígeno molecular y producir agua después de haber recibido cuatro electrones [6,9,23], (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Ciclo catalítico de la lacasa. Los sustratos son oxidados por el centro de Cu-TI y los electrones se transfieren a través del motivo tripéptido altamente conservado His-Cys-His hacia el sitio donde se encuentran los centros de cobre TII y TIII, y en este lugar se realiza la reducción del oxígeno molecular a agua. Figura modificada de [21].

El potencial redox ( $E^0$ ) de las lacasas tiene una relación directa con la energía requerida para arrebatarse un electrón al sustrato reductor, constituyendo una de las características fundamentales de estas enzimas. De hecho, el comportamiento catalítico de las lacasas sobre la mayoría de los sustratos reductores depende del  $E^0$  en el Cu TI, ya que este es el aceptor de electrones [24,25]. Así, las lacasas con mayor  $E^0_{T1}$  son de interés especial en biotecnología al ser capaces de oxidar sustratos con mayor  $E^0$  como ciertos hidrocarburos aromáticos policíclicos o diversos colorantes orgánicos sintéticos. El  $E^0$  de varias lacasas se ha estudiado a profundidad mediante técnicas espectro-electroquímicas, principalmente voltamperometría cíclica y valoraciones redox [26-28]. El  $E^0$  del Cu TI de algunas lacasas fúngicas es mayor ( $E^0_{T1}$  cercano a +800 mV) comparado con el de las lacasas de plantas o bacterias (por ejemplo la lacasa de *Rhus vernicifera* con  $E^0_{T1} = +400$  mV) y otras oxidasas azules multi-cobre (ascorbato oxidasa, E.C. 1.10.3.3 con  $E^0_{T1} = +340$  mV) [20,29]. Sin embargo, es importante señalar que también existen diferencias marcadas en los  $E^0_{T1}$  de las diferentes lacasas fúngicas, desde +465 mV de la lacasa del Ascomicete *Myceliophthora thermophila*, hasta +790 mV de la lacasa del Basidiomicete *Pycnoporus cinnabarinus* [25,30]. En este sentido, se ha intentado dilucidar cuáles son los factores que determinan las diferencias en el  $E^0_{T1}$ ; sobre todo si se tiene en cuenta el alto grado de conservación en las geometrías de coordinación de los sitios de Cu [26].

Sin duda alguna, los factores que afectan el potencial redox de las metaloproteínas son variados y de gran complejidad; la solvatación, las interacciones metal-ligando, las interacciones

electrostáticas intramoleculares y/o las restricciones del plegamiento de la proteína (regulan la posición y orientación de los ligandos) pueden modular los valores de  $E^0$  de estas enzimas [31].

### 2.3. Familias de genes de lacasas

En los estudios realizados para la caracterización de lacasas en hongos, el común denominador ha sido la multiplicidad de genes y la producción de numerosas isoenzimas en distintas especies. El primer reporte de una familia de genes de lacasa en hongos, se realizó por Perry *et al.*, (1993) [32], quienes describieron la presencia de dos genes de lacasa en el mismo cromosoma del Basidiomicete *Agaricus bisporus*. Algunos ejemplos adicionales de la presencia de familias génicas de lacasas en hongos, incluyen la descripción de cinco lacasas distintas en *Trametes villosa* [33] y *Trametes sanguinea* [34], cuatro en *Rhizoctonia solani* [35], y tres en *Trametes* sp. I62 [36], *Trametes* sp. AH28-2 [37], y *Gaeumannomyces graminis* [38]. También se han descrito familias de genes en el género *Pleurotus*, con cuatro genes aislados en *P. sajor-caju* [39], dos en *P. euryngii* [40], y siete en *P. ostreatus* [41].

El estudio de los mecanismos de regulación de la expresión génica de lacasas ha ganado interés en los últimos años. Esto se debe a la necesidad de comprender el rol fisiológico de las distintas isoformas producidas en diferentes organismos, y a la ventaja que este conocimiento representa para mejorar los procesos de producción de lacasa a nivel industrial. La síntesis y secreción de lacasas se encuentran altamente influenciadas tanto por los niveles de nutrientes, relación C/N, condiciones de cultivo, estado de desarrollo del hongo, como por la adición al medio de cultivo de una variedad de agentes inductores [42]. Los factores que influyen la expresión de lacasas, actúan de forma sinérgica o antagónica, e incluyen regulación por iones metálicos [43,44], compuestos aromáticos relacionados con la lignina o derivados de ella [45], así como fuentes de nitrógeno [43] y carbono [46]. Los pocos reportes en los que se han investigado los mecanismos moleculares de regulación, sugieren la existencia de un sistema complejo de elementos reguladores en *cis* [42]; sin embargo, la descripción de un mecanismo general para la regulación transcripcional de lacasas aún no es clara.

La caracterización de las familias de genes de lacasas, se ha podido llevar a cabo, debido al número creciente de secuencias genómicas disponibles [47]. Sin embargo, el hecho de encontrar familias multigénicas para la producción de este tipo de enzimas, genera una

interrogante ¿Cuál es la razón para que un hongo requiera más de una enzima lacasa?. Algunos autores, plantean que la presencia de numerosos genes para producir variantes de la misma enzima, puede explicarse como consecuencia de la diversidad de funciones fisiológicas desarrolladas por las lacasas durante el ciclo de vida de un hongo [5,48], ya que se encuentran involucradas en la deslignificación, formación del cuerpo fructífero, patogénesis, formación de pigmento durante el desarrollo asexual e interacciones de competencia [49]. Los análisis filogenéticos realizados para las lacasas producidas por Basidiomicetes soportan este argumento, debido a la presencia clusters funcionales en los árboles filogenéticos obtenidos por Neighbor-Joining [47,48].

#### **2.4. Fisiología microbiana de la producción de lacasas**

Entre de los hongos Basidiomicetos, *Trametes* sp. (con *T. versicolor* como organismo modelo), se considera el organismo más estudiado en cuanto a la producción de lacasas [50,51] debido a su gran capacidad para degradar lignina y se reporta que algunas especies producen lacasas de manera predominante o incluso como única enzima ligninolítica [51]; característica de importancia a nivel industrial ya que simplifica los procesos de purificación de la enzima de interés.

Aunque un gran número de estudios reportan lacasas intracelulares, la mayor cantidad de lacasas son glicoproteínas extracelulares, secretadas de forma constitutiva por hongos filamentosos [52]. Se producen generalmente durante el metabolismo secundario de diferentes hongos y su producción se encuentra influenciada por varios parámetros como la especie, el tipo de cultivo (estacionario o agitado), agitación, aireación, tiempo de cultivo, inductores metálicos o presencia de compuestos aromáticos [52-54]. Sin embargo, entre los factores más críticos se encuentran la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, así como la naturaleza y concentración del agente inductor [15]. Estas exigencias se consideran limitantes para la producción de lacasas fúngicas a gran escala, debido a que se obtienen bajas concentraciones de las enzimas al cultivar los hongos sobre madera o en cultivo sumergido [55]. Sin embargo, el metabolismo microbiano se puede “controlar” por las condiciones del ambiente y la composición del medio de cultivo, debido a la existencia de elementos de respuesta en las regiones promotoras de los genes de lacasas, que se pueden activar por ciertos compuestos xenobióticos, metales pesados o por choque térmico [56,57].

Es importante aclarar que una alta concentración de biomasa en el cultivo, no implica una relación directa con el incremento en la producción de lacasas [52]. No obstante, se pueden alcanzar mayores concentraciones cuando se induce la producción de lacasas con la adición de compuestos aromáticos como la 2,5-xilidina, el ácido ferúlico, guaiacol, aminas, ácido benzoico o, la *o*-Toluidina, entre otros [51,52]; siendo la 2,5-xilidina uno de los inductores más eficientes. Se ha reportado que luego de 24 horas de cultivo de *Picnoporus cinnabarinus*, la adición de 1.212 mgL<sup>-1</sup> de 2,5-xilidina produce la máxima actividad lacasa con un incremento de nueve veces en comparación al cultivo sin el agente inductor [58-60]. El aumento en la producción de lacasas como consecuencia de la presencia de este tipo de inductores puede explicarse a causa de que la estructura de los inductores es similar a las moléculas de lignina u otros agentes químicos de naturaleza fenólica [7]. Sin embargo, cuando estos inductores se agregan en concentraciones superiores a 200 mgL<sup>-1</sup>, se puede observar un efecto contrario al esperado y la producción de lacasas puede disminuir [59,60]. Otro inductor importante para la producción de lacasas es el cobre, y se ha demostrado que la adición de concentraciones bajas de Cu<sup>+2</sup> al medio de cultivo, estimula la producción de lacasas en hongos de podredumbre blanca [61,62]. Palmieri *et al.*, encontraron que la adición de 150 μM de sulfato de cobre, incrementaba la actividad lacasa 50 veces en comparación con el cultivo control [63].

Aunque muchas investigaciones se han enfocado en tratar de ensayar diferentes agentes inductores para incrementar la producción de lacasas, la inducción combinada ha sido un campo poco explorado y sólo unos pocos autores han llevado a cabo experimentos combinando varios inductores para evaluar los cambios en la producción y actividad lacasa. Tong *et al.* (2007), indujeron la producción de lacasa en *Trametes* sp. 420, adicionando 0.5 mM de Cu<sup>+2</sup> y 6 mM de *o*-toluidina; en este estudio se encontraron valores de producción de lacasa entre 6.810 UL<sup>-1</sup> y 7.879 UL<sup>-1</sup> [51]. Tinoco *et al.*, [64] en otro estudio adicionaron cobre y lignina de manera simultánea y observaron un incremento en el crecimiento, actividad volumétrica de lacasa y el proceso de producción de 4, 60 y 10 veces respectivamente; abriendo nuevos caminos hacia la búsqueda de un proceso más eficiente en la producción de lacasas a partir de hongos de podredumbre blanca.

En cuanto a la influencia de la fuente de carbono, se ha observado que las fuentes que son rápidamente degradadas como la glucosa, el manitol y la celobiosa, usualmente producen

actividades altas de lacasa, en comparación con otros sustratos que son degradados más lentamente como la celulosa o la lactosa [65]. En algunos casos, ocurre un incremento en la actividad lacasa de manera concomitante con el incremento en el crecimiento de los hongos, pero algunos estudios han mostrado que la actividad específica de lacasas se puede incrementar de acuerdo a la elección de la fuente de carbono. Por ejemplo, Mansur *et al.*, observaron que el uso de fructosa en lugar de glucosa, produjo un incremento de 100 veces en la actividad lacasa específica [66]. Adicionalmente, Rodríguez-Couto *et al.*, demostraron que la adición secuencial de distintas fuentes de carbono como glucosa seguida de glicerol, resultó en un incremento en la tasa de producción de lacasas en *Trametes hirsuta* en comparación con los cultivos suplementados únicamente con glucosa o celulosa [67]. Para numerosas especies, la glucosa es un represor típico de la producción de lacasas, lo cual quiere decir que los inductores y las fuentes de carbono óptimas, dependen de la especie y la cepa de hongo con el que se esté trabajando; lo que implica que hay que estudiar este comportamiento en cada caso y que no se debe asumir la fuente de carbono o agente inductor en función de trabajos previamente publicados. Estos resultados también sugieren una regulación génica de la expresión de lacasas diferente para cada organismo.

Con respecto a la influencia del nitrógeno, la mayoría de los autores reportan que las lacasas se producen por agotamiento de la fuente de nitrógeno [15], pero otros han encontrado que en algunas cepas el nitrógeno no tiene un efecto sobre la cantidad y actividad de las lacasas [52]; incluso se reporta la producción temprana de lacasas en medios ricos en nitrógeno comparados con medios donde existen condiciones limitantes de la fuente de nitrógeno [68]. Estos datos sugieren que existe cierta ambigüedad con respecto a la concentración óptima de nitrógeno para la producción de lacasas, ya que se encuentran reportes con una alta actividad lacasa donde la relación carbono-nitrógeno es baja [69]; en contraste, otros autores reportan mayores producciones de lacasa cuando la relación carbono-nitrógeno es alta [70].

## **2.5. Diversidad estructural de lacasas fungicas; análisis bioinformático**

La lacasa es una enzima monomérica formada por tres dominios tipo cupredoxina, un plegamiento característico de oxidasas multicobre azul y otras pequeñas proteínas de cobre como la plastocianina de plantas o la azurina bacteriana [4]. Normalmente son glicoproteínas extracelulares con un peso molecular que oscila entre 50 y 140 kDa y con una gran diversidad

tanto en el tamaño (10-45% del peso total) como en el patrón de glicosilación [71]. La mayoría de las lacasas fúngicas contienen un total de 520-550 aminoácidos, sin incluir la secuencia del péptido señal de ~20 residuos [3]. En la [figura 2.2](#) se presenta un ejemplo de la distribución de los 3 dominios cupredoxina en la secuencia de las lacasas. Para este ejemplo, se usó la secuencia de la lacasa 2QT6 del hongo Basidiomiceto *Lentinus tigrinus* [72].

La [figura 2.2](#), muestra la organización característica de una lacasa proveniente de hongos Basidiomicetes, donde se observan los tres dominios de tipo cupredoxin, ordenados de forma secuencial (dominios 1, 2 y 3 en colores verde, amarillo y rojo, respectivamente). Cada uno de ellos tiene una topología de  $\beta$ -barril, común a todos los miembros de la familia de las MCOs [5]. El cobre tipo I (Cu T1) se encuentra localizado en el dominio 3, mientras que el centro trinuclear se encuentra integrado entre los dominios 1 y 3, con ambos dominios proporcionando los residuos para la coordinación de los cobres. La estructura se estabiliza con 2 puentes disulfuro entre los dominios 1 y 3 y entre los dominios 1 y 2 [73].



**Figura 2.2.** Representación de los 3 dominios cupredoxin en la estructura de una lacasa. La secuencia mostrada corresponde a la estructura 2QT6 de la lacasa proveniente de *Lentinus trigrinus*. En verde el dominio 1, en amarillo el dominio 2 y en rojo el dominio 3. Las secuencias utilizadas para generar la figura provienen del banco de datos de proteínas ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) y base de datos de clasificación de estructura de proteínas CATH ([www.cathdb.info](http://www.cathdb.info)).

Diferentes estudios de alineamiento múltiple con más de 100 secuencias de lacasas revelan que la estructura terciaria de los sitios redox y la coordinación de los sitios de Cu es muy conservada [30,74]. Los 8 ligandos de His del *cluster* trinuclear T2/T3 muestran un patrón altamente conservado de 4 motivos His-X-His. En uno de estos motivos, X es la Cys que se une al Cu T1, mientras que las His adyacentes se unen a cada uno de los dos Cu del sitio T3. A una separación de 35-75 residuos de aminoácidos hay otro motivo His-X-His y cerca del amino terminal hay otros dos motivos separados por 35-60 residuos de aminoácidos [75]. Los doce aminoácidos que sirven de ligando para los cuatro átomos de Cu se encuentran

localizados dentro de cuatro segmentos de secuencias separadas y con una longitud de entre 8 y 24 residuos (L1-L4); esta es una característica de las lacasas que las diferencia del resto de oxidasas multicobre azul. Además, existe una homología intraprotéica entre L1 y L3 así como entre L2 y L4 que sugiere la existencia de un evento de duplicación en la evolución de las lacasas. La elevada conservación del sitio activo de las diferentes oxidasas de Cu, sugiere que la actividad relacionada con los tres sitios diferentes de Cu fue un evento evolutivo muy temprano [76].

Para esta revisión, se realizó un alineamiento donde se usaron 12 de las 28 secuencias de las estructuras de lacasas fúngicas de Basidiomicetes y Ascomicetes; todas obtenidas por cristalografía y reportadas en el Protein Data Bank (PDB), (Tabla 2.1). En el alineamiento, se omitieron las secuencias duplicadas, las secuencias con mutaciones inducidas y las que no cuentan con citación disponible (artículo publicado), (Figura 2.3).

```

2H5U -----AVGPFVADNTITDAATSPDGF--SRQAVVVVNGVTPGLVAGNIGDRFQLNVIIN 51
3DIV -----AVGPFVADNTITDAATSPDGF--SRQAVVVVNGVTPGLVAGNIGDRFQLNVIIN 51
3FPX -----AVGPFVADLTITDAAVSPDGF--SRQAVVVVNGVTPGLVAGNIGDRFQLNVIIN 51
1KYA -----GIGFVADLTITNAAVSPDGF--SRQAVVVVNGVTPGLITGNMGDRFQLNVIIN 51
2HZH -----AIGPSANLVVINAADVADGH--SRDAVVVNGVTPGLITGNMGDRFQLNVIIN 51
1GYC -----AIGPAASLVVINAAPVSPDGF--LRDAIVVNGVTPGLITGNMGDRFQLNVIIN 51
2QT6 -----AVGPFVADLTITNANIVPDGF--EAAIVVNVNVPGLITGNMGDRFQLNVIIN 51
3KW7 -----AIGPVTDLTISNADVTPDGF--TRAAVVANGVTPGLITGNMGDRFQLNVIIN 51
1V10 -----MPSFASLKLVLVLSLTSLSLAATVALDLHLNANLDFDGTGARSVAETGTTIAPLITGNIDDRFQLNVIIN 72
1A65 -----CIVNSVDVMTLTNANVSPDGF--TRAGILVNGVH--GELIRGGKNDNFELNVIIN 51
1GWO -----EPTCNTPSNRACVSDGFDINTDYEVSPTDPTQVTSYVFNLETVDNWVMDGVVKEKMLNMGINMGBNIVANWGTVEVTVIN 84
3PFS MKSAAVAALVAVGILS PHAAAPAFVQRCMLQVLEARQSGPTCNTPSNRACVNGFDINTDYEVSPTDPTQVTSYVFNLETVDNWVMDGVVKEKMLNMGINMGBNIVANWGTVEVTVIN 85

2H5U LTNHTMLKSTISVHGFQQGTINWADGPAFINOCPI SPGHSFLYDFQVFNQAGTFWVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 171
3DIV LTNHTMLKSTISVHGFQQGTINWADGPAFINOCPI SPGHSFLYDFQVFNQAGTFWVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 171
3FPX LTNHTMLKSTISVHGFQQGTINWADGPAFINOCPI SPGHSFLYDFQVFNQAGTFWVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 171
1KYA LTNHTMLKSTISVHGFQQGTINWADGPAFINOCPI SPGHSFLYDFQVFNQAGTFWVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 171
2HZH LTNHTMLKSTISVHGFQQGTINWADGPAFINOCPI SPGHSFLYDFQVFNQAGTFWVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 171
1GYC LTNHTMLKSTISVHGFQQGTINWADGPAFINOCPI SPGHSFLYDFQVFNQAGTFWVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 171
2QT6 LTNHTMLKSTISVHGFQQGTINWADGPAFINOCPI SPGHSFLYDFQVFNQAGTFWVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 171
3KW7 LTNHTMLKSTISVHGFQQGTINWADGPAFINOCPI SPGHSFLYDFQVFNQAGTFWVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 171
1V10 LTNHTMLKSTISVHGFQQGTINWADGPAFINOCPI SPGHSFLYDFQVFNQAGTFWVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 171
1A65 LTNHTMLKSTISVHGFQQGTINWADGPAFINOCPI SPGHSFLYDFQVFNQAGTFWVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 171
1GWO LVTH---GISLHQRKLNLDHSGANGVTECEIPFKGGRKTYKFRATQVGSVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 170
3PFS LKTH---GISLHQRKLNLDHSGANGVTECEIPFKGGRKTYKFRATQVGSVHSHLSTQYCDLGRGPFVVDVNDPHASRYDNDVNDTITLADWVHTAAKL---GP--RFPAGADATLL 200

2H5U NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 291
3DIV NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 291
3FPX NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 291
1KYA NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 291
2HZH NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 291
1GYC NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 291
2QT6 NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 291
3KW7 NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 291
1V10 NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 291
1A65 NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 291
1GWO NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 332
3PFS NGKGRAPSDTSA--ELSVIKVTGKRRYRFRVLVSLSDPNFTFSDIGHNLITIEVDSSNSQPLSVDSIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFNGVGFNG---GINSAILRYDGAFAVEFTT 362

2H5U NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 405
3DIV NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 405
3FPX NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 405
1KYA NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 405
2HZH NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 405
1GYC NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 405
2QT6 NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 405
3KW7 NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 410
1V10 NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 427
1A65 NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 406
1GWO NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 441
3PFS NQTTT---VKPLNEVNLHPLVSTPVGSPSSGGVDKAINMAFNFGS---NFFINGASVFPSP--VEVLLQLLSGAQTAQDQLLPSGSSVYVLEPSNASIEISFPATAA----APGAFPFLLHSHAF 482

2H5U VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 499
3DIV VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 499
3FPX VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 499
1KYA VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 499
2HZH VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 499
1GYC VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 499
2QT6 VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 499
3KW7 VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 502
1V10 VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 502
1A65 VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 501
1GWO VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 501
3PFS VVRSAGSTVYNYNPIFRDVTSTGTPAAGDNVTIR-----FLINNPFQWFLHCHDFDELEGFAVVAQEDVDPVKAATNP-----VQAWSDLCEPTYDANAPSDQ----- 504

```

**Figura 2.3.** Alineamiento con ClustalW2 [77] de secuencias proteicas de lacasas que cuentan con estructuras obtenidas por cristalografía. Las posiciones idénticas se encuentran señaladas con asterisco y resaltadas en gris, además se indican los sitios de unión de los ligandos (residuos aminoácidos) a los átomos de cobre: 1 (unión a cobre T1), 2 (unión a cobre T2) y 3 (unión a cobre T3).

La determinación cristalográfica de la estructura tridimensional de una proteína es una herramienta fundamental para realizar estudios que relacionen dicha estructura con la función; sin embargo, desde el primer reporte de una estructura de lacasa fúngica realizado por Ducros *et al.*, [78], sólo unos pocos reportes de estructuras obtenidas por esta metodología se han sumado a la lista. Hasta el momento, se pueden encontrar en el Protein Data Bank (PDB) <http://www.pdb.org> un total de 48 estructuras de lacasas, de las cuales 28 son de origen fúngico, 18 de ellas (1A65, 1HFU, 1KYA, 1GYC, 1V10, 2H5U, 2HRG, 2HRH, 2HZH, 2QT6, 3FPX, 3DIV, 3KW7, 2XBY, 3PXL, 4A2D, 4A2E y 4A2H) provienen de 11 especies de Basidiomicetes: *Coprinopsis cinerea*, *Trametes versicolor*, *Rigidoporus microporus*, *Cerrena maxima*,

*Trametes trogii*, *Coriolus zonatus*, *Lentinus tigrinus*, *Trametes hirsuta*, *Trametes sp.* AH28-2, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Corioloopsis gallica*; y las 10 restantes (1GW0, 2IH8, 2IH9, 2Q9O, 3DKH, 3FU7, 3FU8, 3FU9, 3PPS y 3QPK) provienen de 2 especies de Ascomicetes: *Melanocarpus albomyces* y *Thielavia arenaria* (Tabla 2.1).

Con respecto a las 18 estructuras de lacasas obtenidas a partir de hongos Basidiomicetes, Ducros *et al.*, en 1998 reportaron la estructura de una lacasa (PDB 1A65) a una resolución de 2.20 Å. Se trató de un monómero compuesto por 3 dominios beta-sándwich tipo cupredoxin, similares a los encontrados en la enzima ascorbato oxidasa (E.C. 1.10.3.3). Sin embargo, el cobre mononuclear tipo 1, carece del ligando metionina axial, por lo tanto, exhibe una coordinación trigonal planar; lo que es consistente con su potencial redox elevado. Adicionalmente, en la estructura está ausente el cobre tipo 2 y esto tiene consecuencias para la coordinación de los átomos de cobre tipo 1 y tipo 3 en el sitio activo. En el año 2001, estos mismos autores reportaron la estructura 1HFU de la lacasa 1, la cual reveló la existencia de al menos 2 isoformas de la enzima y se concluyó que en las estructuras con ausencia de cobre tipo 2 se evidencia una pérdida de señal al realizar el espectro de resonancia paramagnética electrónica, lo cual puede explicarse por los cambios conformacionales de la estructura, debido a la ausencia de cobre [79]. Ambas estructuras 1A65 y 1HFU, fueron obtenidas a partir de *Coprinopsis cinerea* usando como sistema de expresión *Aspergillus oryzae*; es importante aclarar que con respecto a las secuencias de residuos aminoácidos, estas enzimas se diferencian únicamente en que 1HFU inicia con Ala en lugar de Gln y no posee Val en el extremo carboxilo.

En otros reportes se obtuvieron las estructuras de lacasas 1KYA y 1GYC a partir del hongo *Trametes versicolor*. La estructura 1KYA reportada en el trabajo de Bertrand *et al.*, fue la isoforma más abundante de las 5 que se pueden presentar en función del patrón de glicosilación. En esta estructura se presentan los cuatro átomos de cobre, así como el compuesto 2,5-xylydine, usado como inductor de la producción de lacasa en el medio donde se cultivó el hongo; en la estructura la lacasa se encuentra formando el complejo enzima-sustrato con arilamina, que es un sustrato reductor débil. Esta fue la primera estructura de una oxidasa multicobre, obtenida con alta resolución y formando un complejo con un sustrato reductor. La cavidad donde se encuentra el 2,5-xylydine es amplia y permite acomodar sustratos de varios tamaños, algunos de

los residuos aminoácidos de esta cavidad presentan interacciones hidrofóbicas con el anillo aromático de este ligando, adicionalmente dos residuos polares interactúan con su grupo amino. El primero es una His que coordina el cobre que funciona como aceptor primario de electrones y el segundo es el Asp, conservado entre las lacasas fúngicas. Esta estructura provee un modelo que puede servir para mejorar lacasas por medio de ingeniería de proteínas, hacerlas más eficientes o con mayor especificidad por el sustrato.

Otra estructura perteneciente a la lacasa 2 (1GYC) fue reportada por Piontek *et al.*, en el 2002; en la que se observa la estructura cristalina de la lacasa con los átomos de cobre completos junto con 7 fracciones de carbohidratos en la cadena proteica. A pesar de la presencia de todos los cobres en esta estructura, el cobre tipo 1 no presenta un ligando axial, razón por la cual aumenta ligeramente el potencial redox [26].

Por otra parte Garavaglia *et al.*, elucidaron una estructura que denominaron 1V10, una lacasa del hongo Basidiomicete *Rigidoporus lignosus*, donde reportaron la secuencia del cDNA, las secuencias de la proteína, las modificaciones postraduccionales y una pre-secuencia de 21 residuos de aminoácidos, correspondientes al péptido señal. Además, identificaron 2 sitios de glicosilación en las Asn 337 y 435. El análisis del clúster trinuclear de los átomos de cobre tipo 2 y 3 mostró una esfera de coordinación no reportada anteriormente para los átomos de cobre tipo 3. La estructura reportada representa un intermediario en la reacción de reducción de oxígeno a agua, que toma lugar en el clúster trinuclear de cobre [80]. Por otro lado, la estructura tridimensional de una lacasa obtenida del hongo *Coriolus zonatus* (*Trametes ochracea*) fue resuelta a una resolución de 2.60 Å (2HZH), esta lacasa existe como monómero con 3 dominios de tipo cupredoxin, el primer dominio está unido al segundo y al tercer dominio por 2 puentes disulfuro (Figura 2.2). En el sitio activo los átomos de cobre tipo 2 y 3 forman un clúster trinuclear localizado entre los dominios 1 y 3, además, el átomo de cobre tipo 1 está localizado en el dominio 3 cerca del sitio de enlace del sustrato. Se encontraron 2 canales de agua en dirección al centro trinuclear y las moléculas de agua en estos canales forman diversos puentes de hidrogeno con los residuos aminoácidos de las paredes del canal. En la estructura de esta lacasa se encontraron 3 sitios de glicosilación, 2 con N-acetilgalactosamina y uno con manosa; los enlaces covalentes con estos carbohidratos juegan un papel importante en la estabilidad y el ordenamiento de los cristales [81].

Ferraroni *et al.*, en el 2007, obtuvieron la estructura 2QT6 de una lacasa de *Lentinus tigrinus*, que es una glicoproteína relacionada con la degradación de lignina, esta estructura reveló una unidad asimétrica (estructura cuaternaria) conteniendo 2 moléculas de lacasa (A y B). En este trabajo lograron detectar 2 intermediarios en la vía de reducción del oxígeno molecular y este fue el primer reporte de una oxidasa multicobre que permitió esta detección, ya que hasta ese momento sólo se tenían predicciones logradas por espectroscopia, cinética y estudios de mecánica molecular. Esta evidencia permitió aproximarse de manera más precisa al mecanismo de la reducción de dioxígeno, catalizada por oxidases multicobre [72]. En el año 2009 Polyakov *et al.*, realizaron el análisis estructural de una lacasa de *Trametes hirsuta* (3FPX) [82], encontraron Phe en posición axial al centro de cobre tipo 1 y Leu en el otro lado, posicionada a aproximadamente la misma distancia. Es importante resaltar que el residuo Phe se encuentra altamente conservado entre lacasas con alto potencial redox [26,83-85], además, los residuos aminoácidos que forman el bolsillo donde se enlaza el sustrato en esta lacasa contienen más residuos aromáticos que las lacasas con potencial redox medio [78,79] y bajo [86]. Esta estructura de lacasa corresponde a las llamadas intermediario nativo ya que según los mecanismos propuestos de acción catalítica para la reducción de oxígeno a agua en el centro de cobre tipo 2/3, en solución las lacasas pueden presentarse como la forma llamada enzima en descanso o en la forma de intermediario nativo, donde ambas formas son catalíticamente activas.

La estructura de la lacasa proveniente del hongo *Cerrena maxima* se resolvió en el 2010 por Zhukova *et al.*, con una resolución de 1.76 Å (3DIV), la estructura tridimensional de esta lacasa consiste en una cadena polipeptídica de 499 residuos aminoácidos que posee 3 dominios tipo cupredoxin y, según el análisis estructural del sitio activo es una lacasa de alto potencial redox [73]. Se logró ubicar en la estructura los canales de entrada que permiten el acceso del oxígeno al clúster trinuclear y los canales de salida de agua que transportan las moléculas de agua del centro de cobre tipo 2 a la superficie de la proteína. También caracterizaron los carbohidratos de la proteína, compuestos principalmente por N-acetilgalactosamina y manosa; sugiriendo que estos favorecen el ordenamiento de las moléculas en el cristal. En este trabajo usaron simulación de ajuste molecular para formar complejos de la lacasa con oxígeno y peróxido de hidrógeno y de esta manera estudiar la acción enzimática. El proceso constó de varios pasos, empezando por el movimiento del oxígeno desde la superficie de la proteína al cluster

trinuclear y, terminando con la salida del agua [73]. Cabe destacar que estos autores habían reportado previamente la estructura de la misma lacasa (2H5U) pero con una resolución menor (1.90 Å), donde lograron identificar sitios de unión de carbohidratos y encontraron cadenas de glucanos que contribuyen a la formación de cristales bien ordenados; también describieron la organización espacial de esta lacasa y la estructura del centro activo que contiene los átomos de cobre tipo 1, 2 y 3 [83,85]. De igual forma, en el año 2010 Ge *et al.*, realizaron el análisis estructural de la lacasa B de *Trametes sp.* AH28-2 (3KW7), con la cual estudiaron modificaciones postraduccionales de la enzima. Los pliegues de la estructura mostraron alta homología con las lacasas de estructura tridimensional previamente conocidas; sin embargo, esta lacasa presenta un nuevo elemento estructural: un bucle sobresaliente cerca del sitio de enlace para el sustrato que está relacionado con la modulación del reconocimiento del sustrato por parte de la lacasa B [87].

Por último, con respecto a lacasas de hongos Basidiomicetos, se encontraron reportadas en el PDB las estructuras 2HRH, 2HRG, 2XBY, 3PXL, 4A2D, 4A2E y 4A2H, aunque para dichas estructuras no está disponible la cita. Las estructuras 2HRH y 2HRG, representan una lacasa obtenida a partir del Basidiomicete *Trametes trogii*, con resoluciones de 2.60 y 1.58 Å respectivamente (ambas estructuras fueron reportadas al PDB por Gullotto *et al.*, 2006). La estructura 2XYB de una lacasa completamente funcional del hongo ligninolítico *Pycnoporus cinnabarinus* fue reportada por Piontek *et al.*, 2010. En el mismo año Polyakov *et al.*, reportaron una nueva estructura de la lacasa de *Trametes hirsuta* (3PXL) con una resolución de 1.20 Å, considerada la estructura de una lacasa fúngica con mayor resolución reportada hasta el momento [82]. En el 2011 De La Mora *et al.*, reportaron 3 estructuras diferentes de una misma lacasa (4A2D, 4A2E y 4A2H), obtenidas a partir del hongo *Coriolopsis gallica*; las diferencias entre estas radican en que se obtuvieron a partir de diferentes pHs (4.5, 5.5 y 7.0 respectivamente) en el proceso de cultivo del hongo.

En cuanto a las 10 estructuras cristalográficas de lacasas obtenidas a partir de hongos Ascomicetes, 9 de ellas corresponden a la lacasa-1 de *Melanocarpus albomyces*, y sólo una corresponde a una lacasa de *Thielavia arenaria* reportada en el 2011 por Kallio *et al.*, donde obtuvieron la estructura 3PPS a una resolución de 2.5 Å. En esta estructura se muestra el residuo aminoácido responsable de la transferencia catalítica de protones, que es Asn; a

diferencia de la Gln que aparece en la lacasa-1 de *Melanocarpus albomyces*. Adicionalmente, los bucles que se encuentran cerca del sitio para el cobre tipo 1 formando el bolsillo donde se enlaza el sustrato, también difiere en cierta medida; pero existe una característica en la cual estas dos lacasas se pueden comparar con otras estructuras: el canal que conduce al centro trinuclear, lo que sugiere un rol común [88].

De las 9 estructuras de lacasa-1 de *Melanocarpus albomyces*, una de ellas corresponde al primer reporte a partir de hongos Ascomicetes y fue realizado por Hakulinen *et al.*, en el 2002, quienes le cristalizaron y determinaron su estructura (1GW0), la cual presentó entre 20 y 30% de homología con las lacasas obtenidas de hongos Basidiomicetes hasta ese momento, así como un alto grado de glicosilación. Aunque en el sitio activo se encontraron 3 dominios de tipo cupredoxin similares a los de otras lacasas, se evidenciaron diferencias importantes en los bucles que los conforman [86]. Las 8 estructuras restantes se obtuvieron al analizar enzimas recombinantes expresadas en *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae*.

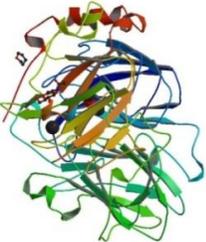
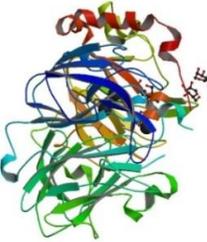
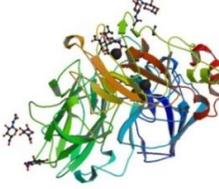
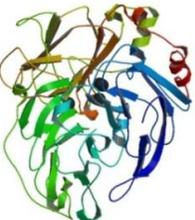
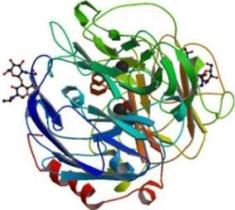
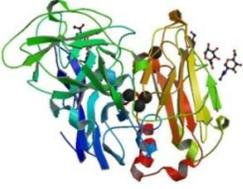
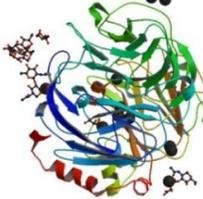
## 2.6. Lacasas recombinantes

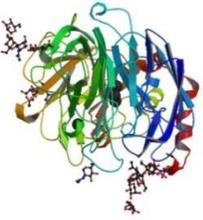
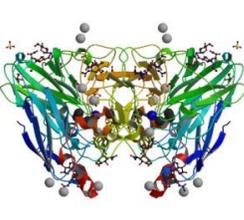
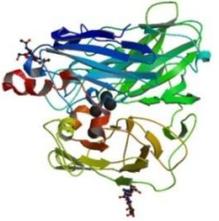
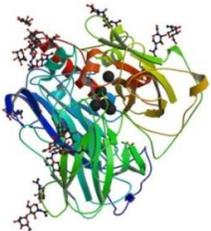
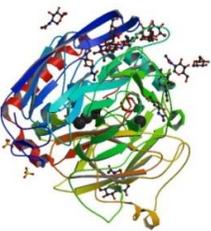
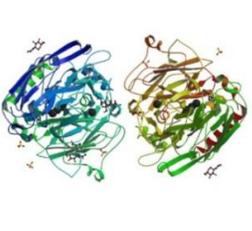
En el año 2006 Hakulinen *et al.*, estudiaron el efecto de la liberación de electrones al aplicar rayos-X sobre la estructura cristalográfica de la lacasa-1 recombinante (gen obtenido de *Trichoderma reesei*), se usaron dos estrategias para la obtención de datos, una dosis baja de rayos-X (90min) y una dosis alta de rayos X (8horas), lográndose las estructuras 2IH8 y 2IH9, respectivamente. Encontraron que se produce una reducción y cambio en las absorciones en el espectro visible y UV por parte de los átomos de cobre presentes en el sitio activo, lo que sugiere que la radiación induce cambios en los estados de oxidación y se deben tener en cuenta al analizar la estructura de las oxidasas multicobre [89]. Estos mismos autores reportaron en el 2008 la estructura de lacasa 2Q9O con una resolución de 1.3 Å; siendo esta, la estructura de origen Ascomicete con mayor resolución reportada hasta el momento [90]. En el año 2009 se publicaron varias estructuras de la lacasa-1 recombinante de *Melanocarpus albomyces*. Kallio *et al.*, realizaron un estudio sobre la relación estructura-función, obteniendo las estructuras 3FU7, 3FU8 y 3FU9, mediante diferentes tiempos de contacto con el sustrato 2,6-dimetoxifenol (4s, 10s y 20min). Se demostró que el 2,6-dimetoxifenol o sus productos de oxidación están enlazados en el sitio activo a los residuos Ala<sup>191</sup>, Pro<sup>192</sup>, Glu<sup>235</sup>, Leu<sup>363</sup>, Phe<sup>371</sup>, Trp<sup>373</sup>, Phe<sup>427</sup>, Leu<sup>429</sup>, Trp<sup>507</sup> y His<sup>508</sup>, que es uno de los ligandos del átomo de cobre tipo 1 y juega un papel

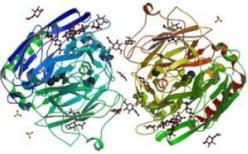
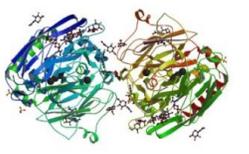
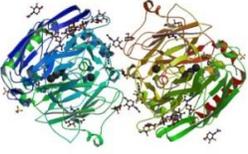
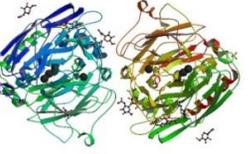
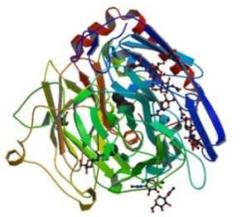
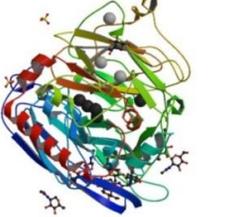
importante en la transferencia de electrones por parte de las lacasas. En este mismo trabajo a través de estudios de mutagénesis dirigida se logró concluir que el residuo Glu<sup>235</sup> es crucial en el proceso de oxidación de compuestos fenólicos [91]. En el 2011 algunos de los autores del trabajo de Kallio *et al.*, obtuvieron la estructura 3QPK. Usaron xenón para buscar rutas de entrada de oxígeno al centro catalítico y localizaron 3 sitios hidrofóbicos en el dominio C donde se enlaza el xenón. Sugiriendo, que el dominio C funciona como un canal por donde el oxígeno puede entrar al centro de trinuclear de cobre [92].

Finalmente, Andberg *et al.*, realizaron un estudio del extremo C-terminal de la lacasa-1 recombinante expresada en *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de analizar el papel que desempeña en la actividad enzimática. La importancia del extremo C-terminal, radica en que éste es procesado durante la secreción, presenta un alto grado de conservación entre las lacasas fúngicas y, los cuatro residuos aminoácidos de este extremo penetran en el túnel que lleva al sitio trinuclear de cobre, formando un puente de hidrógeno entre el carboxilo terminal y el residuo His<sup>140</sup>; permitiendo así, la coordinación del átomo de cobre tipo 3 [86,88]. La lacasa expresada en *T. reesei* fue completamente inactiva, debido a la delección de los últimos 4 residuos del extremo C-terminal. La estructura 3DKH con la mutación Leu559 Ala obtenida usando *S. cerevisiae*, logró demostrar la importancia del extremo C-terminal para la actividad, estabilidad y cinética de la lacasa, ya que el cambio provocó modificaciones en la geometría del sitio catalítico [93]. Vale la pena aclarar que todas las estructuras de lacasa-1 de *Melanocarpus albomyces* descritas anteriormente tienen la misma secuencia de 559 residuos aminoácidos, salvo la estructura 3DKH que posee la mutación Leu 559 Ala.

**Tabla 2.1.** Estructuras de lacasas de hongos Basidiomicetes y Ascomicetes reportadas en el Protein Data Bank obtenidas usando Cristalografía y Difracción de Rayos X (resolución in Å).

STRUCTURE	INFORMATION	STRUCTURE	INFORMATION
	<p><b>PDB:</b> 1A65, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Coprinopsis cinerea</i>  <b>Resolution:</b> 2.23 Å  <b>Length:</b> 504  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 55080.08  <b>PDB, Deposition:</b>            Ducros <i>et al.</i> 1998-03-05  <b>Citation:</b> [78]</p>		<p><b>PDB:</b> 1HFU, <b>Mol.:</b> Laccase 1  <b>Org.:</b> <i>Coprinopsis cinerea</i>  <b>Resolution:</b> 1.68 Å  <b>Length:</b> 503  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 55367.24  <b>PDB, Deposition:</b>            Ducros <i>et al.</i> 2000-12-08  <b>Citation:</b> [79]</p>
	<p><b>PDB:</b> 1KYA, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Trametes versicolor</i>  <b>Resolution:</b> 2.40 Å  <b>Length:</b> 499  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B, C, D  <b>MW:</b> 221719.74  <b>PDB, Deposition:</b>            Bertrand <i>et al.</i> 2002-02-04  <b>Citation:</b> [84]</p>		<p><b>PDB:</b> 1GYC, <b>Mol.:</b> Laccase 2  <b>Org.:</b> <i>Trametes versicolor</i>  <b>Resolution:</b> 1.90 Å  <b>Length:</b> 499  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 55989.82  <b>PDB, Deposition:</b>            Piontek <i>et al.</i> 2002-04-23  <b>Citation:</b> [26]</p>
	<p><b>PDB:</b> 1V10, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Rigidoporus lignosus</i>  <b>Resolution:</b> 1.70 Å  <b>Length:</b> 521  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 55858.68  <b>PDB, Deposition:</b>            Garavaglia <i>et al.</i> 2004-04-02  <b>Citation:</b> [80]</p>		<p><b>PDB:</b> 2H5U, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Cerrena máxima</i>  <b>Resolution:</b> 1.90 Å  <b>Length:</b> 499  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 55670.18  <b>PDB, Deposition:</b>            Lyashenko <i>et al.</i> 2006-05-27  <b>Citation:</b> [83,85]</p>
	<p><b>PDB:</b> 2HRH, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Trametes trogii</i>  <b>Resolution:</b> 2.60 Å  <b>Length:</b> 496  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 54247.49  <b>PDB, Deposition:</b>            Gullotto <i>et al.</i> 2006-07-20  <b>Citation:</b> <i>not available</i></p>		<p><b>PDB:</b> 2HRG, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Trametes trogii</i>  <b>Resolution:</b> 1.58 Å  <b>Length:</b> 496  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 55104.45  <b>PDB, Deposition:</b>            Gullotto <i>et al.</i> 2006-07-20  <b>Citation:</b> <i>not available</i></p>
	<p><b>PDB:</b> 2HZH, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Coriolus zonatus</i>  <b>Resolution:</b> 2.60 Å  <b>Length:</b> 499  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 54122.88  <b>PDB, Deposition:</b>            Lyashenko <i>et al.</i> 2006-08-09  <b>Citation:</b> [81]</p>		<p><b>PDB:</b> 2QT6, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Lentinus tigrinus</i>  <b>Resolution:</b> 1.50 Å  <b>Length:</b> 498  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B  <b>MW:</b> 112749.96  <b>PDB, Deposition:</b>            Ferraroni <i>et al.</i> 2007-08-01  <b>Citation:</b> [72]</p>

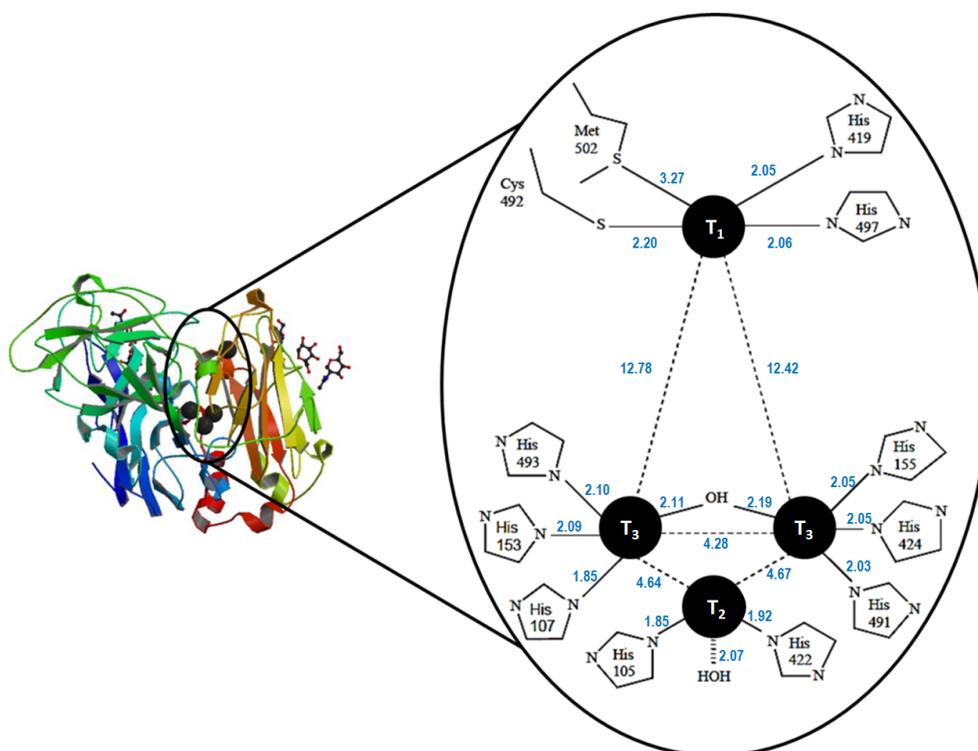
	<p><b>PDB:</b> 3FPX, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Trametes hirsuta</i>  <b>Resolution:</b> 1.80 Å  <b>Length:</b> 499  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 56465.33  <b>PDB, Deposition:</b>  Polyakov <i>et al.</i> 2009-01-06  <b>Citation:</b> [82]</p>		<p><b>PDB:</b> 3DIV, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Cerrena maxima</i>  <b>Resolution:</b> 1.76 Å  <b>Length:</b> 499  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 56220.02  <b>PDB, Deposition:</b>  Zhukova <i>et al.</i> 2008-06-21  <b>Citation:</b> [73]</p>
	<p><b>PDB:</b> 3KW7, <b>Mol.:</b> Laccase B  <b>Org.:</b> <i>Trametes sp.</i> AH28-2  <b>Resolution:</b> 3.44 Å  <b>Length:</b> 502 (24-525)  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B  <b>MW:</b> 110887.03  <b>PDB, Deposition:</b>  Ge <i>et al.</i> 2009-12-01  <b>Citation:</b> [87]</p>		<p><b>PDB:</b> 2XBY, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>  <b>Resolution:</b> 1.75 Å  <b>Length:</b> 497 (22-518)  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 57999.61  <b>PDB, Deposition:</b>  Piontek <i>et al.</i> 2010-11-17  <b>Citation:</b> <i>not available</i></p>
	<p><b>PDB:</b> 3PXL, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Trametes hirsuta</i>  <b>Resolution:</b> 1.20 Å  <b>Length:</b> 499  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 56354.35  <b>PDB, Deposition:</b>  Polyakov <i>et al.</i> 2010-12-10  <b>Citation:</b> <i>not available</i></p>		<p><b>PDB:</b> 4A2D, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Corioloopsis gallica</i>  <b>Resolution:</b> 2.30 Å  <b>Length:</b> 496 (22-517)  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 54383.02  <b>PDB, Deposition:</b>  De La Mora <i>et al.</i> 2011-09-26  <b>Citation:</b> <i>not available</i></p>
	<p><b>PDB:</b> 4A2E, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Corioloopsis gallica</i>  <b>Resolution:</b> 1.80 Å  <b>Length:</b> 496 (22-517)  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 53906.09  <b>PDB, Deposition:</b>  De La Mora <i>et al.</i> 2011-09-26  <b>Citation:</b> <i>not available</i></p>		<p><b>PDB:</b> 4A2H, <b>Mol.:</b> Laccase  <b>Org.:</b> <i>Corioloopsis gallica</i>  <b>Resolution:</b> 2.30 Å  <b>Length:</b> 496 (22-517)  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A  <b>MW:</b> 54464.58  <b>PDB, Deposition:</b>  De La Mora <i>et al.</i> 2011-09-27  <b>Citation:</b> <i>not available</i></p>
	<p><b>PDB:</b> 1GW0, <b>Mol.:</b> Laccase-1  <b>Org.:</b> <i>Melanocarpus albomyces</i>  <b>Resolution:</b> 2.40 Å  <b>Length:</b> 559  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B  <b>MW:</b> 132161.81  <b>PDB, Deposition:</b>  Hakulinen <i>et al.</i> 2002-03-01  <b>Citation:</b> [94]</p>		<p><b>PDB:</b> 2IH8, <b>Mol.:</b> Laccase-1  <b>Org.:</b> <i>Melanocarpus albomyces</i>  <b>Resolution:</b> 2.00 Å  <b>Length:</b> 559  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B  <b>MW:</b> 130864.68  <b>PDB, Deposition:</b>  Hakulinen <i>et al.</i> 2006-09-26  <b>Citation:</b> [89]</p>
	<p><b>PDB:</b> 2IH9, <b>Mol.:</b> Laccase-1  <b>Org.:</b> <i>Melanocarpus albomyces</i>  <b>Resolution:</b> 2.00 Å  <b>Length:</b> 559  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B  <b>MW:</b> 129934.94  <b>PDB, Deposition:</b>  Hakulinen <i>et al.</i> 2006-09-26  <b>Citation:</b> [89]</p>		<p><b>PDB:</b> 2Q9O, <b>Mol.:</b> Laccase-1  <b>Org.:</b> <i>Melanocarpus albomyces</i>  <b>Resolution:</b> 1.30 Å  <b>Length:</b> 559  <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B  <b>MW:</b> 131889.56  <b>PDB, Deposition:</b>  Hakulinen <i>et al.</i> 2007-06-13  <b>Citation:</b> [90]</p>

	<b>PDB:</b> 3DKH, <b>Mol.:</b> Laccase-1 <b>Org.:</b> <i>Melanocarpus albomyces</i> <b>Resolution:</b> 2.40 Å <b>Length:</b> 559 <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B <b>MW:</b> 130716.04 <b>PDB, Deposition:</b> Andberg <i>et al.</i> 2008-06-25 <b>Citation:</b> [93]		<b>PDB:</b> 3FU7, <b>Mol.:</b> Laccase-1 <b>Org.:</b> <i>Melanocarpus albomyces</i> <b>Resolution:</b> 1.67 Å <b>Length:</b> 559 <b>Polymer:</b> 1, 2, <b>Chains:</b> A, B <b>MW:</b> 131164.01 <b>PDB, Deposition:</b> Kallio <i>et al.</i> 2009-01-14 <b>Citation:</b> [91]
	<b>PDB:</b> 3FU8, <b>Mol.:</b> Laccase-1 <b>Org.:</b> <i>Melanocarpus albomyces</i> <b>Resolution:</b> 1.80 Å <b>Length:</b> 559 <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B <b>MW:</b> 130976.90 <b>PDB, Deposition:</b> Kallio <i>et al.</i> 2009-01-14 <b>Citation:</b> [91]		<b>PDB:</b> 3FU9, <b>Mol.:</b> Laccase-1 <b>Org.:</b> <i>Melanocarpus albomyces</i> <b>Resolution:</b> 2.00 Å <b>Length:</b> 559 <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B <b>MW:</b> 128050.20 <b>PDB, Deposition:</b> Kallio <i>et al.</i> 2009-01-14 <b>Citation:</b> [91]
	<b>PDB:</b> 3PPS, <b>Mol.:</b> Laccase <b>Org.:</b> <i>Thielavia arenaria</i> <b>Resolution:</b> 2.50 Å <b>Length:</b> 604 <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B, C, D <b>MW:</b> 276674.96 <b>PDB, Deposition:</b> Kallio <i>et al.</i> 2010-11-25 <b>Citation:</b> [88]		<b>PDB:</b> 3QPK, <b>Mol.:</b> Laccase-1 <b>Org.:</b> <i>Melanocarpus albomyces</i> <b>Resolution:</b> 1.90 Å <b>Length:</b> 559 (UNP res. 51-609) <b>Polymer:</b> 1, <b>Chains:</b> A, B <b>MW:</b> 129328.47 <b>PDB, Deposition:</b> Kallio <i>et al.</i> 2011-02-14 <b>Citation:</b> [92]

El conocimiento de las estructuras a partir de datos cristalográficos, es indispensable para comprender las propiedades generales, y en especial del sitio catalítico de una proteína. Sin embargo, es claro que el número de estructuras de lacasas obtenidas hasta el momento sólo representa una cantidad pequeña, comparada con la gran variedad de isoformas de lacasas reportadas. La escasez de datos puede explicarse por las dificultades (relacionadas principalmente con la separación de isoformas) en el proceso de cristalización de las lacasas [26,83,85]; dificultades que resultan en datos de conformación estructural que podrían no ser acordes con la realidad. Aun así, es importante destacar los esfuerzos realizados para comprender la estructura de las lacasas, donde se evidencia un alto grado de conservación en los dominios relacionados con el cobre (a pesar de que el resto de la molécula sea variable entre distintas lacasas), resultando en lo que algunos autores han denominado sequence signature [20], y que caracteriza de forma única a las lacasas.

## 2.7. Mecanismo de acción

Las lacasas contienen 4 átomos de cobre denominados Cu T1 (donde se une el sustrato reductor) y un centro trinuclear de cobre T2/T3 (donde se une el oxígeno para ser reducido a agua). Como se explicó anteriormente los cuatro átomos de cobre se pueden clasificar en tres categorías: Tipo 1 (T1) tipo 2 (T2) y tipo 3 (T3); los cuales se pueden distinguir usando luz UV/visible y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) [3,16]. Los estudios realizados de espectroscopía y el método del funcional de la densidad (DTF) para esclarecer la naturaleza de la coordinación de los centros de cobre en las lacasas, revelaron que el cobre T2 se encuentra acoplado a dos átomos His-N y un átomo de oxígeno como OH, mientras que cada cobre T3 se coordina con tres residuos de His, (Figura 2.4).

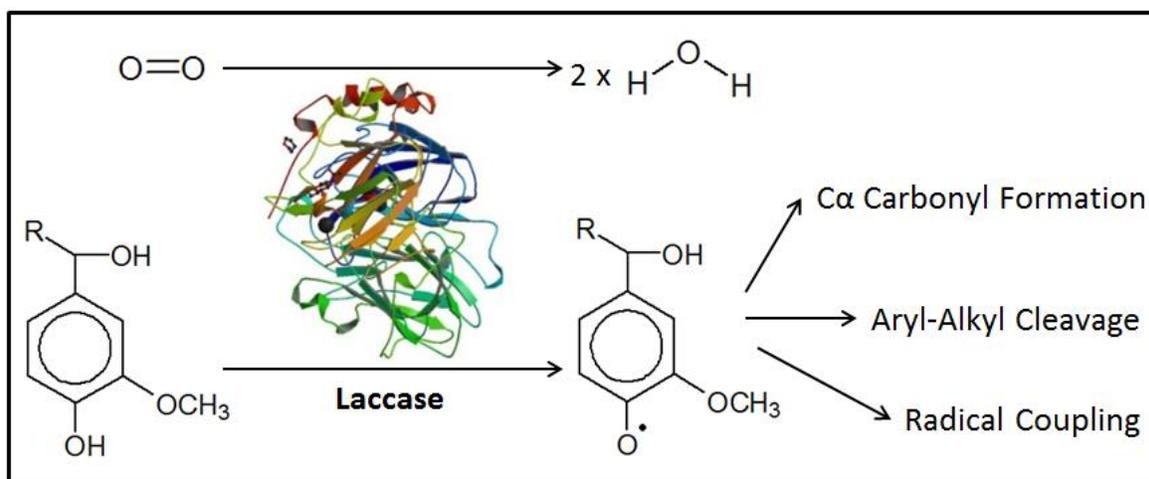


**Figura 2.4.** Ilustración del sitio activo de una lacasa mostrando la orientación relativa de los átomos de cobre y las distancias con los ligandos en azul (distancias en Å). La estructura tridimensional usada es la lacasa de *Coriolus zonatus* (2HZH) obtenida del protein data bank. Modificado de [95,96].

Existen tres pasos principales en el mecanismo de acción de las lacasas. Inicialmente, el Cu Tipo 1 se reduce por acción de un sustrato reductor, que posteriormente es oxidado. A continuación, el electrón se transfiere de manera interna desde el Cu T1 al centro trinuclear formado por los átomos de los cobres T2 y T3. La molécula de oxígeno se une al centro trinuclear para una activación asimétrica y se propone que el bolsillo de unión para el O<sub>2</sub>

parece restringir el acceso de otros agentes oxidantes distintos al  $O_2$ . No se detecta  $H_2O_2$  por fuera de la enzima durante el estado estacionario del proceso, lo cual indica que está ocurriendo la reducción de los 4 electrones del  $O_2$  a  $H_2O$  [9,11,12,97]. Debido a que la oxidación de un electrón en el sustrato va acoplada a la reducción de 4 electrones del oxígeno, no se puede asumir que el mecanismo de reacción se da de manera sencilla. Por lo tanto, se asume que la lacasa actúa como una batería, almacenando electrones de las reacciones de oxidación individuales con el fin de reducir el oxígeno molecular. Así, se requiere de la oxidación de cuatro moléculas de sustrato para producir la reducción completa del oxígeno molecular a agua [9,22].

En términos generales, la oxidación del sustrato por la lacasa es una reacción de un electrón que genera un radical libre. El producto inicial es típicamente inestable y puede sufrir una segunda oxidación por catálisis enzimática o por una reacción no enzimática como una hidratación, polimerización o dismutación [52]. Los enlaces del sustrato natural, lignina, que pueden ser separados, incluyen oxidación de los enlaces  $C\alpha$ -, corte de los enlaces  $C\alpha-C\beta$  y, corte de enlaces aril-alquil [52,98], (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Oxidación de las subunidades fenólicas de lignina por la lacasa. La oxidación del sustrato es una reacción en la cual se genera un radical libre que es inestable y puede experimentar formación de carbonilo  $C\alpha$ , rompimiento Aril-Alquil o acoplamiento de radicales. Modificado de [52]. La estructura de lacasa usada proviene de *Coprinopsis cinerea* (1A65).

## 2.8. Lacasas y mediadores químicos: mimetizando la naturaleza

La lignina es un polímero complejo amorfo, de naturaleza aromática, que funciona como material de estructura en las paredes celulares de las células vegetales al unirse con la celulosa y la hemicelulosa, comprende aproximadamente entre el 20-32% del peso seco de la madera [99]. La lignina está constituida por unidades de *p*-hidroxyphenyl, guaiacyl, y syringyl-type phenylpropane, en las cuales las unidades aromáticas se encuentran libres o con grupos hidroxilo esterificados en las posiciones 1 y 3 respectivamente [13].

Mientras que en los tejidos leñosos de las plantas las lacasas forman parte del sistema que sintetiza la lignina, la función de las lacasas en los hongos de podredumbre blanca es despolimerizar y mineralizar la lignina. La lacasa es una molécula grande (55-85 kDa) [29] que no puede penetrar de forma profunda en la madera y, debido a que posee un bajo potencial redox ( $\leq 0.8$  V) en comparación con las peroxidasa linginolíticas ( $> 1$  V), la lacasa sólo puede oxidar los fragmentos fenólicos de la lignina. Sin embargo, el número y tipo de sustratos que pueden ser oxidados por la lacasa se puede ampliar mediante un mecanismo que implica la participación de mediadores redox. Estos mediadores, son compuestos de bajo peso molecular que pueden ser oxidados fácilmente por la lacasa, produciendo así radicales catiónicos muy inestables y reactivos, que a la vez pueden oxidar compuestos complejos (incluyendo sustratos no fenólicos) antes de retornar a su estado original [100]. En este mecanismo los mediadores actúan como transportadores difusibles de electrones, permitiendo la oxidación indirecta de sustratos poliméricos como la lignina, penetrando incluso a las zonas de su estructura menos accesibles. Adicionalmente, gracias al uso de mediadores, la lacasa es capaz de oxidar compuestos con un mayor potencial redox que la propia enzima, un ejemplo de ello es la oxidación mediada de los hidrocarburos aromáticos policíclicos o PAHs [101].

Desde que Bourbonnais demostró que la inclusión de mediadores expandía la actividad catalítica de las lacasas hacia sustratos no fenólicos, [102] se han descrito más de 100 mediadores distintos, aunque los más usados comúnmente son el ABTS (2,2'-azino bis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)) y el HBT (1-hidroxibenzotriazol) [8]. El sistema lacasa-mediador puede aplicarse en la industria del blanqueo de la pasta de papel, [103,104] así como en la biorremediación de xenobióticos como los PAHs [103-109]. Además, se ha demostrado que la combinación de dos o más mediadores (por ejemplo, ABTS y HBT) puede generar un efecto

sinérgico en la actividad oxidativa [110]. Sin embargo, el elevado costo económico de los mediadores de origen químico, su elevada toxicidad y la carencia de estudios suficientes sobre los efectos de sus derivados, además de la inactivación que sus radicales catiónicos ejercen sobre la lacasa, hace que la aplicación del sistema lacasa mediador sea aún limitada [111]. Por esta razón, el uso de mediadores naturales podría presentar ventajas medioambientales y económicas. Muchos compuestos implicados en la degradación natural de la lignina y que se derivan de unidades de lignina oxidadas o que son secretados por los hongos de podredumbre blanca, pueden actuar como mediadores de manera eficaz [112]. Así, los mediadores naturales ácido 4-hidroxibenzoico, alcohol 4-hidroxibencílico, alcohol veratrílico, siringaldehído, acetosiringona, vainillina, y ácido *p*-cumárico, entre otros, se han probado con diferentes lacasas obteniendo resultados similares a los conseguidos con mediadores artificiales [112-114]. Un claro ejemplo es el descrito recientemente para la degradación de los PAHs benzo[*a*]pireno, pireno y antraceno por el sistema lacasa mediador constituido por la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* y el ácido *p*-cumárico [112].

## 2.9. Lacasas atípicas

Usualmente, las lacasas contienen 3 dominios en su estructura (Figura 2.2) y una masa molecular aproximada de 50-70 kDa o más. Sólo algunas de las enzimas oxidasas multicobre, contienen 2 dominios en su estructura y una masa molecular aproximada de 30-40 kDa [115]. Sin embargo, no es común encontrar lacasas con pesos moleculares por debajo de los 50 kDa y sólo se han realizado unos pocos reportes que describen pesos moleculares bajos de lacasas de *Botrytis cinerea* [116] y de los cuerpos fructíferos de *Tricoloma giganteum* [117]. Debido a su masa molecular pequeña, las lacasas con dos dominios podrían requerir ensamblarse hasta adquirir una estructura cuaternaria, aunque los datos obtenidos por algunos autores, sugieren que estas enzimas pueden actuar también como monómeros [5].

Dentro de las llamadas lacasas atípicas, se encuentran también las lacasas con estructura cuaternaria, y se clasifican de esta manera ya que normalmente, la mayoría de ellas actúa como monómeros. Se han aislado algunas lacasas que exhiben una estructura homodimérica, como es el caso de las obtenidas a partir de los Basidiomicetes *Trametes villosa* [33] y *Phellinus ribis* [118], los Ascomicetes fitopatógenos *Rhizoctonia solani* [35] y *Gaeumannomyces graminis* [119], y para el Ascomicete acuático *Phoma* sp. UHH 5-1-03 [120]. Se conoce que algunas de estas

enzimas presentan una dimerización dependiente de pH, como se encontró en *Phoma* sp. UHH 5-1-03, donde predomina el estado dimérico a un rango de pH entre 5.0-8.0 [120]. El arreglo dimérico es necesario para asegurar la función adecuada de algunas enzimas [5], como parece suceder con las lacasas homodiméricas que presentan subunidades con 2 dominios, aisladas a partir de *Pleurotus pulmonarius* [121], *Pleurotus eryngii* [122], y el hongo micorrízico *Cantharellus cibarius* [123].

Finalmente, como se mencionó anteriormente, las lacasas contienen cuatro átomos de cobre y presentan un pico de absorción cercano a los 600nm de longitud de onda. Sin embargo, algunas lacasas poseen propiedades espectrales inusuales, ya que no presentan el espectro de absorción característico del Cu T1. Estas lacasas, se denominan lacasas “amarillas” o “blancas” y, aunque algunos autores no las reconocen como lacasas verdaderas, otros argumentan que si se considera que las lacasas son enzimas capaces de oxidar polifenoles, fenoles metoxi-sustituídos, diaminas aromáticas, y un rango amplio de otros compuestos pero no tirosina; entonces las lacasas “amarillas” y “blancas” deben ser consideradas como lacasas verdaderas [5].

## **2.10. Producción heteróloga de lacasas**

La obtención de lacasa a partir de fuentes nativas no alcanza a suplir las necesidades de los procesos a nivel industrial, debido principalmente a la baja producción de enzima y a los altos costos en los procedimientos de cultivo y purificación. Por esta razón, la expresión heteróloga de lacasas se ha convertido en una alternativa prometedora donde se pueden utilizar hospederos fáciles de manipular genéticamente y cultivar con el fin de aumentar la productividad en un menor tiempo y reducir así los costos de producción [55].

Las lacasas, como otras enzimas oxidativas, son difíciles de expresar de forma heteróloga en sistemas que no son de naturaleza fúngica [11], esto podría explicar que hasta el momento sólo se encuentre un único reporte de una lacasa fúngica expresada en un sistema bacteriano, donde la lacasa del hongo ligninolítico *Cyathus bulleri* (Basidiomycota) se expresó de forma exitosa en *Escherichia coli* [124]. El poco interés con respecto a la expresión de lacasas fúngicas en sistemas bacterianos podría explicarse debido a los requerimientos de glicosilación en lacasas extracelulares [29] y a factores intrínsecos de los sistemas bacterianos como la ausencia de

chaperonas que faciliten el plegamiento de la proteína expresada y a la diferencia en el uso de codones [11], entre otros; aspectos que en sumatoria representan un inconveniente en el proceso de producción. Por consiguiente, la mayoría de las lacasas expresadas de forma heteróloga se reportan en sistemas eucariotas como levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia methalonica*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis*) y hongos filamentosos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae* y *Trichoderma reesei*), (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Lista de algunas lacasas fúngicas expresadas de forma heteróloga en levaduras y hongos filamentosos.

<i>Lacasa</i>	<i>Origen</i>	<i>Hospedero</i>	<i>Comentarios</i>	<i>Referencias</i>
LCC1	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Active laccase secreted in the medium. Production yield was further optimized.	[125-127]
LCC1		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Undetectable laccase activity in the medium.	[128]
LCC2			Active laccase secreted in the medium. Production of ethanol from raw materials (0.12 UL <sup>-1</sup> ).	[128,129]
LCCI		<i>Pichia pastoris</i>	Active laccase secreted in the medium. The enzyme and a truncated version (LCC1a) were purified and partially characterized.	[130]
LCCIV			Laccase secreted activity of 0.15 Uml <sup>-1</sup> (ABTS). The enzyme was purified and partially characterized.	[131]
LCC1		<i>Pichia methalonica</i>	9.79 U ml <sup>-1</sup> of laccase activity in recombinant with the $\alpha$ -factor signal peptide.	[132]
LACIIIb		<i>Yarrowia lipolytica</i>	2.5 mg l <sup>-1</sup> (0.23 Uml <sup>-1</sup> ) of active enzyme with limited excess of glycosylation.	[133]
LCC $\alpha$		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.035 UL <sup>-1</sup> of laccase activity produced by <i>S. cerevisiae</i> .	[134]
LCC1, LCC2		<i>Pichia pastoris</i> <i>Aspergillus niger</i>	2.8 UL <sup>-1</sup> of laccase activity produced by <i>P. pastoris</i> and up to 2700 U l <sup>-1</sup> by <i>A. niger</i> .	[135]
Gene IV		<i>Aspergillus niger</i>	592 UL <sup>-1</sup> of enzyme activity in solid-state fermentation produced by <i>A. niger</i> .	[136]
PrL	<i>Phlebia radiata</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	20 mg l <sup>-1</sup> of secreted active laccase in small-scale fermentations.	[137]
LCC1, LCC4	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Active laccase secreted in the medium. The enzyme was purified and partially characterized.	[35]
LCC2			Active laccase secreted	

			into the culture medium.	
LCC1	<i>Trametes villosa</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Active laccase secreted in the medium. The enzyme was purified and partially characterized.	[33]
LAC	<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Aspergillus sojae</i>	Laccase secreted activity of 774 Uml <sup>-1</sup> (Gallic acid).	[138]
LCC1	<i>Coprinus cinereus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Transformants secreted from 8.0 to 135 mg of active laccase per liter.	[139]
LAC1	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Transformants secreted 8.0 mgL <sup>-1</sup> of hyperglycosylated active laccase.	[140]
LAC1		<i>Aspergillus niger</i>	70 mgL <sup>-1</sup> of active laccase using the <i>A. niger</i> signal peptide which represent a 77-fold increased activity (7000 Uml <sup>-1</sup> ) (ABTS).	[141]
LAC 1		<i>Aspergillus oryzae</i>	80 mgL <sup>-1</sup> of active laccase.	[142]
LAC 1		<i>Yarrowia lipolytica</i>	20 mgL <sup>-1</sup> of active enzyme in bioreactor.	[143]
LAC4	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Transformants produced 4.85 mgL <sup>-1</sup> of active laccase.	[39]
LAC 1	<i>Melanocarpus albomyces</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	920 mgL <sup>-1</sup> of active laccase.	[144]
LAC 1		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	168 UL <sup>-1</sup> of laccase activity produced.	
LAC3	<i>Trametes sp. strain C30</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2 mgL <sup>-1</sup> of rLAC3 produced in bioreactor.	[145]
POXA1b, POXC	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>K. lactis</i> was more effective host than <i>S. cerevisiae</i> .	[146]
POXA3		<i>Kluyveromyces lactis</i>	80 UL <sup>-1</sup> , after 10 days of incubation.	[147]
LCC1	<i>Pycnoporus coccineus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Saccabromyces cerevisiae</i>	High copper concentrations are required for the production of active laccase.	[148]
LCC	<i>Tametes trogii</i>	<i>Pichia pastoris</i>	17 mgL <sup>-1</sup> of active enzyme, reaching up to 2520 UL <sup>-1</sup> in fedbatch culture.	[149]
LCC1		<i>Kluyveromyces lactis</i>	6.6 UL <sup>-1</sup> of bioactive	[150]

LACB	<i>Trametes sp.</i>	<i>Pichia pastoris</i>	molecule produced by <i>K. lactis</i> . Overexpression (1.01 U/mg) of active laccase (32000 Uml <sup>-1</sup> ).	[151]
LACD	<i>Trametes sp 420</i>	<i>Pichia pastoris</i>	8.3 × 10 <sup>4</sup> UL <sup>-1</sup> of active laccase.	[152]
Ery3	<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Partially characterization of recombinant laccase.	[40]
Pel3		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	139 mUml <sup>-1</sup> of laccase in alginate immobilized cells.	[153]
LCC	<i>Fome lignosus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	3.7-fold expression improvement (up to 144 mgL <sup>-1</sup> )	[154]

Aunque los resultados obtenidos hasta el momento en la producción heteróloga de lacasas son prometedores, el camino para obtener altos niveles de expresión, en combinación con una actividad biológica óptima se encuentra lleno de obstáculos. Un ejemplo de esta situación es la contradicción existente con respecto a los hospederos adecuados para la producción heteróloga de lacasas fúngicas, donde los Ascomicetos se consideran más amigables a la hora de manipularlos genéticamente y llevar a cabo procesos industriales de escalado, pero el tan deseado alto potencial redox de las lacasas se obtiene principalmente a partir de la expresión en Basidiomicetes; menos amigables al momento de ser modificados genéticamente [29,55,124].

Dicha capacidad de producir lacasas de forma eficiente en sistemas heterólogos depende en gran medida de la naturaleza de los cambios realizados a la secuencia original de DNA. Por ejemplo, se ha obtenido un incremento en la secreción de lacasas heterólogas reemplazando el DNA que codifica para el péptido señal nativo, por secuencias señal presentes en proteínas con alto grado de secreción en el organismo hospedero [124]; otra estrategia usada para mejorar la secreción de lacasas recombinantes, incluye la evolución molecular “*in vitro*”, donde mediante mutagénesis aleatoria inducida y/o recombinaciones en el material genético que codifica para una o varias proteínas, se genera una diversidad genética que posteriormente se expresa y explora bajo las condiciones en las que se quiere mejorar la enzima (altas temperaturas o medios no convencionales, pH extremo, etc.), [112,113].

Un factor adicional que puede influir en la expresión de secuencias que codifican para proteínas recombinantes, a menudo se encuentra relacionado con el uso inapropiado de codones donde, en función de la ubicación y abundancia de los codones inusuales, se pueden producir pausas en el proceso de traducción. De hecho, Bulter y colaboradores encontraron que las mutaciones sinónimas a codones que se usan con mayor frecuencia en el hospedero pueden incrementar la producción de lacasa de *Myceliophthora thermophila* expresada en *S. cerevisiae*. En sus experimentos se realizaron 10 rondas repetidas de mutagénesis dirigida, que finalmente llevaron a un incremento de 170 veces en la producción de la enzima y una mayor termoestabilidad con respecto a la enzima nativa [155].

A pesar de los resultados satisfactorios que se han obtenido en la expresión heteróloga de lacasas en levaduras, algunos autores reportan en particular a *S. cerevisiae* y *P. pastoris* como sistemas de expresión con tendencia a hiperglicosilar dichas proteínas [29,55]. Aún así, no se había prestado suficiente atención a los aspectos relacionados con la glicosilación de lacasas, hasta la revisión realizada recientemente por Rodgers *et al.*, donde se destaca la influencia que ejercen los carbohidratos presentes en la estructura proteica en los procesos de secreción, plegamiento y funcionalidad de la proteína heteróloga, sugiriendo que dichos carbohidratos juegan un papel importante en la estabilización de los centros de cobre del sitio activo, protección frente a proteólisis e incremento en la termoestabilidad; influyendo finalmente en la actividad catalítica de las lacasas [29]. Sin embargo, otros autores reportan de manera contrastante que la hiperglicosilación parece afectar el proceso de producción de la enzima más no sus propiedades catalíticas [124].

Los resultados controversiales con respecto a la producción heteróloga de lacasas que se han encontrado hasta el momento, hacen que aún permanezca oculto “el mejor hospedero” o la lacasa “más promisorio”. Actualmente, debido a los grandes avances en las técnicas de biología molecular y DNA recombinante, se pueden explorar nuevas estrategias en el camino hacia la producción a nivel industrial de lacasa, iniciando la experimentación con genes sintéticos que codifiquen para lacasas donde, el uso de codones optimizados y modificaciones específicas en la secuencia de nucleótidos permitan mejorar la expresión de la enzima, o incluso obtener nuevas características que representen una ventaja en ciertos procesos industriales. Por esta razón, nos hemos propuesto llevar a cabo la expresión heteróloga de un gen sintético de lacasa

obtenido a partir cepas autóctonas de *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum*, para finalmente usar la lacasa obtenida como alternativa para el tratamiento de pulpa de celulosa; se espera que a largo plazo su uso pueda extenderse a otro tipo de sectores como la industria textil, donde estas enzimas pueden tener un uso potencial en la remoción de colorantes y contaminantes de los efluentes.

### **2.11. Aplicaciones biotecnológicas**

Las lacasas procedentes de hongos Basidiomicetos de podredumbre blanca poseen un gran potencial biotecnológico debido a las características que se han mencionado con anterioridad en esta revisión [98,112]. Las lacasas de alto potencial redox pueden ser empleadas en casi la totalidad de la cadena de producción de productos papeleros: elaboración de pasta de papel, blanqueo libre de cloro de las pastas, o en el tratamiento de efluentes. En la industria de productos forestales, otras dos áreas emergentes de investigación son: i) el diseño de materiales lignocelulósicos con nuevas propiedades de resistencia y estabilidad mediante el injerto de compuestos fenólicos catalizado por lacasa, en la denominada “funcionalización de las fibras de celulosa”; y ii) el uso de lacasas para la mejora del grado de compactación de tableros de madera (mediante acoplamiento enzimático “*in situ*” de la lignina), sin necesidad de utilizar adhesivos tóxicos a base de formaldehído.

Adicionalmente, las lacasas juegan un rol importante en otros campos como son: la industria alimentaria en el procesamiento de bebidas o de productos de panadería; la industria textil en la degradación (detoxificación) de los colorantes de los efluentes o blanqueo de tejidos; nanobiotecnología como detectores de fenoles, oxígeno, azidas, morfina, codeína, catecolaminas o flavonoides en la elaboración de biosensores para análisis clínicos y medioambientales, y en la elaboración de biopilas de combustible que ofrecen energía eléctrica limpia (sin utilizar combustibles fósiles) mediante la inmovilización de lacasas en el cátodo; biorremediación en la degradación de PAHs y compuestos AOX; síntesis química en la producción de polímeros complejos (policatecol para resinas de cromatografía), síntesis de agentes farmacológicos (antitumorales, nuevos derivados antibióticos, y cosméticos (tintes de cabello formulados con lacasa) [11,12,16].

La diversidad catalítica de las lacasas, hace que estas enzimas generen cada vez mayor interés en aplicaciones biotecnológicas. Una de las aplicaciones técnicas más conocidas de las lacasas es la deslignificación y el tratamiento de las aguas residuales en la industria papelera. Desde que Bourbonnais demostró que la lacasa de *Trametes versicolor* era capaz de deslignificar la pasta de papel en presencia de mediadores, sin necesidad de las técnicas tradicionales basadas en el uso de reactivos tóxicos clorados, son muchos los estudios desarrollados para optimizar el proceso completo [88,92,115].

La biorremediación enzimática mediante lacasas es otra de las áreas de gran interés. El sistema lacasa-mediador es capaz de oxidar compuestos tóxicos presentes en zonas contaminadas y efluentes industriales como los PAHs, clorofenoles, dimetoxifenoles, nitrofenoles, y plaguicidas entre otros [87,96,115]. Por ejemplo, se sabe que la carga contaminante de aguas residuales resultantes del proceso de blanqueo durante la producción de papel, se caracteriza por tener altos niveles de demanda química de oxígeno (COD), color y más de 500 compuestos orgánicos haluros absorbibles (AOX) [156]. Las lacasas son de gran utilidad en la degradación de residuos lignocelulósicos en general [157].

Una metodología novedosa utilizada por nuestro grupo de investigación para reducir la carga contaminante y donde se hizo uso del potencial redox de las lacasas provenientes de los Basidiomicetes, es la planteada por Pedroza *et al.*; donde se realiza el uso secuencial del hongo *Trametes versicolor*, seguido del tratamiento por fotocatalisis con UV/TiO<sub>2</sub>/Ru<sub>x</sub>Se<sub>y</sub> [158] o UV/TiO<sub>2</sub> [159]. Con la combinación *Trametes versicolor*-UV/TiO<sub>2</sub>/Ru<sub>x</sub>Se<sub>y</sub>, se logró reducir las poblaciones bacterianas y fúngicas en 5 unidades logarítmicas con respecto al control sin tratamiento, además el tratamiento global, resultó en el 92% de remoción de color (de 5800 UC), reducción de COD (de 59 gL<sup>-1</sup>) y una remoción de clorofenol del 99% a las 96 horas de tratamiento [158]. Por otra parte con el uso secuencial de *Trametes versicolor*-UV/TiO<sub>2</sub>, se logró una remoción de color del 99% [159].

Por otra parte la degradación de PAHs se considera de especial interés, ya que los hidrocarburos aromáticos policíclicos constituyen un grupo de xenobióticos muy peligrosos (mutagénicos, carcinogénicos y/o teratogénicos) que se encuentran distribuidos ampliamente en ambientes terrestres y acuáticos. Las principales fuentes de emisión proceden de vertidos

marinos, los motores de los vehículos, procesos industriales o incendios forestales. Las últimas tendencias en eliminación de PAHs apuntan a la combinación de métodos químicos y biológicos como tratamiento de choque para la oxidación [101,160]. En este sentido, se está realizando un esfuerzo importante para el diseño de lacasas eficaces en la oxidación de PAHs bajo las exigentes condiciones del proceso (presencia de disolventes orgánicos, condiciones ambientales extremas, etc.), [23,111,112].

En el campo de la industria textil, las aplicaciones van desde el blanqueo de la fibra de algodón y colorantes textiles hasta la producción de precursores de colorantes de mayor calidad así como en la eliminación de estos en aguas residuales [161]. De hecho, la lacasa de *M. thermophila* se usa desde hace poco para la oxidación del colorante índigo en ropa de mezclilla [101].

En la industria alimentaria las lacasas se utilizan para mejorar la estabilidad y propiedades organolépticas de zumos de frutas, vino y cerveza. La oxidación enzimática de compuestos fenólicos en las bebidas elimina la turbidez y produce mejoras en el color, aroma y sabor. Además, el uso de lacasas en panadería influye en la calidad de la masa de pan [162]. Las lacasas se incorporan a productos cosméticos y de higiene personal. La tinción y ondulamiento del cabello implica el uso de productos químicos agresivos que pueden ser reemplazados por tratamientos con lacasas. También se utilizan en desinfección, cuidado de la piel y en desodorantes, ya que las lacasas son capaces de oxidar tioles y compuestos amónicos que producen mal olor [163].

La actividad enzimática de la lacasa acoplada a transductores físicos puede ser útil en el diseño de biosensores para detectar O<sub>2</sub> y una gran variedad de sustratos reductores como fenoles, anilinas y glucosa. Además, puede determinar indirectamente la actividad de otras enzimas (por ejemplo, amilasas, aminopeptidasas, fosfatasa alcalina, celobiosa oxidasa, quimotripsina o glucosidasa), [162-164].

Debido a que las lacasas pertenecen al exclusivo grupo de enzimas capaces de aceptar electrones directamente desde un electrodo [104] y que además, catalizan la reducción de oxígeno a agua; una aplicación prometedora de las lacasas estaría dirigida al diseño de biopilas de combustible.

## 2.12. Conclusiones

Las lacasas forman parte del subgrupo amplio de oxidasas azules multi-cobre (MCOs) y tienen la capacidad de catalizar la oxidación de una gran variedad de compuestos orgánicos aromáticos de manera concomitante con la reducción del oxígeno molecular a agua; este comportamiento catalítico depende del  $E^0$  del Cu T1, el cual es mayor en algunas lacasas fúngicas comparado con las provenientes de plantas o bacterias. Pese a que varios factores como el grado de solvatación, las interacciones metal-ligando, las interacciones electrostáticas intramoleculares y/o las restricciones del plegamiento de la proteína, afectan el potencial redox de las lacasas, la geometría de coordinación de los sitios de Cu es altamente conservada.

Es importante a destacar la multiplicidad de genes y la existencia de un sistema complejo de elementos reguladores *in vivo*, lo que propicia la producción de varias isoformas; cuya expresión depende de los niveles de nutrientes, las condiciones de cultivo, el estado de desarrollo del hongo y la presencia de agentes inductores. La existencia de numerosos genes para producir isoformas, puede explicarse como consecuencia de la diversidad de funciones fisiológicas de las lacasas durante el ciclo de vida de un hongo (deslignificación, formación del cuerpo fructífero, patogénesis, formación de pigmento durante el desarrollo asexual e interacciones de competencia). No obstante la regulación transcripcional de lacasas aún no es clara.

En la actualidad se conoce la estructura 3D de 28 lacasas fúngicas, 18 provenientes de Basidiomicetes y 10 de Ascomycetes; estas estructuras obtenidas por Cristalografía y Difracción de Rayos X fueron obtenidas con diferente resolución y no es claro ¿Qué tanto influye la resolución de la técnica en las diferencias estructurales encontradas?; sin embargo es claro que existen diferencias interespecíficas (entre las lacasas de diferentes géneros y especies) e intraespecíficas (entre las lacasas del mismo hongo).

Aunque algunas lacasas obtenidas en sistemas no recombinantes se usan a nivel industrial de forma exitosa, no todas combinan los atributos necesarios para favorecer los procesos de producción (estabilidad y actividad en rangos amplios de temperatura y pH, alto potencial redox y halide/hydroxide tolerante). Así, el desarrollo de sistemas robustos de expresión heteróloga podría ofrecer numerosos beneficios en comparación con la purificación de enzimas directamente desde sus productores nativos. Es claro entonces que aún permanecen

varios aspectos que requieren profundización, y las próximas investigaciones podrían estar dirigidas al entendimiento de los mecanismos de regulación de expresión de los genes, la influencia de los patrones de glicosilación en la actividad biológica, y el diseño de sistemas de expresión heteróloga que cumplan con los requerimientos a escala industrial, entre otros.

Finalmente, las lacasas son enzimas antiguas con un gran futuro. Y siguen siendo relevantes como modelo de relaciones estructura/función y como “herramientas verdes” en los procesos industriales, haciendo que su estudio adquiera cada vez más relevancia en la industria biotecnológica.

## 2.13. Referencias

1. Sakurai T, Kataoka K: Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007, 64:2642 – 2656.
2. Ruiz-Dueñas FJ, Martínez ÁT: Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology* 2009, 2:164–177.
3. Thurston CF: The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 1994, 140:19-26.
4. Nakamura K, Goa N: Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005, 62:2050–2066.
5. Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G: Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010, 67:369-385.
6. Strong PJ, Claus H: Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2011, 41:373-434.
7. Loera Corral O, Pérez Pérez MC, Barbosa Rodríguez I, Ricardo J, Villaseñor Ortega F: Laccases. In *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Edited by Guevara-González RG, Torres-Pacheco I. Research Signpost; 2006:323-340.
8. Solís-Oba M, Ugalde-Saldívar VM, González I, Viniegra-González G: An electrochemical–spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,20-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of electroanalytical Chemistry* 2005, 579:59–66.
9. Desai S, Nityanand C: Microbial laccases and their applications: a review. *Asian Journal of Biotechnology* 2011, 3:98-124.
10. Rodríguez Couto S, Toca Herrera JL: Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 2006, 24:500-513.
11. Kunamneni A, Camarero S, García-Burgos C, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M: Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* 2008, 7:DOI: 10.1186/1475-2859-1187-1132.
12. Kunamneni A, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M: Laccases and their applications: a patent review. *Recent Patents on Biotechnology* 2008, 2:10-24.
13. Widsten P, Kandelbauer A: Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 2008, 42:293–307.
14. Singh Arora D, Kumar Sharma R: Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010, 160:1760-1788.
15. Majeau J-A, Brar SK, Tyagi RD: Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology* 2010, 101:2331–2350.
16. Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A: Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research* 2011, 2011.
17. Yoshida H: Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 1883, 43:472-486.
18. Bertrand G: Sur le latex de l'arbre à laque. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 1894, 118:1215-1218.
19. Santhanam N, Vivanco JM, Decker SR, Reardon KF: Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends in Biotechnology* 2011, IN PRESS.
20. Alcalde M: Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In *Industrial Enzymes*, edn VII. Edited by Polaina J, MacCabe AP. Springer; 2007:461–476.

21. Baldrian P: Fungal laccases - occurrence and properties. *Federation of European Microbiological Societies* 2006, 30:215-242.
22. Solomon EI, Augustine AJ, Yoon J: O<sub>2</sub> reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases. *Dalton Transactions* 2008, 30:3921-3932.
23. Kudangaa T, Nyanhongob GS, Guebitzb GM, Burtona S: Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 2011, 48:195-208.
24. Xu F, Berka RM, Wahleithner JA, Nelson BA, Shuster JR, Brown SH, Palmer AE, Solomon EI: Site-directed mutations in fungal laccase : effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemical Journal* 1998, 334:63-70.
25. Wong DWS: Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009, 157:174-209.
26. Piontek K, Antorini M, Choinowski T: Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277:7663-37669.
27. Zhukhlistova NE, Zhukova YN, Lyashenko AV, Zaitsev VN, Mikhailov AM: Three-dimensional organization of three-domain copper oxidases: a review. *Crystallography Reports* 2008, 53:92-109.
28. Kosman DJ: Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2010, 15:15-28.
29. Rodgers CJ, Blanford CF, Giddens SR, Skamnioti P, Armstrong FA, Gurr SJ: Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends in Biotechnology* 2010, 28:63-72.
30. Kumar SVS, Phale PS, Durani S, Wangikar PP: Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering* 2003, 84:386-394.
31. Li H, Webb SP, Ivanic J, Jensen JH: Determinants of the Relative Reduction Potentials of Type-1 Copper Sites in Proteins. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126:8010-8019.
32. Perry CR, Martcham SE, Wood DA, Thurston CF: The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology* 1993, 139:171-178.
33. Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dalbøge H: Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot Basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 1996, 62:834-841.
34. Hoshida H, Nakao M, Kanazawa H, Kubo K, Hakukawa T, Morimasa K, Akada R, Nishizawa Y: Isolation of five lactase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the lactase cDNA in yeasts. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2001, 92:372-380.
35. Wahleithner JA, Xu F, Brown KM, Brown SH, Golightly EJ, Halkier T, Kauppinen S, Pederson A, Schneider P: The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 1996, 29:395-403.
36. Mansur M, Suárez T, Fernández-Larrea JB, Brizuela MA, González AE: Identification of a laccase gene family in the new lignin- degrading Basidiomycete CECT 20197. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63:2637-2646.
37. Xiao YZ, Hong YZ, Li JF, Hang J, Tong PG, Fang W, Zhou CZ: Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, 71:493-501.

38. Litvintseva AP, Henson JM: Characterization of two laccase genes of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* and their differential transcription in melanin mutants and wild type. *Mycological Research* 2002, 106:808-814.
39. Soden DM, O'Callaghan J, Dobson ADW: Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology* 2002, 148:4003-4014.
40. Rodríguez E, Ruiz-Dueñas FJ, Kooistra R, Ram A, Martínez ÁT, Martínez MJ: Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the *pel3* encoded protein. *Journal of Biotechnology* 2008, 134:9-19.
41. Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G, Giardina P: Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 2003, 33:220-230.
42. Piscitelli A, Giardina P, Lettera V, Pezzella C, Sannia G, Faraco V: Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics* 2011, 12:104-112.
43. Collins PJ, Dobson ADW: Regulation of laccase gene transcription. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63:3444-3450.
44. Galhaup C, Goller S, Peterbauer CK, Strauss J, Haltrich D: Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 2002, 148:2159-2169.
45. Terrón MC, González T, Carbajo JM, Yagüe S, Arana-Cuenca A, Téllez A, Dobson ADW, González AE: Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on *lcc* gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genetics and Biology* 2004, 41:954-962.
46. Soden DM, Dobson ADW: Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 2001, 147:1755-1763.
47. Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kues U: Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* 2006, 273:2308-2326.
48. Kües U, Rühl M: Multiple multi-copper oxidase gene families in Basidiomycetes – what for? *Current Genomics* 2011, 12:72-94.
49. Sharma KK, Kuhad RC: Laccase: enzyme revisited and function redefined. *Indian Journal of Microbiology* 2008, 48:309-316.
50. Rebelo AM, Mora AP, Ferreira R, Amado F: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology* 2007, 10:444-451.
51. Tong P, Hong Y, Xiao Y, Zhang M, Tu X, Cui T: High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp. *Biotechnology Letters* 2007, 29:295-301.
52. Kunamneni A, Ballesteros A, Plou FJ, Alcalde M: Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Edited by Méndez-Vilas A. Formatex; 2007:233-245.
53. Brijwani K, Rigdon A, Vadlani PV: Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Research* 2010, 2010:1-10.
54. Elisashvili V, Kachlishvili E: Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 2009, 144:37-42.
55. Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V, Giovanni S: Heterologous laccase production and its role in industrial applications *Bioengineered Bugs* 2010, 1:252-262.

56. Monteiro MC, De Carvalh MEA: Pulp bleaching using laccase from *Trametes versicolor* under high temperature and alkaline conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1998, 70-72:983-993.
57. Faraco V, Giardina P, Palmieri G, Sannia G: *Metal-activated laccase promoters*. Elsevier 2002.
58. Kollmann A, Boyer F-D, Ducrot P-H, Kerhoas L, Jolival C, Touton I, Einhorn J, Mougin C: Oligomeric compounds formed from 2,5-xylidine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005, 68:251–258.
59. Valeriano VS, Silva AMF, Santiago MF, Bara MTF, Garcia TA: Production of laccase by *Pycnoporus sanguineus* using 2,5 - xylidine and ethanol. *Brazilian Journal of Microbiology* 2009, 40:790-794.
60. Eggert C, Temp U, Eriksson K-EL: The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 1996, 62.
61. Shutova VV, Revin VV, Myakushina YA: The effect of copper ions on the production of laccase by the *Fungus lentinus* (Panus) tigrinus. *Ecology and Epidemiology* 2008, 44:619–623.
62. Neifar M, Jaouani A, Ellouze-Ghorbel R, Ellouze-Chaabouni S, Penninckx MJ: Effect of culturing processes and copper addition on laccase production by the white-rot fungus *Fomes fomentarius* MUCL 35117. *Letters in Applied Microbiology* 2009, 49:73-78.
63. Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella C, Sannia G: Cooper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, 66:920-924.
64. Tinoco R, Acevedo A, Galindo E, Serrano-Carreón L: Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology* 2011, 38:531–540.
65. Mikiashvili N, Wasser SP, Nevo E, Elisashvili V: Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2006, 22:999–1002.
66. Mansur M, Suárez T, González AE: Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64:771–774.
67. Rodríguez Couto S, Rodríguez A, Paterson RRM, Lima N, Teixeira JA: Laccase activity from the fungus *Trametes hirsuta* using an air-lift bioreactor. *Letters in Applied Microbiology* 2006, 42:612–616.
68. Elisashvili V, Kachlishvili E, Penninckx M: Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2008, 35:1531–1538.
69. Hou H, Zhoua J, Wang J, Dua C, Yana B: Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry* 2004, 39:1415-1419.
70. Dong JL, Zhang YW, Zhang RH, Huang WZ, Zhang YZ: Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. *Journal of Basic Microbiology* 2005, 45:190–198.
71. Claus H: Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 2004, 35:93-96.
72. Ferraroni M, Myasoedova NM, Schmatchenko V, Leontievsky AA, Golovleva LA, Scozzafava A, Briganti F: Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*:

- evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. *BMC Structural Biology* 2007, 7:1-10.
73. Zhukova YN, Lyashenko AV, Lashkova AA, Gur'yanova VA, Kobyl'skaya YV, Zhukhlistova NE, Mikhailov AM: Atomic structure of unligated laccase from *Cerrena maxima* at 1.76 Å resolution and its complexes with molecular oxygen and hydrogen peroxide. *Crystallography Reports* 2010, 55:436–447.
  74. Valderrama B, Oliver P, Medrano-Soto A, Vazquez-Duhalt R: Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie van Leeuwenhoek* 2003, 84:289–299.
  75. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE: Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews* 1996, 96:2563–2606.
  76. Zumárraga M, TBulter h, Shleev S, Polaina J, Martínez-Arias A, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M: In vitro evolution of a fungal laccase in high concentrations of organic cosolvents. *Chemistry & Biology* 2007, 14:1052–1064.
  77. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, López R, et al.: Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007, 23:2947-2948
  78. Ducros V, Brzozowski A, Wilson K, Brown S, Ostergaard P, Schneider P, Yaver D, Pedersen A, Davies G: Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural Biology* 1998, 5:310-316.
  79. Ducros V, Brzozowski MA, Wilson KS, Ostergaard P, Schneider P, Svendsen A, Davies GJ: Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68Å resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms. *Acta Crystallographica* 2001, D57:333-336.
  80. Garavaglia S, Cambria MT, Miglio M, Ragusa S, Iacobazzi V, Palmieri F, D'Ambrosio C, Scaloni A, Rizzi M: The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *Journal of Molecular Biology* 2004, 342:1519–1531.
  81. Lyashenko AV, Zhukova YN, Zhukhlistova NE, Zaitsev VN, Stepanova EV, Kachalova GS, Koroleva OV, Voelter W, Betzel C, Tishkov VI, et al.: Three-dimensional structure of laccase from *Coriolus zonatus* at 2.6 Å resolution. *Crystallography Reports* 2006, 51:817-823.
  82. Polyakov KM, Fedorova TV, Stepanova EV, Cherkashin EA, Kurzeev SA, Strokopytov BV, Lamzinc VS, Koroleva OV: Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8Å resolution. *Acta Crystallographica* 2009, D65:611–617.
  83. Lyashenko AV, Bento I, Zaitsev VN, Zhukhlistova NE, Zhukova YN, Gabdoulkhakov AG, Morgunova EY, Voelter W, Kachalova GS, Stepanova EV, et al.: X-ray structural studies of the fungal laccase from *Cerrena maxima*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2006, 11:963-973.
  84. Bertrand T, Jolival C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, Mougin C: Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 2002, 41:7325-7333.
  85. Lyashenko AV, Zhukhlistova NE, Gabdoulkhakov AG, Zhukova YN, Voelter W, Zaitsev VN, Bento I, Stepanova EV, Kachalova GS, Koroleva OgV, et al.: Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima*. *Acta Crystallographica* 2006, F62:954–957.
  86. Hakulien N, Kiiskinen L-L, Kruus K, Saloheimo M, Paananen A, Koivula A, Rouvinen J: Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural Biology* 2002, 9:601-605.

87. Ge H, Gao Y, Hong Y, Zhang M, Xiao Y, Teng M, Niu L: Structure of native laccase B from *Trametes* sp. AH28-2. *Acta Crystallographica* 2010, F66:254–258.
88. Kallio JP, Gasparetti C, Andberg M, Boer H, Koivula A, Kruus K, Rouvinen J, Hakulinen N: Crystal structure of an ascomycete fungal laccase from *Thielavia arenaria* – common structural features of asco-laccases. *FEBS Journal* 2011, 278:2283–2295.
89. Hakulinen N, Kruus K, Koivula A, Rouvinen J: A crystallographic and spectroscopic study on the effect of X-ray radiation on the crystal structure of *Melanocarpus albomyces* laccase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, 350:929–934.
90. Hakulinen N, Andberg M, Kallio J, Koivula A, Kruus K, Rouvinen J: A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccase. *Journal of Structural Biology* 2008, 162:29–39.
91. Kallio JP, Auer S, Jänis J, Andberg M, Kruus K, Rouvinen J, Koivula A, Hakulinen N: Structure–function studies of a *Melanocarpus albomyces* laccase suggest a pathway for oxidation of phenolic compounds. *Journal of Molecular biology* 2009, 392:895–909.
92. Kallio JP, Rouvinen J, Kruus K, Hakulinen N: Probing the dioxygen route in *Melanocarpus albomyces* laccase with pressurized xenon gas. *Biochemistry* 2011, 50:4396–4398.
93. Andberg M, Hakulinen N, Auer S, Saloheimo M, Koivula A, Rouvinen J, Kruus K: Essential role of the C-terminus in *Melanocarpus albomyces* laccase for enzyme production, catalytic properties and structure. *FEBS Journal* 2009, 276:6285–6300.
94. Hakulinen N, Kiiskinen L-L, Kruus K, Saloheimo M, Paananen A, Koivula A, Rouvinen J: Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural Biology* 2002, 9:601–605.
95. Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA: Crystal structure of a bacterial endospore coat component. *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278:19416–19425.
96. Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP, Kumar A: Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2011, 68:117–128.
97. Gianfreda L, Xu F, Bollag J-M: Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 1999, 3:1–26.
98. Martínez ÁT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC: Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 2005, 8:195–204.
99. Ralph J, Brunow G, Boerjan W: Lignins. In *eLS: Encyclopedia of Life Sciences*. Edited by Ltd JWS. <http://www.els.net>; 2007.
100. Torres E, Bustos-Jaimes I, Le Borgne S: Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* 2003, 46:1–15.
101. Riva S: Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trend in Biotechnology* 2006, 24:219–226.
102. Bourbonnais R, Paice MG: Oxidation of non-phenolic substrates- an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 1990, 127:99–102.
103. Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Bodie E, Borneman S: Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63:4627–4632.
104. Call HP, Mucke I: History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology* 1997, 53:163–202.

105. Johannes C, Majcherczyk A, Hüttermann A: Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1996, 46:313-317.
106. Collins PJ, Kotterman MJJ, Field JA, Dobson ADW: Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 1996, 62:4563-4567.
107. Majcherczyk A, Johannes C, Hüttermann A: Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 1998, 22:335-341.
108. Majcherczyk A, Johannes C: Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, 1474:157-162.
109. Alcalde M, Bulter T, Arnold FH: Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *Journal of Biomolecular Screening* 2002, 7:547-553.
110. Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R: Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 Laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65:3805-3809.
111. Baldrian P, Snajdr J: Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 2006, 39:1023-1029.
112. Cañas AI, Camarero S: Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 2010, 28:694-705.
113. Johannes C, Majcherczyk A: Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, 66:524-528.
114. Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez ÁT: Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71:1775-1784.
115. Nakamura K, Go N: Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005, 62:2050-2066.
116. Pezet R: Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *FEMS Microbiology Letters* 1998, 167:203-208.
117. Wang HX, Ng TB: Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, 315:450-454.
118. Min K-L, Kim Y-H, Kim YW, Jung HS, Hah YC: Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001, 392:279-286.
119. Edens WA, Goins TQ, Dooley D, Henson JM: Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65:3071-3074.
120. Junghanns C, Pecyna MJ, Böhm D, Jehmlich N, Martin C, von Bergen M, Schauer F, Hofrichter M, Schlosser D: Biochemical and molecular genetic characterisation of a novel laccase produced by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009, 84:1095-1105.

121. De Souza CGM, Peralta RM: Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of Basic Microbiology* 2003, 43:278–286.
122. Wang HX, Ng TB: Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, 69:521–525.
123. Ng TB, Wang HX: A homodimeric laccase with unique characteristics from the yellow mushroom *Cantharellus cibarius*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, 313:37–41.
124. Salony NG, Baranwal R, Chhabra M, Mishra S, Chaudhuri TK, Bisaria VS: Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008, 1784:259–268.
125. Jönsson LJ, Saloheimo M, Penttilä M: Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetics* 1997, 32:425–430.
126. O’Callaghan J, O’Brien M, McClean K, Dobson A: Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2002, 29:55–59.
127. Hong F, Meinander NQ, Jönsson LJ: Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 2002, 79:438–449.
128. Cassland P, Jönsson LJ: Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999, 52:393–400.
129. Larsson S, Cassland P, Jönsson LJ: Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 2001, 67:1163–1170.
130. Gelo-Pujic M, Hyug-Han K, Butlin NG, Palmore GTR: Electrochemical Studies of a Truncated Laccase Produced in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65:5515–5521.
131. Brown MA, Zhao Z, Mauk AG: Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorganica Chimica Acta* 2002, 331:232–238.
132. Guo M, Lu F, Du L, Pu J, Bai D: Optimization of the expression of a laccase gene from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, 71:848–852.
133. Jolival C, Madzak C, Brault A, Caminade E, Malosse C, Mougins C: Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005, 66:450–456.
134. Necochea R, Valderrama B, Díaz-Sandoval S, Folch-Mallol JL, Vázquez-Duhalt R, Iturriaga G: Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. *FEMS Microbiology Letters* 2005, 244:235–241.
135. Bohlin C, Jonsson LJ, Roth R, Van Zyl WH: Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2006, 129-132:195–214.
136. Téllez-Jurado A, Arana-Cuenca A, González Becerra AE, Viniegra-González G, Loera O: Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* 2006, 38:665–669.

137. Saloheimo M, Niku-Paavola M-L: Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. *Nature Biotechnology* 1991, 9:987 - 990.
138. Hatamoto O, Sekine H, Nakano E, Abe K: Cloning and expression of a cDNA encoding the laccase from *Schizophyllum commune*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 1999, 63:58-64.
139. Yaver DS, Overjero MDC, Xu F, Nelson BA, Brown KM, Halkier T, Bernauer S, Brown SH, Kauppinen S: Molecular characterization of laccase genes from the Basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase Lcc1. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, 65:4943–4948.
140. Otterbein L, Record E, Longhi S, Asther M, Moukha S: Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *European Journal of Biochemistry* 2000, 267:1619-1625.
141. Record E, Punt PJ, Chamkha M, Labat M, Hondel CAMJJvd, Asther M: Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *European Journal of Biochemistry* 2002, 269:602-609.
142. Sigoillot C, Record E, Belle V, Robert JL, Levasseur A, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ, Fournel A, Sigoillot JC, Asther M: Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, 64:346–352.
143. Madzak C, Otterbein L, Chamkha M, Moukha S, Asther M, Gaillardin C, Beckerich J-M: Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* 2005, 5:635–646.
144. Kiiskinen LL, Ratto M, Kruus K: Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology* 2004, 97:640-646.
145. Klonowska A, Gaudin C, Asso M, Fournel A, Réglie M, Tron T: LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast. *Enzyme and Microbial Technology* 2005, 36:34–41.
146. Piscitelli A, Giardina P, Mazzoni C, Sannia G: Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005, 69:428–439.
147. Faraco V, Ercole C, Festa G, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G: Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008, 77:1329–1335.
148. Hoshida H, Fujita T, Murata K, Kubo K, Akada R: Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2005, 69:1090-1097.
149. Colao MC, Lupino S, Garzillo AM, Buonocore V, Ruzzi M: Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microbial Cell Factories* 2006, 5:1-11.
150. Camattari A, Bianchi MM, Branduardi P, Porro D, Brambilla L: Induction by hypoxia of heterologous-protein production with the KIPDC1 promoter in yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 2007, 73:922–929.
151. Li JF, Hong YZ, Xiao YZ, Xu YH, Fang W: High production of laccase B from *Trametes* sp. in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2007, 23:741–745.
152. Hong Y-z, Zhou H-m, Tu X-m, Li J-f, Xiao Y-z: Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes* sp. 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Current Microbiology* 2007, 54:260–265.

153. Bleve G, Lezzi C, Mita G, Rampino P, Perrotta C, Villanova L, Grieco F: Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008, 79:731-741.
154. Hu M-R, Chao Y-P, Zhang G-Q, Yang X-Q, Xue Z-Q, Qian S-J: Molecular evolution of *Fomes lignosus* laccase by ethyl methane sulfonate-based random mutagenesis in vitro. *Biomolecular Engineering* 2007, 24:619–624.
155. Dittmer NT, Kanost MR: Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2010, 40:179-188.
156. Savant DV, Abdul-Rahman R, Ranade DR: Anaerobic degradation of adsorbable organic halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater. *Bioresource Technology* 2006, 97:1092–1104.
157. Sarria-Alfonso V, Sánchez-Sierra J, Aguirre-Morales M, Gutiérrez-Rojas I, Moreno-Sarmiento N, Poutou-Piñales RA: Culture media's statistical optimization for biomass production of a ligninolytic fungus for future rice straw degradation. *Indian Journal of Microbiology* 2011, Submitted.
158. Pedroza AM, Mosqueda R, Alonso-Vante N, Rodríguez-Vázquez R: Sequential treatment via *Trametes versicolor* and UV/TiO<sub>2</sub>/RuxSey to reduce contaminants in waste water resulting from the bleaching process during paper production. *Chemosphere* 2007, 67:739-801.
159. Henao-Jaramillo LM, Fernández-González JA, Quevedo-Hidalgo B, Florido-Cuellar AE, Pedroza-Rodríguez AM: Use of a non-conventional biological system and advance oxidation process with TiO<sub>2</sub>/UV to the discoloration od reactive black 5. *International Biotechnology Color Journal* 2011, 1:IN PRESS.
160. Kojima Y, Tsukuda Y, Kawai Y, Tsukamoto A, Sugiura J, Sakaino M, Kita Y: Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *The Journal of Biological Chemistry* 1990, 265:15224-15230.
161. Fernández JA, Henao LM, Pedroza-Rodríguez AM, Quevedo-Hidalgo B: Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2009, XI:59-72.
162. Minussi RC, Pastore GM, Durán N: Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 2002, 13:205–216.
163. Xu F: Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnology* 2005, 1:38-50.
164. Mayera AM, Staples RC: Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 2002, 60:551–565.

## CAPÍTULO 3.

### ANÁLISIS COMPUTACIONAL Y EXPRESIÓN CONSTITUTIVA A BAJA ESCALA DEL GEN SINTÉTICO DE LA LACASA *POXA 1B* DE *Pleurotus ostreatus* EN *Pichia pastoris*

### 3.1. Introducción

En la actualidad se usan más de  $7 \times 10^5$  toneladas métricas al año de colorantes en las industrias productoras de papel, textiles y teñido de cueros [1]. Las clases químicas de los colorantes sintéticos más usadas en estas industrias son las antraquinonas, los sulfuros, los indigoides, los trifenilmetánicos, los derivados de las ftalocianinas y los azo [2]; todos caracterizados por la presencia de anillos aromáticos en la estructura. Además del problema asociado al color, la mayoría de estos compuestos son tóxicos, carcinogénicos y altamente recalcitrantes.

Por otra parte, los tratamientos biológicos convencionales para degradar los colorantes provenientes de las aguas contaminadas no son lo suficientemente efectivos, por lo que se requiere el uso de estrategias no convencionales para eliminarlos; como técnicas físicas y químicas; incluyendo adsorción a matrices orgánicas o inorgánicas y la decoloración por fotocátalisis y oxidación [3-5].

Algunos microorganismos ligninolíticos como los hongos de podredumbre blanca, entre ellos *Pleurotus ostreatus*, son capaces de degradar una gran variedad de compuestos contaminantes de naturaleza aromática (similares a la lignina y sus derivados). En sentido general los Basidiomicetes son considerados los degradadores más eficientes de lignina, debido a su maquinaria enzimática compuesta principalmente por Lacasas (EC 1.10.3.2), Lignino peroxidasas (EC 1.11.10.14) y Manganese peroxidasas (EC 1.11.1.13). Esta dotación enzimática resulta muy atractiva para la industria, por su capacidad para catalizar la oxidación de los compuestos tóxicos al mismo tiempo que realizan la reducción del oxígeno molecular a agua y porque a diferencia de las otras peroxidasas, presentan una alta estabilidad; facilitando la posibilidad de usarlas de forma inmovilizada [6-9]. Pese a que la producción de enzimas ligninolíticas a partir de las fuentes nativas (hongos) está limitada por los largos tiempos de producción y las bajas concentraciones que se obtienen (lo que genera desventajas económicas y productivas para el sector industrial); estudios recientes han mostrado que el empleo directo de lacasas permite alcanzar una degradación rápida y significativa de los sustratos de interés [10].

En contraste, las levaduras, tienen un crecimiento rápido, es relativamente fácil su manipulación genética y son capaces de realizar modificaciones postraduccionales específicas

(procesamiento proteolítico, formación de puentes disulfuro y glicosilación entre otros), por lo que son muy utilizadas como sistema de expresión de enzimas recombinantes. Adicionalmente, el cultivo de levaduras es económico, presenta rendimientos altos y son poco exigentes en términos de tiempo y medios de cultivo [11], lo que representa una ventaja para la producción a mayor escala de enzimas [9].

En sentido general, para incrementar la producción de las enzimas recombinantes en levaduras se han utilizado varias estrategias, como la integración en DNA cromosomal de múltiples copias del gen de interés, el uso de promotores fuertes y de péptidos señales eficientes en los vectores de expresión, de forma tal que el hospedero pueda sobre-exresar la proteína y secretarla al medio de cultivo; simplificando así el proceso de *downstream*, pues al centrifugar el cultivo se obtiene proteína recombinante en el extracto crudo sin la necesidad de hacer ruptura celular [11-13].

Hasta el momento, la expresión heteróloga de lacasas de hongos en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* [14], *Pichia pastoris* [15,16], *Pichia methanolica* [17], *Yarrowia lipolytica* [18] y *Kluyveromyces lactis* [19] se ha llevado a cabo en su mayoría bajo el uso de promotores inducibles y aunque se han obtenido resultados prometedores, la vía para obtener niveles altos de expresión y de actividad biológica es controversial. En este sentido algunos investigadores consideran que los hospederos más adecuados para la producción heteróloga de lacasas fúngicas son los Ascomicetes, debido a lo amigables que son para la manipulación genética y el escalado a procesos industriales; sin embargo, los potenciales redox más altos se han obtenido en lacasas recombinantes expresadas en Basidiomicetes (organismos que son considerados menos amigables para ser modificados genéticamente) [11,20,21].

La habilidad para producir lacasas en sistemas heterólogos de forma eficiente depende en gran medida de la naturaleza de los cambios realizados en la secuencia original del DNA. Por ejemplo, se ha logrado incrementar la secreción de la enzima, reemplazando la secuencia del péptido señal nativo por otros péptidos señales presentes en proteínas con alto grado de secreción en el organismo hospedero [20,22]. Un factor adicional que puede influir en la expresión de proteínas recombinantes, es la síntesis química de gen a expresar, pues se pueden modificar de manera sinónima los codones, para facilitar la traducción, disminuyendo así la

presión sobre el hospedero para que utilice codones inusuales; en este sentido Bulter *et al.*, encontraron que estas modificaciones incrementaron la expresión de lacasa de *Myceliophthora thermophila* en *S. cerevisiae* [23]. Pese a estas experiencias aún es incierta la selección del “mejor hospedero, la estrategia infalible o la lacasa más promisoría”.

Este trabajo tuvo varios objetivos, el primero optimizar la secuencia del gen *POXA 1B* para que una vez sintetizado pudiera ser replicado, transcrito y traducido como propio en la levadura *P. pastoris*. El segundo objetivo fue proponer y validar un modelo 3D para la estructura de la lacasa POXA 1B o Lacc6 de *P. ostreatus*; el tercer objetivo fue analizar por Docking molecular la interacción de esta lacasa con el sustrato ABTS [ácido 2,2' azino-bis-(3 etil benzotiazoline sulfato)], (comúnmente utilizado para la detección de actividad biológica). Finalmente respaldar a través de la expresión heteróloga constitutiva de la secuencia sintética del gen *POXA 1B* en *P. pastoris* todo el trabajo computacional desarrollado previamente.

La información obtenida en este trabajo es de gran utilidad para avanzar en los procesos de producción a mayor escala de las lacasas recombinantes, utilizando el sistema de expresión *P. pastoris* y para generar aproximaciones al estudio de la dinámica molecular y de los mecanismos de estas reacciones enzimáticas; así como de las interacciones entre esta lacasa y los diferentes sustratos sobre los cuales puede ejercer su acción.

## 3.2. Materiales y Métodos

### 3.2.1. Optimización y diseño de la secuencia sintética de la lacasa de *P. ostreatus*

El gen que codifica para la lacasa Lacc6 o POXA 1B de *P. ostreatus* se diseñó a partir de una secuencia que se encuentra en el *Joint Genome Institute* - USA ([http://genome.jgi.doe.gov/PleosPC15\\_2/PleosPC15\\_2.home.html](http://genome.jgi.doe.gov/PleosPC15_2/PleosPC15_2.home.html)) [53,16,54]. La secuencia fue optimizada a través del algoritmo OptimumGene™ de GenScript (USA Inc. 860 Centennial Ave. Piscataway, NJ 08854); el gen optimizado se denominó *lacPost-Stop* (laccase from *Pleurotus ostreatus* with stop codon). Dicha optimización se realizó con el objetivo de ajustar el uso de codones para la expresión en *P. pastoris*, el contenido de GC, la presencia de elementos reguladores *Cis* y las secuencias repetitivas. Adicionalmente, se eliminaron las secuencias del péptido señal nativo y se añadieron los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* en los extremos 5' y 3' respectivamente; con el fin de facilitar la construcción del vector de expresión. La secuencia optimizada fue sintetizada por la compañía GenScript (USA Inc. 860 Centennial Ave. Piscataway, NJ 08854).

### 3.2.2. Modelación 3D

La secuencia protéica y su modelo obtenido por traducción conceptual del gen optimizado para la lacasa *POXA 1B* (*lacPost-Stop*) de *P. ostreatus* se denominó LacPost. La secuencia se cargó en el servidor en línea *Phyre 2.0* del *Structural Bioinformatics Group* (Imperial College, London), [55]. El molde identificado por *Phyre* fue la estructura cristalográfica de la lacasa de *Trametes versicolor* registrada en el *Protein Data Bank* (PDB) con el código de acceso 1GYC. *Phyre* se encuentra asociado a otro servidor llamado *3DLigandSite*, capaz de generar un *cluster* de ligandos posibles en los sitios activos de ciertas proteínas [56]. Usando la base de datos Pfam [57,58], se identificaron los diferentes dominios estructurales de los modelos y a través del software Chimera [59] se solaparon los modelos con la estructura 1GYC, con el fin de eliminar los iones de cobre estimados erróneamente y de esta manera dejar solamente aquellos que se ajustaran mejor a la simetría de los iones del molde. La estimación sólo ocurrió en los sitios T2/T3, por lo tanto, para agregar el ion faltante y basados en el solapamiento, se usaron las coordenadas del cobre del sitio T1 del molde y luego se adicionaron al archivo de coordenadas de cada modelo modificando la función HETAM.

### 3.2.3. Evaluación y análisis del modelo

La evaluación de la geometría se realizó con el servidor QMEAN del *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB). QMEAN estima la calidad de la estructura de los modelos haciendo una comparación exhaustiva con las estructuras determinadas por cristalografía o por resonancia magnética depositadas en el PDB, usando dos funciones de puntuación QMEANlocal y QMEANclust [60-62]. Para estimar la disposición correcta de los ángulos dihedrales ( $\psi/\Phi$ ) se generó un gráfico de Ramachandran ignorando los residuos de glicina y prolina por medio del programa USFC Chimera. El análisis de RMSD se hizo comparando cada modelo con la estructura de *T. versicolor* a través del programa *SuperPose* 1.0 [62,63]. La arquitectura de los modelos fue analizada con el programa VADAR 1.8 [43], el cual calcula la distancia promedio de los enlaces de hidrógeno, ángulos dihedrales, área de superficie accesible y el volumen de los modelos.

### 3.2.4. Modelación de ligandos y Docking molecular

Se escogió como modelo de ligando la molécula de ABTS [ácido 2,2' azino-bis-(3 etil benzotiazoline sulfato)]. Usando la especificación de introducción lineal molecular simplificada o cadenas SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) suministradas por la base de datos Pubchem del NCBI [64]. La estructura se modeló y se refinó con el programa Chimera. Antes de llevar a cabo los experimentos de docking con el programa AutoDock 4.2 [65], se usó el programa CASTp [66] con el fin de identificar la accesibilidad del sustrato en la superficie de la lacasa y por lo tanto, los residuos implicados en el bolsillo catalítico. Se adicionaron hidrógenos polares a cada receptor, y luego se agregaron las cargas a éstos y al ligando por el método de Gasteiger [67]. El archivo de coordenadas que AutoDock proporcionó en la preparación del receptor fue modificado para suministrar las cargas de los átomos de cobre. Teniendo en cuenta las salidas de CASTp, se calculó la grilla; situándola justo en el bolsillo de enlace de cada modelo. Se usaron dos dimensiones de caja diferentes para ABTS ( $40^3$  y  $50^3$  puntos) con un espaciado de  $0.375\text{\AA}$ . Los parámetros de la grilla y los mapas atómicos de afinidad se calcularon con AutoGrid 4. Cada experimento de docking se realizó con el algoritmo genético Lamarkiano con 2500000 evaluaciones energéticas con un tamaño poblacional de 150. Con el objetivo de seleccionar la configuración de ABTS más cercana a un complejo cristalográfico, se compararon los acoplamientos predichos con la estructura de lacasa 3ZDW co-cristalizada con ABTS, midiendo el RMSD de cada estimación con el

programa Chimera. Finalmente, se determinaron las interacciones moleculares del ligando con el modelo y se registró la energía de enlace en kcal mol<sup>-1</sup>.

### 3.2.5. Clonación y expresión del gen sintético *laccPost-Stop*

#### 3.2.5.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo

*E. coli*, DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup> *endA1*, *glnV44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *deoR*, *nupG*,  $\Phi$ 80 $\Delta$ *lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>),  $\lambda$ <sup>-</sup>), fue utilizada como hospedero para la subclonación. *P. pastoris* X-33 (Wild type) se usó como hospedero para la expresión de la lacasa recombinante. Inicialmente, el gen sintético se almacenó en el plásmido de transporte pUC57 (pUC57-*laccPost-Stop*) y el plásmido pGAPZ $\alpha$ A se usó como vector para la expresión constitutiva. *E. coli* DH5 $\alpha$  fue cultivada en caldo Luria-Bertani (LB) (1% (w/v) Triptona, 0.5% (w/v) Extracto de levadura, 0.5% (w/v) NaCl, pH 7.5  $\pm$  0.2) o en cajas de Petri con agar LB (caldo LB + 1.5% (w/v) agar-agar). Cuando fue necesario, se agregó ampicilina a concentración de 100 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> o Zeocina® a 40 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. *P. pastoris* se cultivó en medio YPD (Extracto de levadura 1% (w/v), Peptona 2% (w/v), Glucosa 2% (w/v)) o en cajas de Petri con agar YPD. Las cepas recombinantes se seleccionaron en agar YPD suplementado con 100 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de Zeocina®, 0.2mM ABTS y 0.1mM CuSO<sub>4</sub>.

#### 3.2.5.2. Construcción del vector de expresión para la lacasa POXA 1B de *P. ostreatus*

Las manipulaciones de DNA y clonaciones se llevaron a cabo bajo procedimientos previamente estandarizados [68]. Una vez multiplicado en *E. coli*, el vector pUC57-*laccPost-Stop* se purificó y se realizó una doble digestión enzimática usando *EcoRI* y *NotI* (Promega USA, 2800 Woods Hollow Road, Madison WI 53711-5399). El producto de la restricción se resolvió por electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v) en buffer TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA pH 8.0  $\pm$  0.2). La porción de gel que contenía el tamaño de banda esperado, se purificó usando el kit *Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega USA, 2800 Woods Hollow Road, Madison WI 53711-5399). El fragmento purificado se ligó usando el kit de ligación *LigaFast®* (Promega USA, 2800 Woods Hollow Road, Madison WI 53711-5399) al vector de expresión constitutiva pGAPZ $\alpha$ A previamente digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* (Promega, USA, 2800 Woods Hollow Road, Madison WI 53711-5399).

La cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* fue transformada con la mezcla de ligación y posteriormente, las bacterias transformadas se seleccionaron por su capacidad de crecer en medio LB en presencia de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Zeocina $\text{\textcircled{R}}$ . A las bacterias transformantes se les realizó una extracción de ADN plasmídico usando el kit *Wizard $\text{\textcircled{R}}$  Plus SV Miniprep Purification System* (Promega USA, 2800 Woods Hollow Road, Madison WI 53711-5399) y el nuevo vector de expresión se denominó pGAPZ $\alpha$ A-*lac*cPost-Stop; luego se realizó un análisis de restricción usando las enzimas *Eco*RI, *Bam*HI y *Hind*III para demostrar la presencia del gen de interés y su correcta inserción.

### 3.2.5.3. Screening de los transformantes en *P. pastoris* X-33

El vector de expresión pGAPZ $\alpha$ A-*lac*cPost-Stop usado para la transformación se linearizó con la enzima de restricción *A*vrII (New England BioLabs USA, 240 County Road, Ipswich, MA 01938-2723, 978-927-5054). Las células competentes de *P. pastoris* X-33 fueron transformadas por electroporación siguiendo el protocolo sugerido por Invitrogen. Se utilizaron alrededor de 1 $\mu\text{g}$  de vector linearizado y 80 $\mu\text{L}$  de células competentes de *P. pastoris* X-33. Inmediatamente después del pulso (1.5kv, 5ms), se agregó 1mL de sorbitol 1M a 0 $^{\circ}\text{C}$  a la cubeta de electroporación para estabilizar las células.

Posterior a la incubación de las células durante 2 horas a 30 $^{\circ}\text{C}$  y sin agitación, se les agregó 1mL de medio YPD y se incubaron durante 3 horas a 30 $^{\circ}\text{C}$  y 200 rpm. Finalmente, se sembraron en cajas de Petri con agar YPD (suplementado con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Zeocina $\text{\textcircled{R}}$ , 0.2 mM ABTS y 0.1 mM CuSO $_4$ ). Las cajas de Petri se incubaron a 30 $^{\circ}\text{C}$  y se monitorearon diariamente hasta que aparecieran colonias y se formara un halo verde o púrpura (de acuerdo al estado de oxidación del ABTS) alrededor de las colonias transformadas que portaban el gen de la lacasa; indicando la oxidación del ABTS como consecuencia de la acción de la lacasa recombinante; para el caso de los transformantes control no se esperaba la aparición de halo alguno. Los clones obtenidos en este ensayo fueron denominados X-33/pGAPZ $\alpha$ A-*lac*cPost-Stop.

### 3.2.6. Determinación de actividad enzimática

La actividad lacasa se midió monitoreando el cambio en la absorbancia a 436nm ( $\xi_{436}=29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) debido a la oxidación del ABTS [ácido 2,2' azino-bis-(3 etil benzotiazoline sulfato)] en

solución tampón de acetato de sodio 60 mM (pH  $4.5 \pm 0.2$ ). El ensayo se realizó mezclando 800 $\mu$ L de extracto crudo a temperatura ambiente, 100 $\mu$ L de tampón 600mM y 100 $\mu$ L de ABTS 5mM. La formación de un radical catiónico verde se siguió espectrofotométricamente durante 3 minutos. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que permite la oxidación de 1 $\mu$ mol de ABTS por minuto. El blanco estaba compuesto de 800 $\mu$ L de agua destilada, 100 $\mu$ L de tampón 600mM y 100 $\mu$ L de ABTS 5Mm. La actividad se expresó en  $UL^{-1}$  [69].

### 3.2.7. Estudios preliminares de expresión de la lacasa recombinante en *Pichia pastoris*

Una colonia de los transformantes positivos se creció a 30°C en 5mL de medio YPD en tubos de 50mL durante 16 a 20 horas con agitación de 210 rpm hasta alcanzar un valor de  $OD_{\lambda 600nm}$  entre 2-5. Se sembraron 2mL de inóculo en 98mL de medio YPD en erlenmeyer de 500mL (2% v/v). El cultivo se monitoreó midiendo la densidad óptica ( $OD_{\lambda 600nm}$ ), concentración de proteínas totales extracelulares (mg  $mL^{-1}$ ) por Biuret [70], glucosa residual ( $g L^{-1}$ ) por la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [71], y actividad lacasa ( $U L^{-1}$ ), utilizando ABTS [ácido 2,2' azino-bis-(3 etil benzotiazoline sulfato)] como sustrato [69]. Las muestras se tomaron cada 2 horas durante las primeras 12 horas y luego cada 12 horas hasta completar 156 horas de cultivo. Para calcular la concentración de biomasa celular se empleó una curva de calibración ( $X_{(g DCW L^{-1})}$  vs.  $OD_{\lambda 600nm}$ ), representada por la ecuación I.

$$X = 1.1726 \times OD_{\lambda 600nm} \quad (R^2 = 0.987), \quad (I)$$

**Donde:**  $X = gL^{-1}$  de peso seco celular (Dry Cell Weight (DCW)).

El dato de  $X$  ( $gL^{-1}$  de DCW), se transformó como  $Ln(x/x_0)$  y graficado vs. tiempo (h); la tendencia de la curva (fase exponencial) se usó para calcular la velocidad específica de crecimiento  $\mu_{(x)}$  ( $h^{-1}$ ), (Ecuaciones II-IV) y tiempo de duplicación  $t_d$  (h), (Ecuación V), [12,72,73].

$$\mu_{(x)} = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}, \quad (II)$$

$$Ln x = Ln x_0 + \mu_{(x)} t, \quad (III)$$

$$\text{Ln}\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu_{(x)}t, \quad (IV)$$

**Donde:**  $t = t_{fase\ log} - t_{fase\ log}$

$$t_d = \frac{\text{Ln}2}{\mu_{(x)}}, \quad (V)$$

La actividad específica fue calculada dividiendo la actividad enzimática de cada hora de cultivo entre la concentración de proteínas totales extracelulares (Ecuación VI).

$$\text{Act.Esp.} = \frac{\text{Act.Enz.}}{\text{Conc.Prot}}, \quad (VI)$$

**Donde:**  $\text{Act.Enz.} = \text{U L}^{-1}$ ,  $\text{Conc.Prot.} = \text{mg ml}^{-1}$

La productividad de la biomasa ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), (Ecuación VII) y en función de la actividad biológica de la enzima ( $\text{UL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), (Ecuación VIII) se calculó como sigue respectivamente [12,72,73].

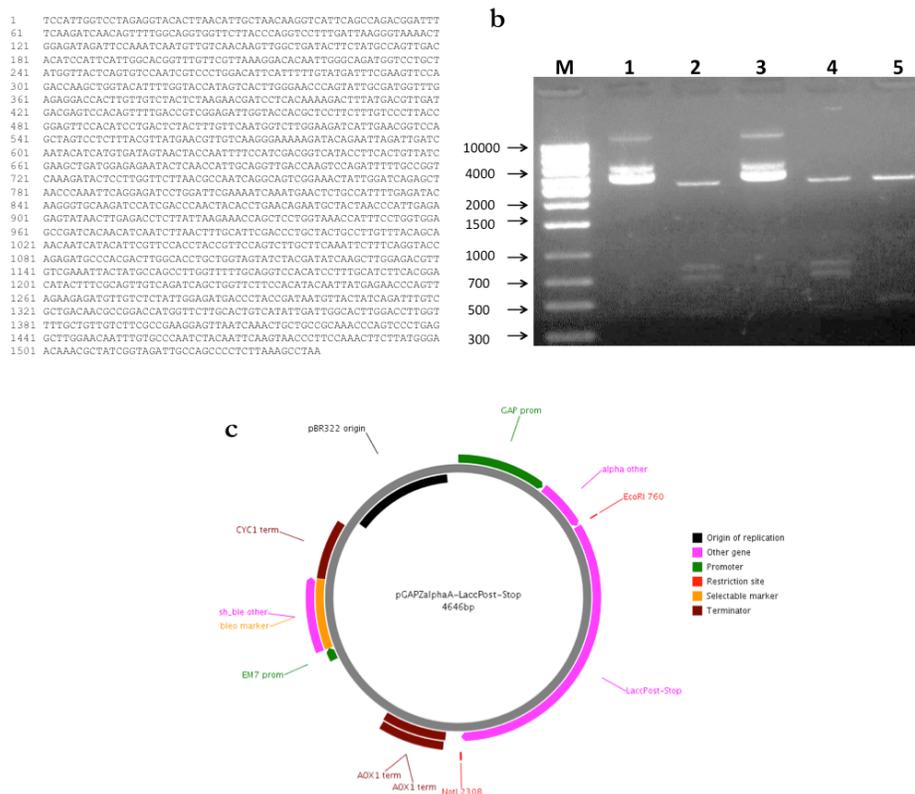
$$P_{(x)} = \frac{[DCW]}{t}, \quad (VII)$$

$$P_{(Enzima)} = \frac{\text{Act}_{Enzima}}{t}, \quad (VIII)$$

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Optimización y diseño del gen *laccPost-Stop*

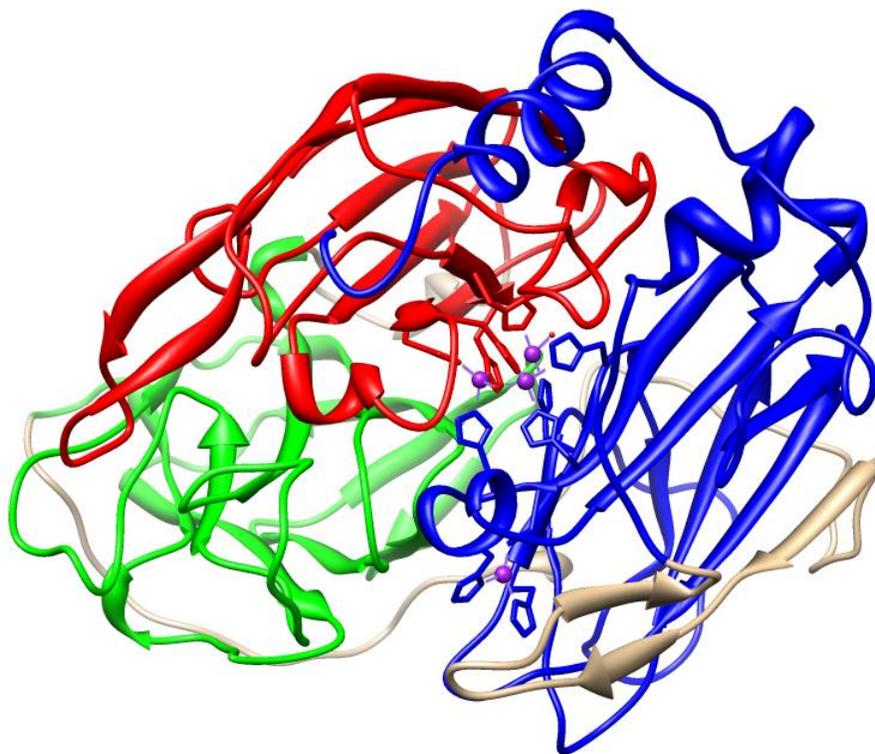
*P. ostreatus* presenta diferencias importantes en cuanto al uso de codones al compararlo con *P. pastoris*. La secuencia de DNA de gen *POXA 1B* incluía algunos codones que en *P. pastoris* son utilizados con baja frecuencia, con valores iniciales de CAI (Codon Adaptation Index) de 0.61, valor que luego de la optimización se incrementó a 0.84. De igual forma, se optimizó el contenido de GC, donde en la secuencia final obtenida se redujo de 54.83% a 43.88%, porcentaje de GC cercano al rango de 47-49%, y que corresponde a los valores que normalmente se encuentran en *P. pastoris*. Adicionalmente, se optimizaron también las secuencias involucradas en la formación de estructuras secundarias e inestables del mRNA [24], y se modificó el codón de parada original de TGA a TAA; así mismo, se añadieron los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* en los extremos 5' y 3' respectivamente (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Construcción de pGAPZ $\alpha$ A-*laccPost-Stop*. **a.** Secuencia optimizada del gen de la lacasa *laccPost-Stop* para la expresión en *P. pastoris*, **b.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v) en TAE 1X para el análisis de restricción del vector de expresión pGAPZ $\alpha$ A-*laccPost-Stop* (Carril 1 pGAPZ $\alpha$ A digerido *Eco*RI y *Bam*HI, carriles 2 y 4 pGAPZ $\alpha$ A-*laccPost-Stop*, y carriles 3 y 5 pGAPZ $\alpha$ A-*laccPost-Stop* digerido con *Eco*RI, *Bam*HI y *Hind*III) portando la secuencia sintética para el gen *POXA 1B*. M: marcador de talla molecular 1Kb AXYGEN) **c.** Esquema final del constructo pGAPZ $\alpha$ A-*laccPost-Stop* que fue transformado en la levadura *P. pastoris* X33.

### 3.3.2 Análisis estructural del modelo construido por homología

Phyre predijo 120 modelos diferentes para las secuencias de lacasa de *P. ostreatus* (LaccPost). La puntuación más alta obtenida fue para los modelos construidos con base en la estructura cristalográfica del PDB con código de acceso 1GYC (1.9 Å) de *Trametes versicolor* [25]. El modelo obtenido para LaccPost presentó una identidad del 62% con respecto a 1GYC, con un valor de confianza de 100% (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Diagrama en cintas del modelo LaccPost. Los dominios D1, D2 y D3 aparecen coloreados en rojo, verde y azul respectivamente. Se observan los iones de cobre y átomos de oxígeno como esferas moradas y rojas respectivamente.

Para determinar si los iones de cobre se encontraban situados correctamente en la estructura, se hicieron comparaciones de las medidas de los ángulos y las distancias que se forman entre los residuos que coordinan los iones de cobre con los mismos iones, y se determinó que los valores son cercanos a las medidas de 1GYC (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Medidas de las distancias que se forman entre los átomos de los residuos que coordinan los iones de cobre con los mismos cobres de los modelos y el molde.

<i>Sitio</i>	<i>T. versicolor</i>		<i>P. ostreatus</i>	
	<b>Residuos aminoácidos y cobres que forman el ángulo</b>	<b>Angulo (°)</b>	<b>Residuos aminoácidos y cobres que forman el ángulo</b>	<b>Angulo (°)</b>
T1	His458 (ND1)→Cu1→Cys453 (SG)	129.000	His458 (ND1)→Cu1→Cys453	128.677
	His395 (ND1)→Cu1→Cys453 (SG)	126.160	His396 (ND1)→Cu1→Cys453 (SG)	126.462
	His458 (ND1)→Cu1→His395 (ND1)	104.438	His458 (ND1)→Cu1→His396 (ND1)	104.432
T2	His398 (NE2)→Cu4→His64 (NE2)	174.324	His399 (NE2)→Cu4→His66 (NE2)	174.794
T3	His111 (NE2)→Cu2→His400 (NE2)	101.998	His113 (NE2)→Cu2→His401 (NE2)	101.330
	His452 (NE2)→Cu2→His400 (NE2)	101.268	His452 (NE2)→Cu2→His401 (NE2)	100.694
	His111 (NE2)→Cu2→His452 (NE2)	106.002	His113 (NE2)→Cu2→His452 (NE2)	106.416
	His454 (NE2)→Cu3→His66 (ND1)	107.135	His454 (NE2)→Cu3→His68 (ND1)	107.347
	His109 (NE2)→Cu3→His66 (ND1)	125.396	His111 (NE2)→Cu3→His68 (ND1)	125.268
	His454 (NE2)→Cu3→His109 (NE2)	111.511	His454 (NE2)→Cu3→His111 (NE2)	112.384

### 3.3.3. Validación del modelo LaccPost

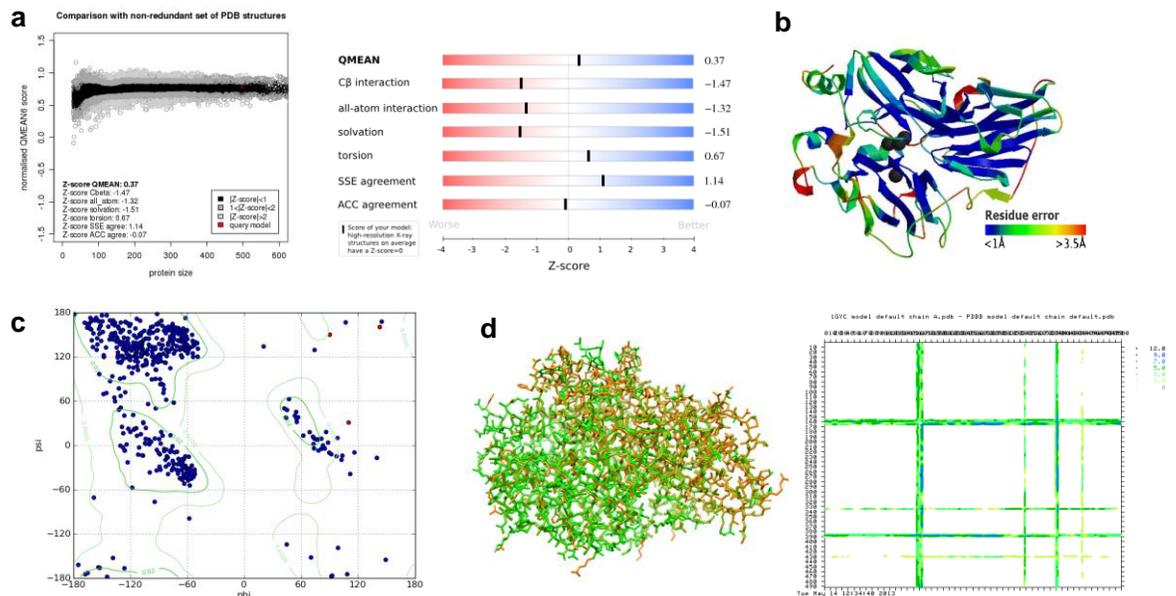
Los valores obtenidos para cada descriptor estructural de QMEAN en la evaluación del modelo se resume en la [Tabla 3.2](#). Con respecto a la estructura secundaria (índice Q3), se obtuvo un valor de 84.9%.

**Tabla 3.2.** Resultados para seis descriptores de QMEAN del modelo obtenido por homología. Los cuatro primeros son valores de energía en  $kJ mol^{-1}$ . El quinto descriptor es el índice Q3 de estructura secundaria, y el último es el porcentaje de accesibilidad que describe qué tan expuesta se encuentra la estructura. Cada descriptor aparece acompañado por un Score-Z.

<i>Descriptor</i>	<i>P. ostreatus</i>	
	Valor	Score-Z
Energía de interacción de C $\beta$	-73.30	-1.47
Energía de interacción de todos los átomos	-9737.41	-1.32
Energía de solvatación	-25.32	-1.51
Energía de los ángulos de torsión	-155.75	0.67
Estructura secundaria	84.9%	1.14
Accesibilidad al solvente	80.8%	-0.07
Puntuación QMEAN	0.797	0.37

Para el modelo de la proteína se obtuvo una puntuación QMEAN de 0.797 respectivamente ([Figura 3.3a](#)). El gráfico de Ramachandran generado con el programa USFC Chimera, mostró que la distribución de la mayoría de los residuos en la estructura ocuparon regiones permitidas ([Figura 3.3c](#)). Algunos residuos que se encontraron fuera de estas regiones corresponden a residuos de glicina y prolina. No obstante, los residuos His166, Leu339 y Thr434 en el modelo, se distribuyeron en regiones no permitidas.

El análisis con SuperPose reveló que el modelo de LaccPost-Stop es similar a la estructura de lacasa de *T. versicolor* 1GYC, aunque existen regiones que presentan diferencias significativas (por encima de 3Å), presentando un RMSD de los backbone de 1.23Å y de todos los átomos de regiones específicas de las dos secuencias de 1.35Å ([Tabla 3.3](#)).



**Figura 3.3.** Validación del modelo computacional. **a.** Gráfica de distribución y de barras del programa QMEAN. La gráfica de distribución muestra la tendencia de las puntuaciones QMEAN de un conjunto de estructuras cristalográficas de alta resolución del PDB. Las gráficas de barras ayudan a identificar valores “buenos” o positivos (azules) y “malos” o negativos (rojos) de cada descriptor. **b.** Diagrama en cintas que muestra un gradiente de color que va del azul al rojo, define regiones con resoluciones entre 1 y 3.5Å respectivamente. Cuando la mayoría de residuos tiende al azul, la estructura es más confiable. **c.** Gráfico de Ramachandran. Se infiere que los residuos de los modelos hacen parte de hojas- $\beta$ , hélices y vueltas- $\beta$  debido a que ocupan las zonas permitidas. Los puntos rojos corresponden a aminoácidos diferentes de glicina y prolina. **d.** Diagrama en palos de los solapamientos entre el modelo y el molde, y matriz *DD* estimado por SuperPose. El modelo de LaccPost-Stop en naranja, la estructura 1GYC en verde. El solapamiento se visualizó usando Chimera y la matriz *DD* muestra la comparación entre las cadenas principales del modelo (eje x) y el molde (eje y), diferencias entre 0 y 1.5Å en blanco, entre 1.5 y 3Å en amarillo, entre 3 y 5Å en verde claro, entre 5 y 7Å en turquesa, entre 7 y 9Å en azul oscuro y por encima de 9Å en negro, es decir mientras más oscuro mayor es la diferencia de distancia entre estructuras.

**Tabla 3.3.** Predicción por VADAR de las características moleculares del modelo.

<i>Característica</i>	<i>P. ostreatus</i>	<i>Valor esperado (VE)</i>
Hélices	31 (6%)	-
Hojas- $\beta$	238 (47%)	-
Coil	227 (45%)	-
Vueltas	136 (27%)	-
Promedio de la distancia de puentes de hidrógeno (Å)	2.1 (ds 0.3)	2.2 (ds 0.4)
Promedio de la energía de puentes de hidrógeno (kJ mol <sup>-1</sup> )	-2.0 (ds 0.9)	-2.0 (ds 0.8)
Número de residuos con enlaces de hidrógeno	323 (65%)	75%
Promedio de hélices ( $\Phi$ )	-65.6° (ds 8.8)	-65.3° (ds 11.9)
Promedio de hélices ( $\Psi$ )	-33.3° (ds 13.8)	-39.4° (ds 25.5)
Promedio ángulo $\omega$ (>90°)	179.6° (ds 2.9)	180° (ds 5.8)
Número de residuos con ángulos $\omega$ <90°	4 (0%)	-
ASA total (Å <sup>2</sup> )	19202.8	17735.3
Peso molecular (kDa)	54.18090	-

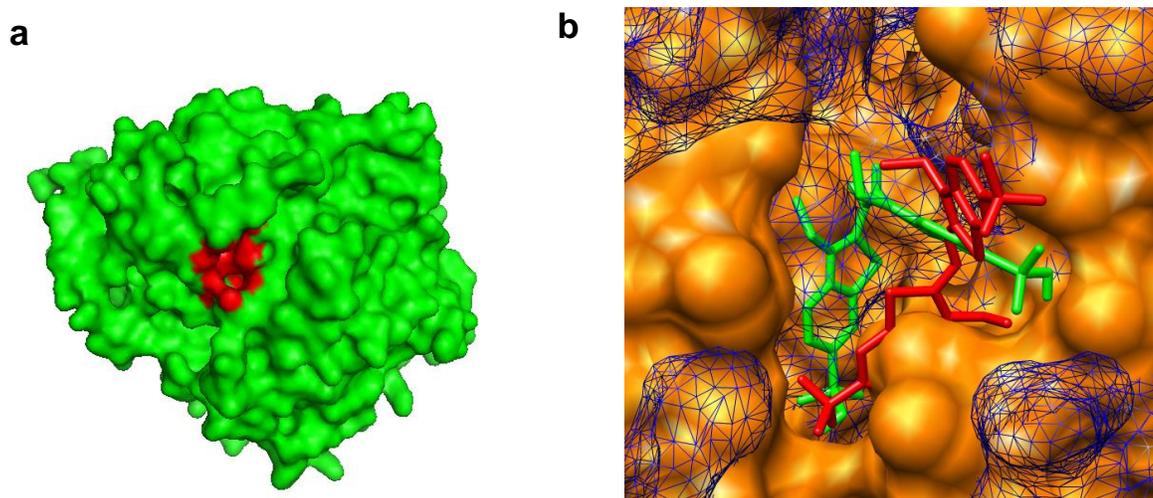
Adicionalmente, el programa NetNGlyc estimó una posición (residuo 436) en la secuencia de LacPost, como un sitio con potencial de ser N-glicosilado.

### 3.3.4. Docking molecular del ligando en el sitio activo del modelo LacPost

CASp estimó 100 bolsillos en la superficie de la molécula modelada y se seleccionó el bolsillo cercano al sitio activo T1 (Figura 3.4a). El bolsillo está constituido por 18 aminoácidos diferentes (Tyr154, Pro165, His166, Pro167, Asp207, Ser208, Asp209, Phe240, Ala241, Asp265, Ser266, Phe392, Ala393, Gly394, Pro395, Pro397, Ile455 y Trp457), ocupando un área de 133.779Å<sup>2</sup>. Y los cluster de aminoácidos que componen el bolsillo de la estructura son en su mayoría hidrofóbicos.

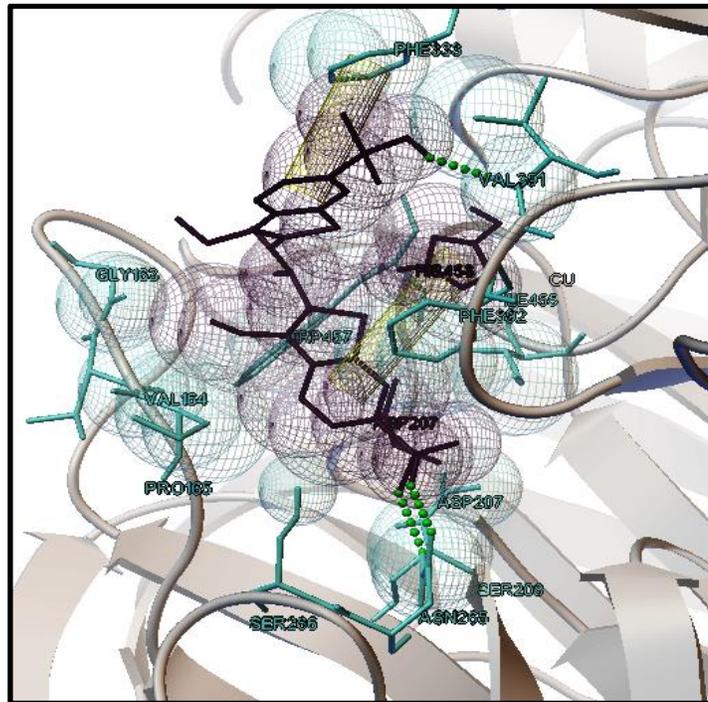
De las 10 salidas distintas de cada simulación de las conformaciones que posiblemente adopta el ABTS en el bolsillo del modelo, ninguna se encuentra por debajo del punto de corte (2Å). Sin embargo, se seleccionó el valor de RMSD más cercano a 3ZDW (lacasa de *Bacillus subtilis* co-cristalizada con ABTS en su estructura). Para el complejo se seleccionó el valor de RMSD (5.618Å) con la grilla de 40<sup>3</sup> puntos y una energía de enlace de -4.15kcal mol<sup>-1</sup>. La comparación

de superficies entre la estructura co-cristalizada y el complejo docking (Figura 3.4b), muestra una diferencia clara de los bolsillos. Donde las diferencias entre las distancias atómicas de la estructura del modelo y 3ZDW genera un patrón diferencial en la topología de la superficie de la lacasa modelada.



**Figura 3.4.** Superficie del bolsillo del sitio activo T1. **a.** Diagrama de superficie del bolsillo del sitio activo T1 de la lacasa LaccPost, visualizado en Chimera. **b.** Comparación de la mejor pose con la estructura co-cristalizada 3ZDW. Se observan las superficies sólidas del LaccPost en color naranja. La superficie en malla y de color azul corresponde a la estructura 3ZDW. El ligando del complejo docking aparece en verde y el de 3ZFW en rojo.

La interacción entre el ABTS y el modelo se generó con los aminoácidos Gly163, Val164, Pro165, Asp207, Ser208, Asn265, Ser266, Val391, Phe333, Phe392, Ile455, Trp457 e His458 de la lacasa LaccPost (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Diagrama en cintas de la interacción del ABTS con el modelo de lacasa LaccPost visualizado en AutoDock. Se observan los radios de Van der Waals de los residuos que interactúan y los radios de ABTS. Las cadenas laterales de los residuos son representadas en modelos de palo y coloreadas en azul claro. El ABTS y los residuos con flexibilidad son los modelos de palo morados. Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  se observan como cilindros amarillos y los puentes de hidrógeno como esferas verdes.

### 3.3.5. Construcción del vector pGAPZ $\alpha$ A-laccPost-Stop y screening de clones para la expresión de las lacasas recombinante

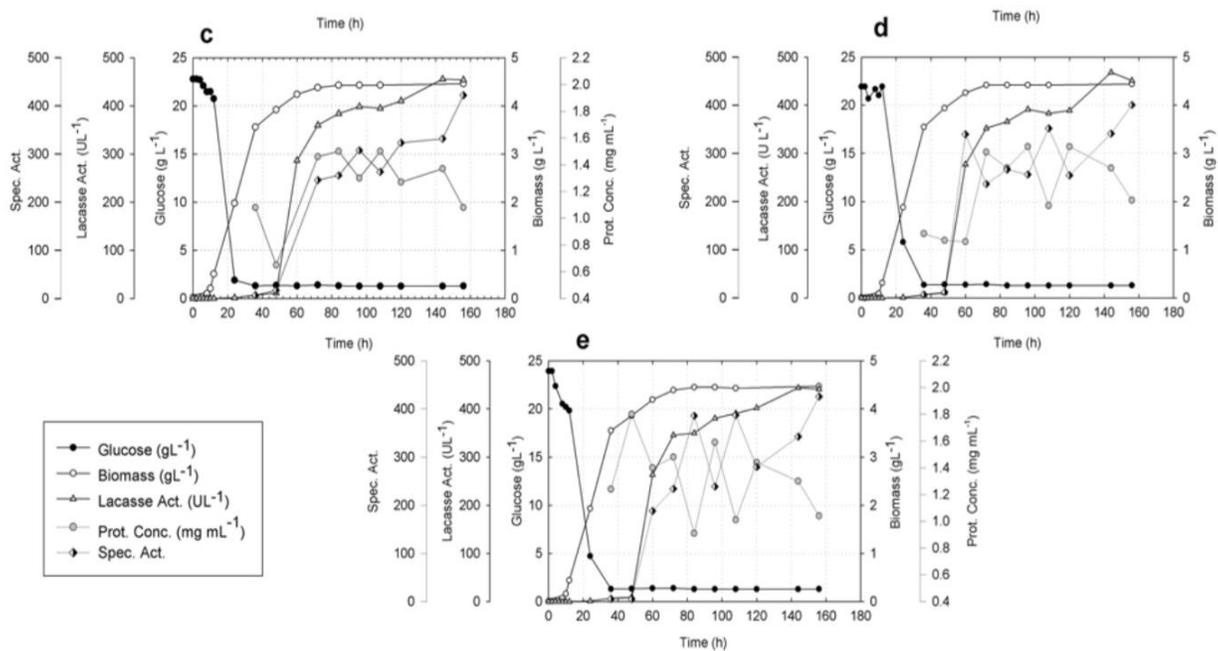
En la [figura 3.1b, c](#) se resumen los resultados del proceso de construcción del vector de expresión pGAPZ $\alpha$ A-laccPost-Stop con la secuencia sintética obtenida luego de la optimización del DNA y con la adición de los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* en los extremos 5' y 3' respectivamente ([Figura 3.1a](#)) y como se puede observar, la talla final del constructo fue de 4646bp.

Después de la electroporación de la levadura *P. pastoris* X-33 se obtuvieron varios clones que mostraron actividad enzimática en caja de Petri con agar YPD suplementado con ABTS y CuSO<sub>4</sub>, donde se observó la formación de un halo verde o púrpura alrededor de las colonias (dependiendo del estado de oxidación del ABTS); revelando la producción de la enzima recombinante activa secretada al medio. Las 3 colonias transformantes que exhibieron la

coloración más intensa fueron seleccionadas para la evaluación preliminar de la producción y evaluación de la enzima recombinante.

### 3.3.6. Estudios preliminares de expresión constitutiva de la lacasa LaccPost

Para este ensayo se utilizaron los 3 clones seleccionados previamente en la transformación, la [figura 3.6](#) y la [tabla 3.4](#) muestran los resultados del comportamiento cinético de los clones estudiados a escala de 100mL.



**Figura 3.6.** Cinética de crecimiento de los clones productores de lacasa. (a) Clon 1 X33/pGAPZ $\alpha$ A-*laccGluc-Stop*. (b) Clon 2 X33/pGAPZ $\alpha$ A-*laccGluc-Stop*. (c) Clon 1 X33/pGAPZ $\alpha$ A-*laccPost-Stop*. (d) Clon 2 X33/pGAPZ $\alpha$ A-*laccPost-Stop*. (e) Clon 3 X33/pGAPZ $\alpha$ A-*laccPost-Stop*.

**Table 3.4.** La tabla muestra los parámetros cinéticos calculados en el estudio cinético de los clones productores de lacasa recombinante (X33/pGAPZ $\alpha$ A-laccPost-Stop).

<i>Constructos y parámetros cinéticos</i>	<i>Número de Clon</i>		
<b>X33/pGAPZ<math>\alpha</math>A-laccPost-Stop</b>	<b>Clon 1</b>	<b>Clon 2</b>	<b>Clon 3</b>
$\mu_{(x)}$ (h <sup>-1</sup> )	0.40	0.54	0.42
td, (h)	1.74	1.29	1.63
P <sub>(x)</sub> (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ), (Tiempo de cálculo h)	0.10 (36)	0.10 (36)	0.10 (36)
P <sub>(Enzyme)</sub> (UL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ), (Tiempo de cálculo h)	5.00 (72)	4.89 (72)	4.80 (72)
Specific Activity, (Tiempo de cálculo h)	422.20 (156)	400.00 (156)	425.69 (156)

### 3.4. Discusión

#### 3.4.1. Optimización y diseño del gen *laccPost-Stop*

A diferencia de la mayoría de los constructos que se utilizan para expresar proteínas recombinantes en *P. pastoris*, en el presente trabajo se empleó el promotor GAP propio de *P. pastoris* X-33 de forma tal que la expresión del gen se llevara a cabo de forma constitutiva. Esta decisión se tomó en función de que las aplicaciones que se buscan a largo plazo con este trabajo son de tipo ambiental, en donde muy seguramente se podría pensar en el uso de reactores con células inmovilizadas de *P. pastoris* recombinante para el tratamiento de efluentes de distinta naturaleza. En este sentido, usando un promotor constitutivo se evita la adición de, por ejemplo, metanol como agente inductor del promotor *AOX1* [26] para la expresión de la lacasa recombinante; siendo un sistema mucho más amigable con el medio ambiente a diferencia de lo que ocurriría con otras construcciones para la expresión de lacasas que ya han sido publicadas [15,16,26]. En el presente estudio, la producción constitutiva está basada en la adición de glucosa como fuente de carbono.

Por otra parte para facilitar la secreción de la proteína al medio de cultivo se seleccionó la secuencia putativa leader del  $\alpha$ -Factor para *P. pastoris* proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual ha funcionado en ocasiones mejor que algunas secuencias nativas de *P. pastoris* como *PHO1* y *SUC2* [22,27,28]; por esta razón, se eliminó la secuencia nucleotídica correspondiente al péptido señal nativo (residuos 1-60). La presencia de la señal de secreción  $\alpha$ -Factor en el vector de expresión, permite que la producción de la enzima recombinante secretada al medio pueda ser evidenciada gracias a la adición de ABTS y CuSO<sub>4</sub>. Haciendo más fácil la selección de las levaduras transformadas. Incluso, en función de la intensidad en la coloración del halo (verde o púrpura), se pueden seleccionar los mejores clones para realizar los ensayos preliminares de expresión en medio líquido.

Aunque *P. pastoris* es un hospedero eficiente para la producción de proteínas recombinantes, el uso de codones sinónimos puede variar considerablemente debido a la preferencia por algunos codones [29], siendo otro aspecto determinante en el proceso de optimización de genes. La presencia de codones raros en los genes expresados de manera heteróloga en *P. pastoris*, podría

limitar al hospedero debido al agotamiento de los ARNt raros; hecho que puede llevar a pausas del ribosoma en el proceso de traducción y por tanto a la disminución en los niveles de expresión de la proteína de interés [30]. Varios autores consideran que la optimización de codones debería mejorar la expresión de genes foráneos incrementando la tasa de traducción [31-34]. Los valores CAI cuantifican el grado en que la tendencia en el uso de codones de un gen se asemeja a la de los genes altamente expresados en el microorganismo hospedero, considerando que en la medida que los valores se acercan a 1 son perfectos para el organismo hospedero [35]. Por otra parte el codón de parada también se cambió para garantizar que la traducción terminara al final del gen y que no se tradujeran los sitios correspondientes al epítipo *myc* y la cola de 6 Histidinas presente corriente abajo del *multicloning site* en el vector de expresión pGAPZ $\alpha$ A.

Así, el uso de genes sintéticos para lacasas, optimizados para el uso de codones en *P. pastoris*, contenido de G-C, elementos reguladores *Cis*, secuencias repetitivas y el péptido señal, podrían incrementar la producción de proteínas heterólogas secretadas al medio de cultivo. Se ha dicho que esta optimización podría resultar en un incremento de 10 a 50 veces en la producción de la proteína de interés [36, 37]. Adicionalmente en la optimización y sin afectar el marco de lectura, se añadieron los sitios de cortes para las enzimas *EcoRI* y *NotI* respectivamente en los flancos 5' y 3' del gen, con el objetivo de facilitar la ligación direccional del fragmento en el vector de expresión (Figura 3.1).

### 3.4.2. Análisis estructural del modelo construido por homología

Un paso importante en la modelación por homología es seleccionar una estructura molde apropiada para la construcción del modelo de la proteína de interés. Hasta el momento, se han determinado por cristalografía varias estructuras de lacasas de hongos [9] y bacterias. Por esta razón, puede considerarse que el modelo propuesto en este trabajo es lo suficientemente exacto ya que supera el porcentaje mínimo de identidad permitido en la construcción de modelos por homología [38]; exhibiendo una arquitectura molecular descrita anteriormente para otras lacasas [9], donde se identifican claramente los tres dominios cupredoxin (Figura 3.2), propios de las proteínas lacasas. La predicción de 3DligandSite y el solapamiento entre el

modelo y el molde fueron lo suficientemente precisos para modelar los iones de cobre que faltaban e incluso los átomos de oxígeno que se coordinan con estos iones (Figura 3.2).

### 3.4.3. Validación del modelo

La validación de un modelo 3D es un paso esencial que puede llevarse a cabo a distintos niveles de la organización estructural para evaluar los parámetros estereoquímicos y la precisión en el plegamiento general. En este sentido, se consideran estructuras altamente confiables cuando los valores del índice Q3 superan el 75% [39], sugiriendo que el modelo obtenido presenta una estructura secundaria precisa. Finalmente, se considera que la estructura presenta accesibilidad al solvente, ya que el valor de accesibilidad supera el 25% [40].

El consenso de los valores de cada descriptor se representa por la puntuación QMEAN; indicando que la estructura tridimensional global del modelo es similar a la forma nativa, debido a que este es el rango de distribución de las estructuras cristalográficas no redundantes (Tabla 3.2, Figura 3.3a).

En el gráfico de Ramachandran se observó que la glicina permite que la proteína gane flexibilidad conformacional al tener en su cadena lateral un hidrógeno, permitiéndole formar giros que pueden ser críticos en comparación al resto de aminoácidos. Por el contrario, la prolina tiene un número limitado de conformaciones, debido a que su nitrógeno (N – C<sub>α</sub>) hace parte de un anillo rígido. Por lo que es común encontrar estos dos residuos fuera de las regiones permitidas en este tipo de análisis. Sin embargo, teniendo en cuenta que estos residuos se encuentran en regiones de coil, es claro y común encontrar flexibilidades atípicas en estos sitios [41].

El análisis con SuperPose reveló que LaccPost presenta un valor de identidad del 60.8% con respecto al molde (Figura 3.3d). Sin embargo, en términos generales, la arquitectura del modelo presenta valores similares a los reportados previamente para otras lacasas [42]. No obstante, el modelo presenta valores ASA grandes (en comparación a los valores VE); demostrando que

pueden existir varias zonas en la proteína con cavidades y bolsillos propias para reacciones enzimáticas [43], (Tabla 3.3).

A través del programa NetNGlyc se encontró en la moécula un contenido de carbohidratos de 3% a 9% [44, 45]. Este porcentaje sumado al peso estimado por VADAR pone de manifiesto que la estructura está incluida dentro del intervalo de peso (50-60kDa) de las lacasas típicas [46].

#### **3.4.4. Docking molecular del ligando en el sitio activo de la lacasa modelada**

Según Cambria *et al.* (2010), las características fisico-químicas encontradas en el bolsillo del modelos LaccPost son propias de los bolsillos catalíticos, y en las lacasas son esenciales para prevenir el contacto del ión metálico con el agua, y para facilitar la interacción de sustratos hidrofóbicos con el centro activo de la enzima. Esta cavidad se forma por una hélice- $\alpha$  y una vuelta- $\beta$  en el dominio D3 (Figura 3.3); característica típica en las lacasas [25,47,48].

Al comparar la superficie entre la estructura co-cristalizada con ABTS (3ZDW) y el complejo docking (LaccPost-ABTS), (Figure 3.4b), se encuentran algunas diferencias; las cuales llevan probablemente a un impedimento estérico por parte de algunos residuos que constituyen el bolsillo en el modelo; haciendo difícil que el ABTS adopte configuraciones más cercanas a las presentes en el complejo 3ZDW (Figure 3.4b), y la energía requerida para generar una interacción interatómica del ABTS con LaccPost, podría explicarse por la irregularidad de su bolsillo.

Cabe resaltar que es posible obtener valores más cercanos al punto de corte aumentando el número de salidas de AutoDock. En estudios previos se ha logrado conseguir RMSD cercanos a 2.2Å entre los complejos de las lacasas de *T. versicolor* y *B. subtilis* [49], pero haciendo uso de otros programas como Gold [50]. No obstante, también es probable que no se alcancen valores cercanos a 2.2Å en el modelo obtenido en el presente estudio, debido a la estructura topológica del bolsillo y a la elevada energía de enlace.

En el modelo obtenido se presentó un mayor número de interacciones con respecto al número de residuos en interacción en el complejo 3ZDW-ABTS (Pro226, Ala227, His319, Cys322, Gly323, His497, Pro384, Arg416 y Gly417), aunque la constitución físico-química de los residuos es similar. Es importante destacar que en la cadena lateral de la lacasa de *B. subtilis*, la interacción con ABTS se genera fundamentalmente con un residuo de histidina (His497) que coordina al cobre T1. Enguita *et al.* (2004), plantean que al trabajar a una resolución baja (2.4Å), no es posible observar qué tipo de interacción se produce entre este residuo y el ABTS. Sin embargo, los residuos equivalentes a la histidina de 3ZDW en los experimentos de docking (His458 en LaccPost), generan interacciones de Van der Waals con el ABTS. Además, en el modelo LaccPost se genera una interacción  $\pi - \pi$  entre el anillo imidazol de His458 con uno de los anillos bencénicos del ABTS. La importancia de este residuo de histidina que coordina al cobre T1, se debe a que funciona como una “puerta” para la transferencia electrónica del ión que coordina [51]; paso fundamental para dar inicio a la degradación del sustrato en el ciclo catalítico de la lacasa.

En la estructura cristalográfica 3ZDW se encontró un patrón para el ABTS, y es que el colorante es embebido a la mitad por la lacasa y que uno de los anillos tiazolina se dispone relativamente perpendicular al grupo imidazol de His497. Además, los anillos tiazolina se acomodan en posición *trans*, favoreciendo la transferencia electrónica [52]. En el complejo docking se observa el patrón de perpendicularidad, pero con isomería *cis* (Figura 3.5). Al parecer el ABTS no puede adoptar la posición *trans* en el modelos, debido al impedimento estérico que generan algunos de los residuos que conforman el bolsillo (Figura 3.4b).

En la lacasa de *B. subtilis* se forma un puente disulfuro entre las Cys229 y Cys322, donde uno de los grupos sulfonato del ABTS tiende a hacer contacto con el puente y un átomo de oxígeno del sulfonato forma un puente de hidrógeno con Gly323 [52]. En el modelo docking, los puentes disulfuro están alejados del sitio de enlace T1, por lo que el contacto del grupo sulfonato no es posible. El puente de hidrógeno se produce entre los oxígenos del sulfonato y otros residuos diferentes a glicina, Ser208, Asn265 y Val391. Aunque los resultados obtenidos en el modelo difieren notablemente de los obtenidos por Enguita *et al.* (2004); cabe resaltar que

las formas de interacción de las lacasas son muy diferentes en especies bacterianas y fúngicas debido a que presentan diferencias de tamaño y conformación. Prasad *et al.* (2012), reportan interacciones de puentes de hidrógeno entre un residuo de asparagina de la lacasa de *P. cinabarinus* con los oxígenos del sulfonato del ABTS y configuraciones *cis* de los anillos de tiazolina; configuraciones que resultan semejantes a lo observado en el complejo LaccPost-ABTS (Figura 3.5).

#### **3.4.5. Construcción del vector pGAPZ $\alpha$ A-laccPost-Stop y screening de clones para la expresión de la lacasa recombinante**

El análisis por restricción mostró que el constructo obtenido contenía la secuencia de interés *in frame* con la dirección de la transcripción y corriente abajo del péptido señal, gracias a la correcta inserción usando los sitios de restricción *EcoRI* y *NotI* en los extremos 5' y 3' incluidos respectivamente en los flancos del gen (Figura 3.1b,c).

#### **3.4.6. Estudios preliminares de expresión constitutiva de la lacasa LaccPost**

El gen sintético para la lacasa LaccPost, se expresó en la levadura *P. pastoris*, bajo el control del promotor constitutivo GAP de la Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa y de la secuencia señal  $\alpha$ -factor para la secreción de la proteína recombinante.

En la figura 3.6 se puede observar que la tendencia en la cinética de los 3 clones recombinantes portadores de los genes sintéticos de la lacasa de *P. ostreatus* (laccPost-Stop) fue bastante similar, con una producción máxima promedio de biomasa de  $4.45 \pm 0.017 \text{ gL}^{-1}$  a las 156h de cultivo; y se obtuvo un promedio de actividad lacasa de  $451.08 \pm 6.46 \text{ UL}^{-1}$  entre las 144 y las 156h de cultivo. Coherentemente la actividad específica máxima de la enzima en estos 3 clones se produjo a las 156h con un valor promedio de  $416.14 \pm 13.64 \text{ UL}^{-1}\text{mg}^{-1}$  de proteína extracelular. En la tabla 3.4, se muestran los parámetros cinéticos calculados en los ensayos preliminares de expresión y corroboran la tendencia similar entre los 3 clones en cuanto al crecimiento; así como las diferencias en cuanto a la actividad enzimática.

Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad enzimática de los clones X33/pGAPZ $\alpha$ A-*laccPost-Stop* se encuentran relacionados con las características estructurales y topológicas del bolsillo catalítico de la enzima. Donde las interacciones de Van der Waals y las interacciones  $\pi - \pi$  que se forman en el complejo LaccPost-Stop-ABTS (Figuras 3.4 y 3.5), favorecen la afinidad adecuada por el sustrato.

En el presente trabajo sólo se determinó la actividad enzimática y no se tuvo en cuenta la concentración de la enzima específica a través de un ELISA, lo que permitiría cuantificar también la enzima inactiva. Tampoco se cuantificó el mRNA específico a través de qPCR, lo que permitiría determinar la expresión de los genes; ambos aspectos podrían estar influenciando la expresión, por lo que la actividad enzimática detectada en los clones podría no ser coherente con la expresión. En este sentido ya se dio inicio al proceso de estandarizar una qPCR para analizar la expresión del gen sintético y correlacionarla con la concentración de enzima producida y la actividad biológica, dicho proceso forma parte de otro trabajo derivado del presente estudio.

Finalmente en este estudio se demostró que el trabajo computacional de optimización del gen *POXA 1B* de *P. ostreatus*, resultó favorable para lograr la expresión constitutiva bajo la regulación del promotor GAP y el leader del factor  $\alpha$  en *Pichia pastoris*. Se propuso y se validó el modelo computacional 3D de la enzima y se observó que el modelo propuesto para LaccGluc-Stop es muy similar a la estructura 3D (obtenida por cristalografía) de la lacasa de *T. versicolor* 1GYC. Al analizar la interacción del modelo con el ABTS a través de docking molecular se evidenció la interacción del centro activo de la enzima con el sustrato (ABTS); es claro entonces que de manera inmediata los estudios de optimización de medio y condiciones de cultivo deberán incidir positivamente en el comportamiento cinético de los clones, la expresión y en la actividad biológica de la lacasa recombinante.

### 3.5. Conclusiones

La lacasa “ideal” debería cumplir con una serie de características como el (i) amplio rango de especificidad de sustrato, (ii) un elevado potencial redox, (iii) una alta tolerancia a la inactivación a causa de radicales o solventes orgánicos, (iv) estabilidad a diferentes pH y temperaturas y (v) bajos costos de producción. Desafortunadamente, no existe una lacasa “universal” que por si sola cumpla con todos los criterios, a pesar de que actualmente existen lacasas producidas de forma heteróloga y con propiedades mejoradas. Por esta razón es importante continuar con la búsqueda y caracterización de nuevos sistemas de expresión heteróloga de lacasas.

Con base en la secuencia de lacasa sintética, fue posible predecir la estructura tridimensional de esta proteína. El modelo estimado exhibe una estructura similar a la lacasa convencional. Las evaluaciones del modelo mostraron que la estructura del mismo no está lejos de las resueltas por cristalografía de rayos X, y además, la gran mayoría de los ángulos dihedrales que se producen entre los residuos están correctamente dispuestos. La similitud estructural entre el modelo de *G. lucidum* y la lacasa de *T. versicolor* es más alta que la del modelo de *P. ostreatus*, debido a una identidad mayor que estas estructuras conservan.

La geometría del bolsillo entre los modelos es diferente, pero se constituyen generalmente de amino ácidos hidrofóbicos que favorecen la interacción con sustratos y protegen al ión metálico del contacto con agua. El acoplamiento de ABTS no estuvieron por debajo del punto de corte, probablemente por el impedimento estérico que genera parte de los residuos del bolsillo de enlace y la asimetría que presenta el modelo con la estructura de *B. subtilis*. Las interacciones entre el modelo y el ABTS son disimiles a las reportadas en la estructura experimental. El patrón de perpendicularidad del anillo tiazolina del ABTS con respecto a la histidina que coordina al cobre T1 en el modelo, se predijo en los complejos docking. Este patrón apoya la idea de que es posible una transferencia electrónica en la lacasa de *P. ostreatus*, debido a que la histidina funciona como una “puerta” para el pasaje de electrones al cobre T1.

Estos resultados son importantes a la luz de la utilidad de los sistemas de expresión de enzimas recombinantes en las nuevas tecnologías amigables con el ambiente. Ya que las lacasas de los

hongos de podredumbre blanca tienen un gran potencial biotecnológico debido al amplio rango de sustratos que pueden transformar. Incluyendo compuestos fenólicos difíciles de degradar, mediante el uso de mediadores redox de origen natural o sintético. Y adicionalmente, estas lacasas podrían usarse en casi todos los procesos de manufactura relacionados con los la industria papelera: producción de pulpa, blanqueamiento libre de cloro, o en el tratamiento de los efluentes que se generan.

En la industria forestal, las lacasas se pueden usar para el diseño de material lignocelulósico con nuevas propiedades, como incrementar la resistencia mediante la adición de compuestos fenólicos en reacciones mediadas por lacasas. Este tratamiento puede mejorar la adhesión de las piezas de madera gracias a la acción enzimática "*in situ*" sobre la lignina, sin ser necesario el uso de adhesivos tóxicos derivados del formaldehído. Adicionalmente, las lacasas juegan un rol importante en otros campos como en la industria de procesamiento de alimentos, bebidas o panadería; incluso son empleadas en la industria textil para la detoxificación de efluentes coloreados o en procesos de blanqueamiento. En la industria nanobiotecnológica se han usado en el desarrollo de biosensores para uso clínico y ambiental en la detección de fenol, oxígeno, azida, morfina, codeína, flavonoides o catecolaminas. Tienen también aplicaciones en el desarrollo de biopilas como combustible, ofreciendo electricidad y reduciendo el empleo de combustibles fósiles, mediante la inmovilización de lacasas en el cátodo. Aspectos determinantes para concluir que el uso de lacasas de origen fúngico o recombinantes pueden contribuir en una amplia variedad de productos y en diversos aspectos del sector productivo: industria, uso clínico y químico, y en aplicaciones ambientales.

### 3.6. Referencias

1. Velu C, Veeramani E, Suntharam S, Kalimuthu K (2011) Insilico screening and comparative study on the effectiveness of textile dye decolourization by crude laccase immobilised alginate encapsulated beads from *Pleurotus Ostreatus*. Journal Bioprocessing & Biotechniques 1: art. 1000109.
2. Forgacs E, Cserhádi T, Oros G (2004) Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. Environment International 30: 953-971.
3. Pedroza AM, Mosqueda R, Alonso-Vante N, Rodríguez-Vázquez R (2007) Sequential treatment via *Trametes versicolor* and UV/TiO<sub>2</sub>/RuxSey to reduce contaminants in waste water resulting from the bleaching process during paper production. Chemosphere 67: 739-801.
4. Fernández JA, Henao LM, Pedroza-Rodríguez AM, Quevedo-Hidalgo B (2009) Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. Revista Colombiana de Biotecnología XI: 59-72.
5. Henao-Jaramillo LM, Fernández-González JA, Quevedo-Hidalgo B, Florido-Cuellar AE, Pedroza-Rodríguez AM (2011) Use of a non-conventional biological system and advance oxidation process with TiO<sub>2</sub>/UV to the discoloration od reactive black 5. International Biotechnology Color Journal 1: 9-19.
6. Loera Corral O, Pérez Pérez MC, Barbosa Rodríguez I, Ricardo J, Villaseñor Ortega F (2006) Laccases. In: Guevara-González RG, Torres-Pacheco I, editors. Advances in Agricultural and Food Biotechnology. Kerala, India: Research Signpost. pp. 323-340.
7. Sakurai T, Kataoka K (2007) Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. Cellular and Molecular Life Sciences 64: 2642 – 2656.
8. Ruiz-Deñas FJ, Martínez ÁT (2009) Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. Microbial Biotechnology 2: 164–177.
9. Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, et al. (2013) Fungal laccases. Fungal Biology Reviews 27: 67-82.
10. Yu G, Wen X, Li R, Qian Y (2006) In vitro degradation of a reactive azo dye by crude ligninolytic enzymes from nonimmersed liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium*. Process Biochemistry 41: 1987-1993.
11. Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V, Giovanni S (2010) Heterologous laccase production and its role in industrial applications. Bioengineered Bugs 1: 252-262.
12. Córdoba-Ruiz HA, Poutou-Piñales RA, Echeverri-Peña OY, Algecira-Enciso NA, Landázuri P, et al. (2009) Laboratory scale production of the human recombinant iduronate 2-sulfate sulfatase-Like from *Pichia pastoris*. African Journal of Biotechnology 8: 1786-1792.
13. Landázuri P, Poutou-Piñales RA, Acero-Godoy J, Córdoba-Ruiz HA, Echeverri-Peña OY, et al. (2009) Cloning and shake flask expression of hrIDS-Like in *Pichia pastoris*. African Journal of Biotechnology 8: 2871-2877.
14. Blevé G, Lezzi C, Mita G, Rampino P, Perrotta C, et al. (2008) Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. Applied Microbiology and Biotechnology 79: 731-741.

15. Huifang X, Li Q, Wang M, Zhao L (2013) Production of a recombinant laccase from *Pichia pastoris* and biodegradation of chlorpyrifos in a laccase/vanillin system. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 864-871.
16. Sun J, Peng R-H, Xiong A-S, Tian Y, Zhao W, et al. (2012) Secretary expression and characterization of a soluble laccase from the *Ganoderma lucidum* strain 7071-9 in *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports* 39: 3807–3814.
17. Guo M, Lu F, Du L, Pu J, Bai D (2006) Optimization of the expression of a laccase gene from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 848-852.
18. Theerachat M, Emond S, Cambon E, Bordes F, Marty A, et al. (2012) Engineering and production of laccase from *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 125: 267-274.
19. Piscitelli A, Giardina P, Mazzoni C, Sannia G (2005) Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 428-439.
20. Robert V, Mekmouche Y, Pailley PR, Tron T (2011) Engineering laccases: In search for novel catalysts. *Current Genomics* 12: 123-129.
21. Rodgers CJ, Blanford CF, Giddens SR, Skamnioti P, Armstrong FA, et al. (2010) Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends in Biotechnology* 28: 63-72.
22. Barragán CE, Sáenz H, Poutou RA, Córdoba H, Mercado M, et al. (2005) Influencia del  $\alpha$ -factor sobre la expresión de IDShr en *Pichia pastoris*: revisión sistemática de literatura y análisis computacional. *NOVA* 3: 80-91.
23. Bulter T, Alcalde M, Sieber V, Meinhold P, Schlachtbauer C, et al. (2003) Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 987–995.
24. Huang H, Yang P, Luo H, Tang H, Shao N, et al. (2008) High-level expression of a truncated 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by optimization of codons and fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 95-103.
25. Piontek K, Antorini M, Choinowski T (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 7663–37669.
26. Poutou-Piñales RA, Córdoba-Ruiz HA, Barrera-Avellaneda LA, Delgado-Boada JM (2010) Carbon source feeding strategies for recombinant protein expression in *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. *African Journal of Biotechnology* 9: 2173-2184.
27. Poutou RA (2006) Expresión de sulfatasas humanas en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris* [Tesis Doctoral]. Bogotá, D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. 162 p.
28. Romanos M (1995) Advances in the use of *Pichia pasrtoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 527-533.
29. Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T (1999) Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases; its status 1999. *Nucleic Acids Research* 27: 292.
30. Brandes HK, Hartman FC, Lu T-YS, Larimer FW (1996) Efficient expression of the gene for spinach phosphoribulokinase in *Pichia pastoris* and utilization of the recombinant

- enzyme to explore the role of regulatory cysteinyl residues by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 6490–6496.
31. Woo JH, Liu YY, Mathias A, Stavrou S, Wang Z, et al. (2002) Gene optimization is necessary to express a bivalent anti-human anti-T cell immunotoxin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 25: 270–282.
  32. Yadava A, Ockenhouse CF (2003) Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Infection and Immunity* 71: 4961-4969.
  33. Gurkan C, Ellar DJ (2003) Expression in *Pichia pastoris* and purification of a membrane-acting immunotoxin based on a synthetic gene coding for the *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa1 toxin. *Protein Expression and Purification* 29: 103-116.
  34. Gurkan C, Ellar DJ (2005) Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories* 4.
  35. Sharp PM, Li WH (1997) The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias and its potential applications. *Nucleic Acid Research* 15: 1281-1295.
  36. Outchkourov NS, Stiekema WJ, Jongsma MA (2002) Optimization of the expression of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 24: 18-24.
  37. Sinclair G, Choy F (2002) Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 26: 96-105.
  38. Baker D, Sali A (2001) Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294: 93-96.
  39. Jones DT (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology* 292: 195-202.
  40. Cheng J, Randall Z, Sweredoski M, Baldi P (2005) SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Research* 33: 72–76.
  41. Helles G, Fonseca R (2009) Predicting dihedral angle probability distributions for protein coil residues from primary sequence using neural networks. *BMC Bioinformatics* 10: 1-8.
  42. Prasad NK, Vindal V, Narayana SL, V. R, Kunal SP, et al. (2011) In silico analysis of *Pycnoporus cinnabarinus* laccase active site with toxic industrial dyes. *Journal of Molecular Modeling*: 1-7.
  43. Willard L, Ranjan A, Zhang H, Monzavi H, Boyko RF, et al. (2003) VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Research* 31: 3316–3319.
  44. Ko E-M, Leem Y-E, Choi HT (2001) Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 98-102.
  45. Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, et al. (1997) A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 31301–31307.
  46. Baldrian P (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215-242.
  47. Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI (2007) “Blue” laccases. *Biochemistry (Moscow)* 72: 1136-1150.

48. Cambria M, Marino D, Falconi M, Garavaglia S, Cambria A (2010) Docking simulation and competitive experiments validate the interaction between the 2,5-Xylidine inhibitor and *Rigidoporus lignosus* laccase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 27: 501-509.
49. Suresh PS, Kumar A, Kumar R, Singh VP (2008) An Insilco approach to bioremediation: Laccase as a case study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 26: 845-849.
50. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD (2003) Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 52: 609-623.
51. Bertrand T, Jolivald C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, et al. (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41: 7325-7333.
52. Enguita FJ, Marcal D, Martins L, Grenha R, Henriques A, et al. (2004) Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 23472-23476.
53. Grigoriev IV, Nordberg H, Shabalov I, Aerts A, Cantor M, et al. (2012) The genome portal of the department of energy joint genome institute. *Nucleic Acids Research* 40: d26-d32.
54. Joo SS, Ryu IW, Park J-K, Yoo YM, Lee D-H, et al. (2008) Molecular cloning and expression of a laccase from *Ganoderma lucidum*, and its antioxidative properties. *Molecules and Cells* 25: 112-118.
55. Kelley L, Sternberg M (2009) Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4: 363-371.
56. Wass MN, Kelley LA, Sternberg MJE (2010) 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic Acids Research* 38: W469-W473.
57. Finn RD, Tate J, Mistry J, Coghill PC, Sammut SJ, et al. (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 36: D281-D288.
58. Punta M, Coghill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, et al. (2012) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 40: D290-D301.
59. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, et al. (2004) UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25: 1605-1612.
60. Benkert P, Tosatto SCE, Schomburg D (2008) QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins* 71: 261-277.
61. Benkert P, Schwede T, Tosatto SC (2009) QMEANclust: estimation of protein model quality by combining a composite scoring function with structural density information. *BMC Structural Biology* 9: 35.
62. Zárata-Bonilla LJ, del Portillo P, Sáenz-Suárez H, Janneth G-S, Barreto-Sampaio GE, et al. (2014) Computational modeling and preliminary *iroN*, *fepA*, *cirA* gene expression in *Salmonella* Enteritidis under iron deficiency induced conditions. *Poultry Science* 93: 221-230.
63. Maiti R, Domselaar G, Zhang H, Wishart D (2004) SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Research* 32: 590-594.
64. Wang Y, Xiao J, Suzek TO, Zhang J, Wang J, et al. (2009) PubChem: a public information system for analyzing bioactivities of small molecules. *Nucleic Acids Research* 37: W623-W633.

65. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, et al. (2009) AutoDock4 and AutoDocktools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 30: 2785–2791.
66. Dundas J, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y, et al. (2006) CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Research* 34: W116–W118.
67. Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA (2006) Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 25: 247–260.
68. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2100 p.
69. Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R (2001) Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology* 32: 331-335.
70. Plummer DT (1981) *Introducción a la Bioquímica Práctica*. Bogotá: McGraw -Hill.
71. Miller G (1959) Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
72. Poutou-Piñales RA, Vanegas Niño A, Landázuri P, Sáenz H, Lareo L, et al. (2010) Human sulfatase transiently and functionally active expressed in *E. coli* K12. *Electronic Journal of Biotechnology* 13: article 8.
73. Doran PM (1998) *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. Zaragoza, España: Acribia S. A. 468 p.

## CAPÍTULO 4.

# MEJORAMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO, PRODUCCIÓN A BAJA ESCALA Y CARACTERIZACIÓN DE LA LACASA RECOMBINANTE POXA 1B EXPRESADA EN *Pichia pastoris*

#### 4.1. Introducción

Las lacasas (EC1.10.3.2) son un tipo de glicoproteínas multi-cobre azules, enzimas oxidoreductasas, capaces de catalizar la reacción de formación de moléculas de agua a partir de la reducción del oxígeno molecular. Las lacasas muestran un rango extraordinario de degradación de sustratos naturales como fenoles, polifenoles, anilinas, arildiaminas, metoxifenoles, hidroxiindoles, bencenotioles, orgánicos e inorgánicos [1,2] y algunos iones de naturaleza metálica, en la presencia de un mediador como el ABTS [2, 20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] [3,4].

Se ha demostrado que en la naturaleza, ciertos organismos tienen la capacidad de sintetizar este tipo de enzimas, los insectos por ejemplo utilizan las lacasas durante el proceso de esclerotización para la síntesis de la cutícula epidermal; las bacterias para el proceso de morfogénesis, homeostasis del cobre, biosíntesis de pigmentos y formación de esporas; los hongos (Ascomycetos, Basidiomycetos) para la producción de esporas, formación de cuerpos fructíferos y patogénesis de plantas [5]. En los hongos, las lacasas están encargadas de una gran variedad de funciones fisiológicas, como son, morfogénesis, defensa, interacciones patógeno/hospedero con plantas y degradación de lignina [6]. En general las lacasas de hongos son proteínas globulares monoméricas de aproximadamente 60 a 70 kDa con puntos isoeléctricos (pI) ácidos, cerca de pH 4; sin embargo, existen muchas excepciones. La mayoría de las lacasas de hongos son enzimas glicosiladas extracelulares, dichas glicosilaciones se encuentran en un rango de 10 a 25% y en algunos casos pueden estar por encima de 30% del peso molecular [7].

Se han propuesto un gran número de aplicaciones para las lacasas en diversos sectores industriales, como son, textil, alimentos, papel y pulpa, farmacéutico, químico, nanobiotecnológico, cosmético. Además, de otros relacionados con biorremediación. Actualmente estas enzimas tienen mucho potencial como catalizadores biológicos y son de gran importancia en la industria biotecnológica. Debido a sus características, las lacasas pueden decolorar colorantes sintéticos de aguas residuales provenientes de la industria textil como la antraquinona, azo [8,9], triarilmetanos, índigos carmín [10,11], trifenilmetanos [12], neolanos [13] y otros colorantes como el remazol azul brillante en presencia de mediadores orgánicos

[14]. Majeau *et al.*, (2010) encontraron que algunos compuestos fenólicos o xenobióticos podían ser eliminados de las aguas provenientes de la industria química [15]. García *et al.*, (2011), también pudieron oxidar y remover la oxybenzona de efluentes primarios provenientes de los productos del cuidado personal y farmacéuticos añadiendo mediadores sintéticos [16]. Otra aplicación importante en la industria de las lacasas es el blanqueamiento de la pulpa en la fabricación del papel [17], donde se ha encontrado que las lacasas provenientes de *Trametes versicolor* y *Pycnoporus cinnabarinus* en presencia de 1-Hidroxibenzotriazole (HBT) mostraron un eficiente blanqueamiento de alta calidad de la pulpa del papel, pudiendo sustituir los reactivos químicos basados en compuestos clorhinados que se usan en la actualidad.

Las lacasas secretadas de fuentes nativas generalmente no son adecuadas para su obtención a gran escala, esto se debe principalmente a los bajos rendimientos de producción y los altos costos de los procedimientos de preparación y purificación; sin embargo, la expresión heteróloga permite obtener rendimientos altos y producir lacasas en mayor cantidad para aplicaciones industriales. La expresión de proteínas recombinantes en hospederos de fácil cultivo y manejo, permite obtener una alta productividad y reduce los costos de producción. La versatilidad y las posibilidades de escalado en la producción de proteínas recombinantes abren nuevas oportunidades comerciales para sus usos industriales [18]. Con el fin de producir mayores cantidades de proteína de alta pureza, recientemente se ha llevado a cabo la expresión de genes recombinantes de lacasas, en hospederos heterólogos, como son, *Saccharomyces cerevisiae* [19], *Pichia pastoris* [20,21], *Pichia methanolica* [22], *Yarrowia lipolytica* [23,24] y *Trichoderma reesei* [25].

*Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica que ha sido capaz de expresar varias proteínas recombinantes [1,26-28]. Su principal ventaja en la producción de proteínas heterólogas es que el cultivo de *P. pastoris* es de fácil implementación y genera gran cantidad de masa celular [29]. Esta levadura se ha utilizado en los últimos años como sistema de expresión de proteínas recombinantes debido a que presenta ventajas como el realizar la maduración de proteínas y la expresión extracelular. Para la industria sería de gran utilidad e importancia la producción a gran escala de esta enzima, pues permitiría la obtención de grandes cantidades de proteínas recombinantes, a un bajo costo y con una producción consistente [30].

El uso de diferentes promotores para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, ha estado acompañado de grandes esfuerzos buscando las condiciones óptimas de pH, temperatura, concentración de recursos de carbono y medios de cultivo apropiados que optimicen las condiciones en estos sistemas de expresión [31]. Bajo el promotor de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) existen un gran número de reportes orientados hacia la optimización de las condiciones de cultivo; hacia 1997 Jonsson, *et al.*, mejoraron la actividad de la lacasa lcc1 de *T. versicolor* con medios tamponados [32], Hong *et al.*, (2002) también mejoraron el rendimiento de la actividad de esta misma enzima disminuyendo la temperatura de cultivo a 20°C e induciendo el promotor AOX 1 con concentraciones de metanol inferiores al 1% (v/v) [33]. Otro parámetro importante para la industria es el medio empleado para la producción de la enzima. O'Callaghan, *et al.*, (2012) describieron un nuevo medio de cultivo para la expresión de una lacasa recombinante de *T. versicolor* manteniendo el pH del cultivo con la adición de alanina; evitando así la neutralización periódica [3]. Colao *et al.*, (2006) también encontraron que al suplementar los medios de cultivo con casaminoácidos podían incrementar la producción enzimática y podían disminuir así los tiempos de producción [34]. También se ha reportado que la actividad lacasa está influenciada por la concentración de cobre (Cu<sup>+2</sup>) suministrada en el cultivo [3]; situación que en la actualidad ha llevado a suplementar los medios de cultivo con CuSO<sub>4</sub> en diferentes concentraciones desde 0.1 mM a 0.5 mM según la cepa y el promotor utilizado.

Las lacasas han sido expresadas en levaduras metilotróficas, utilizando diferentes promotores y obteniendo resultados interesantes. Sin embargo, en la actualidad es poco lo que se reporta en la expresión de lacasas recombinantes heterólogas en *P. pastoris* utilizando el promotor de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAP). Se ha demostrado que la glucosa como fuente de carbono es adecuada para la producción constitutiva de lacasas; contrario al glicerol o la maltosa [35]. Kittl *et al.*, (2012) encontraron que utilizando el promotor constitutivo GAP de *P. pastoris* se mejoró la expresión de la enzima lacasa BaLac comparada con la expresión bajo el promotor inducible AOX1 [36].

En este trabajo se llevó a cabo la optimización de los factores: concentración de nitrógeno y tipo de fuente (orgánica o inorgánica), concentración de carbono (glucosa), concentración de

cobre, transferencia de oxígeno, tiempo de cultivo y porcentaje de inóculo, con el objetivo de aumentar la actividad específica de la lacasa recombinante POXA IB de *P. ostreatus* a baja escala de producción, así como la concentración del sobrenadante y la caracterización cinética de dicho sobrenadante, conteniendo la enzima.

## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1. Cepa

Se empleó la cepa de *Pichia pastoris* X33 conteniendo el vector de expresión pGAPZ $\alpha$ A-*LaccPost-Stop* (Clon 1) que contiene el gen *POXA* 1B sintético previamente optimizado que codifica para una lacasa de *Pleurotus ostreatus*; la cual se encontraba previamente conservada en medio YPG (1% (p/v) extracto de levadura, 2% (w/v) peptona, 2% (p/v) glucosa) suplementado con glicerol al 20% (v/v) a -80°C [20,55].

### 4.2.2. Preparación del inóculo

Se tomaron viales del Banco de Células Primario (MCB), [56], del clon 1 de la cepa *Pichia pastoris* X33/pGAPZ $\alpha$ A-*LaccPost-Stop*; una vez descongelados fueron inoculados en tubo de vidrio con tapa de rosca con 5mL de medio estéril YPG suplementado con 40 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de zeocina (Z) y se incubaron a 30°C, durante toda la noche a 180rpm. Posteriormente se inocularon dos Erlenmeyers de 500mL con 100mL (VET, volumen efectivo de trabajo) de medio YPG-Z fresco y se cultivó a las mismas condiciones durante 12 horas. El cultivo resultante fue verificado por Tinción de Gram para descartar la presencia de morfologías contaminantes y sirvió de inóculo para los diseños factoriales.

### 4.2.3. Diseño experimental Plackett-Burman (PBED)

En este diseño se evaluaron 7 factores con dos niveles cada uno, así: volumen de medio (150 y 300mL), concentración de CuSO<sub>4</sub> (0.1 y 1.0mM), porcentaje de inóculo (2 y 10% (v/v)), concentración de glucosa (10 y 30gL<sup>-1</sup>), concentración de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> (5 y 20mM), concentración de peptona (10 y 20gL<sup>-1</sup>) y concentración de extracto de levadura (5 y 10gL<sup>-1</sup>), (Tabla 4.1). En el diseño se incluyó un punto central que fue evaluado tres veces; los valores incluidos en el punto central fueron (volumen de medio 225mL, concentración de CuSO<sub>4</sub> 0.55mM, porcentaje de inóculo 6% (v/v), concentración de glucosa 20gL<sup>-1</sup>, concentración de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 12.5mM, concentración de peptona 15gL<sup>-1</sup> y concentración de extracto de levadura 7.5gL<sup>-1</sup>) [57].

**Tabla 4.1.** Factores y sus respectivos niveles para la evaluación de la respuesta en actividad lacasa del PBED.

<i>Código</i>	<i>Factor</i>	<i>Nivel bajo (-1)</i>	<i>Nivel (0)</i>	<i>Nivel alto (+1)</i>
A	Volume del medio de cultivo (mL)	150.00	225.00	300.00
B	CuSO <sub>4</sub> (mM)	0.10	0.55	1.00
C	Inóculo (5 v/v)	2.00	6.00	10.00
D	Glucosa (gL <sup>-1</sup> )	10.00	20.00	30.00
E	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> (mM)	5.00	12.50	20.00
F	Peptona (gL <sup>-1</sup> )	10.00	15.00	20.00
G	Extracto de levadura (gL <sup>-1</sup> )	5.00	7.50	10.00

Para un total de 16 corridas (12 tratamientos, 1 punto central el cual fue ensayado por triplicado).

#### 4.2.4. Diseño experimental One Factor (OFED)

Para este diseño se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en el diseño experimental Plackett-Burman, en función del factor que resultó significativo y con un porcentaje de contribución importante sobre la actividad enzimática del cultivo [57].

**Nota:** En los dos diseños experimentales utilizados se evaluó en función del tiempo, la actividad enzimática (UL<sup>-1</sup>), la concentración de proteínas (mg mL<sup>-1</sup>), la concentración de glucosa (gL<sup>-1</sup>), la actividad específica (UL<sup>-1</sup> mg mL<sup>-1</sup>) y la productividad (UL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) basada en la actividad enzimática [20]. Para el análisis estadístico, la variable de respuesta utilizada fue la actividad enzimática (UL<sup>-1</sup>). Todos los ensayos de mejoramiento estadístico se realizaron en Erlenmeyers de 500 mL a 30°C y 180 r.p.m., siempre en el mismo shaker, durante 168 h de cultivo a pH variable partiendo en 7 ± 0.2. El software Design Expert (V. 9.0) fue utilizado tanto para planear el diseño experimental como para el análisis de los resultados. El software Sigma Plot (V.11.0) fue utilizado para graficar las cinéticas y los resultados de la purificación.

#### 4.2.5. Concentración del sobrenadante

Se utilizó el extracto crudo del cultivo (1.08mg mL<sup>-1</sup> de proteínas y 451.08 ± 6.46UL<sup>-1</sup> de actividad enzimática, con actividad específica de 417.66UL<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>), que mostró los mayores valores de actividad enzimática con el sustrato ABTS bajo las condiciones obtenidas en el trabajo previo [20]. Para la concentración del sobrenadante se empleó la metodología descrita

previamente para las lacasas nativas de *Trametes pubescens* [58]. Brevemente, el cultivo se centrifugó a 8000g y 4°C y el sobrenadante se filtró de forma seriada a través de papel Whatman No. 1, y membranas de 0.45 y 0.22µm (Pall Corp, Port Washington, NY USA). El filtrado fue concentrado por ultrafiltración empleando una membrana de celulosa regenerada de 10kDa (Millipore, Billerica, MA, USA). El retenido (aprox. 20mL) fue conservado para la determinación de la actividad lacasa (UL<sup>-1</sup>) [59] y SDS-PAGE [60].

#### **4.2.6. Caracterización del sobrenadante concentrado**

##### **4.2.6.1. SDS-PAGE e identificación funcional de la enzima**

Para la evaluación del peso molecular aproximado, se corrió un SDS-PAGE, (12% w/v), [60]. El concentrado fue visualizado en el gel por tinción con nitrato de plata usando el sistema SilverXpress® Silver Staining Kit (Life Technologies™, USA). El zimograma fue corrido en native-PAGE (12% w/v, en condiciones no desnaturizantes). La actividad o funcionalidad del concentrado fue visualizado en el gel por tinción con 0.5M de ABTS. En ambos casos se utilizó como marcador de peso molecular BenchMark™ Pre-Stained Protein Standard (Life Technologies™, USA) y como control la lacasa Lac® (Sigma-Aldrich®).

##### **4.2.6.2. Estabilidad a temperatura**

La estabilidad térmica del sobrenadante concentrado se determinó incubando durante 1 hora a temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70°C; posteriormente se realizó la determinación de la actividad lacasa residual en las condiciones estándar del ensayo. Todas las determinaciones se realizaron al menos 3 veces.

##### **4.2.6.3. Estabilidad a pH**

Para determinar la estabilidad a pH, el sobrenadante concentrado se incubó previamente durante 1 hora a 25°C en ausencia de sustrato, usando buffer Britton-Robinson [61] con valores de pH en un rango de 2-10 ± 0.2, luego se determinó la actividad lacasa residual en las condiciones estándar del ensayo. Todas las determinaciones se realizaron al menos 3 veces.

#### 4.2.6.4. Constantes cinéticas

Las constantes cinéticas del sobrenadante concentrado conteniendo la enzima se investigaron usando ABTS como sustrato en un rango de concentraciones entre 0.1-1mM, a intervalos de 0.1mM, en buffer acetato de sodio 600mM, pH 4.5. En todos los ensayos se colocaron 800 $\mu$ l de concentrado, con 10.6UL<sup>-1</sup> de actividad enzimática. Los ensayos fueron llevados a cabo a una temperatura de 25°C. Después de ajustar la hipérbola usando la ecuación de Michaelis-Menten la  $K_m$  y la  $V_{max}$  se calcularon siguiendo el método de linealización de Lineweaver-Burk [54] con la ayuda del Software SIMFIT (V5.40, 2003), [62]. Todos los ensayos cinéticos se realizaron al menos 3 veces.

#### 4.2.7. Técnicas analíticas

##### 4.2.7.1. Determinación de la concentración de azúcares reductores totales residuales

Se determinó la concentración de azúcares reductores totales residuales en cada una de las muestras (por triplicado). Para esto se utilizó la técnica de ácido 3,5 dinitrosalicílico [63]. Para esta determinación se preparó una curva de patrón que osciló entre 0.1 y 2g L<sup>-1</sup> de D-glucosa y que respondió a la (Ecuación X).

$$y = 0.6181x - 0.048; \quad R^2 = 0.9984 \quad (X)$$

##### 4.2.7.2. Determinación de la concentración de proteínas totales extracelulares

Se determinó la concentración de proteínas extracelulares totales en cada una de las muestras (por triplicado), utilizando la técnica de Biuret [64]. Para esta determinación se preparó una curva de patrón que osciló entre 0.5 y 5mg mL<sup>-1</sup> de BSA (Albúmina Sérica Bovina), la cual respondió a la (Ecuación XI).

$$y = 0.0761x + 0.004; \quad R^2 = 0.9997 \quad (XI)$$

#### 4.2.7.3. Determinación de actividad enzimática

La actividad enzimática fue monitoreada por el cambio en la absorbancia a 436nm ( $\epsilon_{436}=29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) debido a la oxidación del ABTS en un tampón acetato de sodio 60mM (pH  $4.5 \pm 0.2$ ). Se usaron 800 $\mu\text{L}$  de extracto crudo a temperatura ambiente, 100 $\mu\text{L}$  (600 mM) de tampón acetato de sodio y 100 $\mu\text{L}$  (5mM) de ABTS como sustrato. La formación de un radical catiónico verde fue evaluada espectrofotométricamente durante 3 minutos. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para permitir la oxidación de 1 $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto. La solución blanco contenía 800 $\mu\text{L}$  de agua destilada, 100 $\mu\text{L}$  (600 mM) de tampón acetato de sodio y 100 $\mu\text{L}$  (5 mM) de ABTS. La actividad enzimática se expresó en  $\text{UL}^{-1}$  [59].

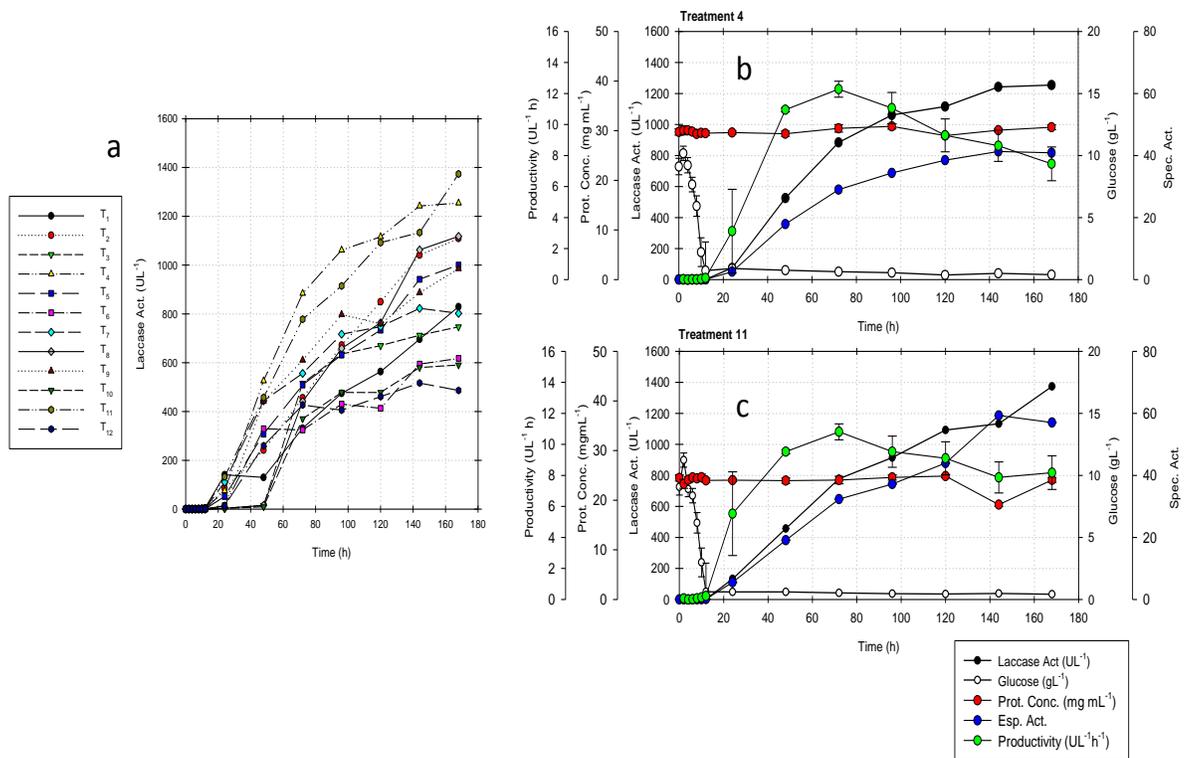
La actividad específica se calculó dividiendo la actividad enzimática obtenida en cada hora de muestreo del cultivo por la concentración total de proteínas (Ecuación VI, Capítulo 3).

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Diseño estadístico

##### 4.3.1.2. Diseño experimental Plackett-Burman (PBED)

Este diseño se empleó para evaluar el *main effect* de los diferentes factores ensayados sobre la actividad enzimática extracelular. La figura 1 muestra los resultados en cuanto a actividad enzimática de cada tratamiento y destaca los dos tratamientos ( $T_4$  y  $T_{11}$ ) que sobrepasaron las  $1200 \text{ UL}^{-1}$  de actividad enzimática.



**Figura 4.1.** Diseño experimental Plackett-Burman (PBED). **a.** Resultados de actividad enzimática de los tratamientos ensayados. **b.** resultados del tratamiento 4 [PBED-T<sub>4</sub>: Erlenmeyer de 500mL (150mL de medio, 10% (v/v) inóculo, 1.0 mM CuSO<sub>4</sub>, 10gL<sup>-1</sup> glucosa, 20 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 20gL<sup>-1</sup> peptona, 10gL<sup>-1</sup> extracto de levadura), Act. Enz.  $1254.27 \pm 0.371 \text{ UL}^{-1}$  en 168h de cultivo] **c.** Resultados del tratamiento 11 [PBED-T<sub>11</sub>: Erlenmeyer de 500ml (300mL de medio, 10% (v/v) inóculo, 1.0 mM CuSO<sub>4</sub>, 10gL<sup>-1</sup> glucosa, 5 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 10gL<sup>-1</sup> peptona, 10gL<sup>-1</sup> extracto de levadura), Act. Enz.  $1373.72 \pm 0.371 \text{ UL}^{-1}$  en 168h de cultivo].

En  $T_{11}$  la actividad enzimática sobrepasó las  $451.08 \pm 6.46 \text{ UL}^{-1}$  (resultados obtenidos en el trabajo previo [20]), a partir de las 72 horas de cultivo y la tendencia fue similar para la

actividad específica (Figura 4.1c), por tal motivo se analizaron los resultados estadísticos a las 72, 96, 120, 144 y 168 h de cultivo (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Análisis de varianza de la actividad lacasa en distintos tiempo. El siguiente ANOVA se realiza para responder la búsqueda jerárquica del efecto principal de las variables.

<i>Análisis estadístico del modelo (ANOVA)</i>										
<b>Parámetros estadísticos y cinéticos</b>	<b>Adj.</b>	<b>Unadj.</b>								
<b>Tiempo respuesta (h)</b>	72		96		120		144		168	
Model p-value	<b>0.0069</b>	<b>0.0097</b>	<b>0.0235</b>	<b>0.0228</b>	<b>0.0161</b>	<b>0.0259</b>	<b>0.0076</b>	<b>0.0246</b>	<b>0.0058</b>	<b>0.0158</b>
Model F-value	6.94	6.01	4.73	4.61	5.94	4.9	7.54	5.00	8.16	5.8
Lack of Fit p-value	<b>0.0427</b>	<b>0.0359</b>	0.263	0.2605	0.3496	0.2832	0.4692	0.3002	0.5641	0.4022
Lack of Fit F-value	9.920	11.200	2.32	2.35	1.76	2.18	1.27	2.06	1.00	1.53
Curvature p-value	0.1189		0.2778		0.0766		0.0173		0.0276	
R-Squared		0.6003		0.5356		0.4298		0.4346		0.4718
Adj. R-Squared		0.5004		0.4195		0.3421		0.3476		0.3905
Pred. R-Squared		0.2262		0.11		0.1336		0.1774		0.2325
Adeq. Precision		8.448		7.402		5.821		5.960		6.424
Difference between R-Squared and Adj. R-Squared		0.10		0.12		0.09		0.09		0.08

Adj.: Modelo ajustado a la curvatura. Proporciona al modelo factoriaal los coeficientes que se obtendrían al no tener puntos centrales.

Unadj.: Modelo No ajustado a la curvature. Valores significativos en negrilla.

La [tabla 4.3](#) muestra la influencia de los diferentes factores sobre la actividad enzimática después de aplicar un modelo jerárquico; lo cual significó que los factores A, B, D, E y F fueron descartados por el modelo. La ecuación polinómica que representa la actividad lacasa fue la [Ecuación XII]:

$$\text{Enz. Act.}_{168h} = 975.36 + 152.02 \times C + 148.75 \times G \quad (\text{XII})$$

**Tabla 4.3.** Efecto y porcentaje de contribución de los factores evaluados sobre la actividad lacasa obtenida en el PBED.

<i>Factor</i>	<i>Efecto</i>	<i>Porcentaje de Contribución</i>
A-Volumen medio de cultivo	116.33	3.54
B- CuSO <sub>4</sub>	-14.79	0.057
<b>C-Inóculo</b>	<b>304.04</b>	<b>24.17</b>
D-Glucosa	-11.95	0.037
E-NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	19.62	0.1
F-Peptona	18.2	0.087
<b>G-Extracto de Levadura</b>	<b>297.5</b>	<b>23.14</b>

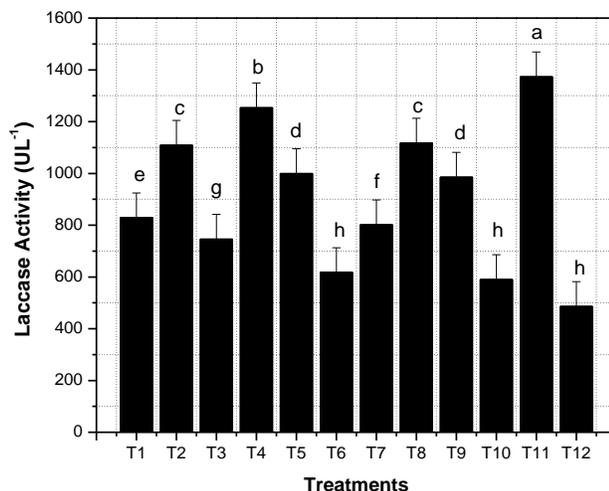
La [tabla 4.4](#) muestra la comparación entre los resultados de actividad enzimática observada y las actividades enzimáticas predichas por el modelo.

**Table 4.4.** Matriz de comparación para los datos observados en el PBED y los resultados predichos como consecuencia de los factores que tienen influencia sobre la actividad lacasa.

<i>T<sub>x</sub></i>	<i>Tipo de Factor</i>	<i>Volumen medio de cultivo (mL)</i>	<i>CuSO<sub>4</sub> (mM)</i>	<i>Inóculo (% v/v)</i>	<i>Glucosa (gL<sup>-1</sup>)</i>	<i>NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> (mM)</i>	<i>Peptona (gL<sup>-1</sup>)</i>	<i>Yeast extract (gL<sup>-1</sup>)</i>	<i>Enz Act. Observada (UL<sup>-1</sup>) 168h</i>	<i>Enz Act. Predicha (UL<sup>-1</sup>) 168h</i>
T <sub>1</sub>	Factorial	150	1	10	30	5	10	5	829.351	978.633
T <sub>2</sub>	Factorial	300	0.1	10	30	20	10	5	1109.21	978.633
T <sub>3</sub>	Factorial	300	1	2	30	20	20	5	746.587	674.595
<b>T<sub>4</sub></b>	<b>Factorial</b>	<b>150</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>1254.27</b>	<b>1276.13</b>
T <sub>5</sub>	Factorial	300	0.1	10	30	5	20	10	1000.00	1276.13
T <sub>6</sub>	Factorial	150	1	2	30	20	10	10	617.747	972.092
T <sub>7</sub>	Factorial	150	0.1	10	10	20	20	5	802.048	978.633
T <sub>8</sub>	Factorial	150	0.1	2	30	5	20	10	1117.75	972.092
T <sub>9</sub>	Factorial	300	0.1	2	10	20	10	10	985.495	972.092
T <sub>10</sub>	Factorial	300	1	2	10	5	20	5	590.444	674.595
<b>T<sub>11</sub></b>	<b>Factorial</b>	<b>300</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>1373.72</b>	<b>1276.13</b>
T <sub>12</sub>	Factorial	150	0.1	2	10	5	10	5	486.348	674.595
	Punto Central	225	0.55	6	20	12.5	15	7.5	1151.88	975.363
	Punto Central	225	0.55	6	20	12.5	15	7.5	1275.6	975.363
	Punto Central	225	0.55	6	20	12.5	15	7.5	1339.59	975.363

En negrilla los mejores tratamientos

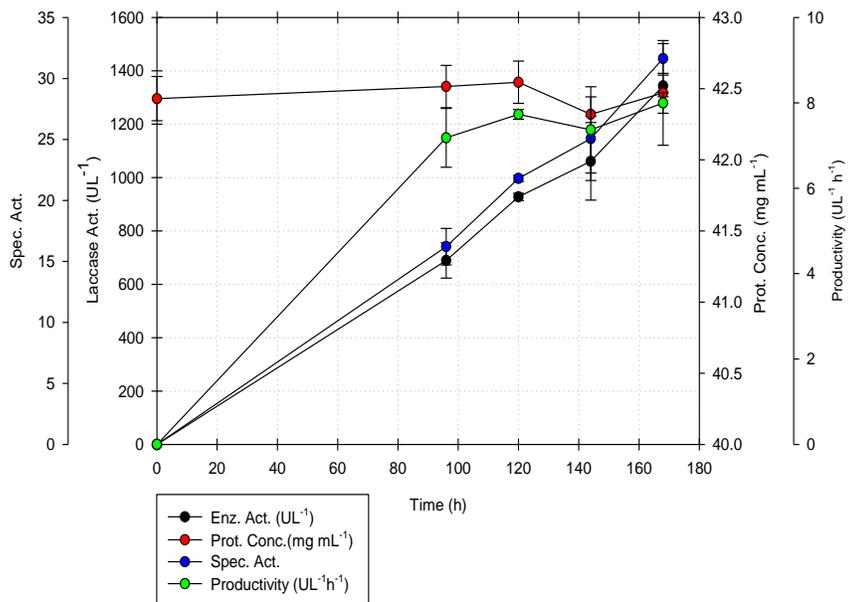
La [Figura 4.2](#) muestra la comparación de medias entre los tratamientos incluidos en el PBED.



**Figura 4.2.** Comparación de medias entre los tratamientos. Gráfico de comparación de medias entre los 12 tratamientos incluidos en el PBED. El gráfico muestra la agrupación de los tratamientos con los valores de actividad enzimática (UL<sup>-1</sup>) más cercanos (si los hay). (a) para el tratamiento 11, (b) para el tratamiento 4, (c) para los tratamientos 2 y 8, (d) para los tratamientos 5 y 9, (e) para el tratamiento 1, (f) para el tratamiento 7, (g) para el tratamiento 3 y (h) para los tratamientos 6, 10 y 12.

#### 4.3.1.3. Diseño experimental One Factor (OFED)

De los ensayos realizados, el nivel (-1) con 10gL<sup>-1</sup> de extracto de levadura se obtuvo una actividad lacasa de  $961.43 \pm 72.4$  UL<sup>-1</sup>; en el punto central con 15gL<sup>-1</sup> se obtuvo la mayor actividad lacasa ( $1343.52 \pm 40.3$  UL<sup>-1</sup>) y en el nivel (1) con 20gL<sup>-1</sup> de extracto de levadura una actividad lacasa de  $1251.37 \pm 30.65$  UL<sup>-1</sup>, a las 168h horas de cultivo. La [figura 4.3](#) muestra la cinética del nivel (0) con 15gL<sup>-1</sup>. Es importante destacar que la concentración de glucosa inicial (10gL<sup>-1</sup>) se agotó en las primeras 12 horas de cultivo para los tres ensayos.



**Figura 4.3.** Diseño experimental One Factor (OFED). Resultados cinéticos (sólo se hicieron determinaciones a las 0, 96, 120, 144 y 168 horas de cultivo) del nivel (0) [OFED-15gL<sup>-1</sup> de yeast extract: Erlenmeyer de 500 mL (300 mL de medio, 10% (v/v) inóculo, 1.0 mM CuSO<sub>4</sub>, 10gL<sup>-1</sup> glucosa, 20 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 20gL<sup>-1</sup> peptona, 15gL<sup>-1</sup> extracto de levadura), Act. Enz. 1343.52 ± 40.3 UL<sup>-1</sup> en 168h de cultivo].

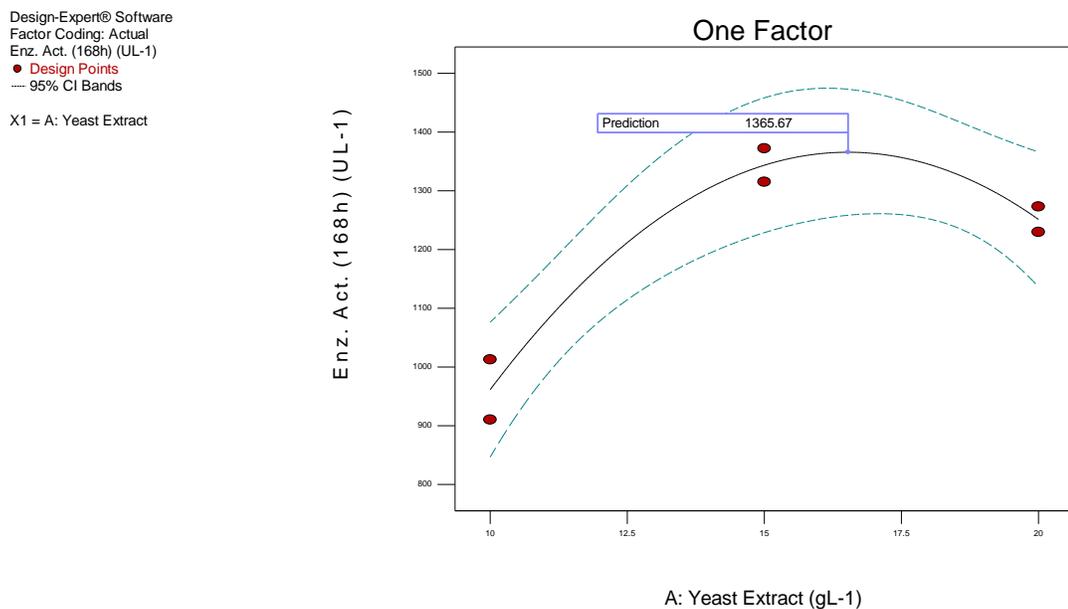
La [tabla 4.5](#) muestra los resultados del One Factor design. Como se puede observar el modelo cuadrático fue significativo.

**Tabla 4.5.** Análisis de varianza de la actividad lacasa producto de la influencia de las diferentes concentraciones de extracto de levadura evaluadas en el Diseño Experimental One Factor (OFED).

<i>Recurso</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>df</i>	<i>Media Cuadrática</i>	<i>Valor-F</i>	<i>Valor-p</i>
					<b>Prob &gt; F</b>
Model	1.59E+08	2	79512.89	30.56	<b>0.0101</b>
<i>A</i> -Yeast Extract	90185.85	1	90185.85	34.66	<b>0.0098</b>
<i>A</i> <sup>2</sup>	74965.36	1	74965.36	28.81	<b>0.0127</b>
Pure Error	7805.45	3	2601.82		
Cor Total	1.67E+08	5			
R-Squared	0.9532				
Adj. R-Squared	0.9220				
Pred. R-Squared	0.8129				
Adeq. Precision	10.593				

En negrilla los valores significativos

La [figura 4.4](#) muestra los resultados experimentales del Diseño Experimental One Factor y la predicción realizada por el modelo cuadrático, la cual predice que a una concentración de  $16.529 \text{ gL}^{-1}$  de extracto de levadura (1.529g más) y manteniendo el resto de factores fijos (300 mL de medio, 10% (v/v) inóculo, 1.0 mM  $\text{CuSO}_4$ ,  $10 \text{ gL}^{-1}$  glucosa, 20 mM  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ,  $20 \text{ gL}^{-1}$  peptona, en 168h de cultivo), se podría lograr una actividad enzimática de  $1365.672 \text{ UL}^{-1}$ , a las 168h de cultivo con una deseabilidad de 0.986; lo que significaría un incremento de sólo  $22.152 \text{ UL}^{-1}$  en relación a la actividad obtenida experimentalmente.

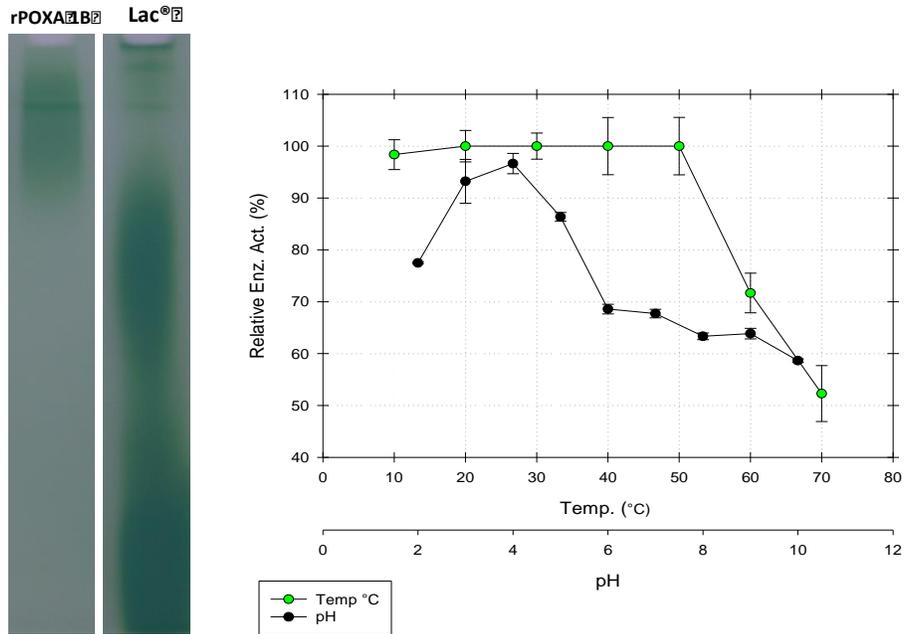


**Figura 4.4.** Resultados del One Factor Design (OFD). Muestra el efecto de las diferentes concentraciones de extracto de levadura, sobre la actividad lacasa y la predicción del modelo a una concentración de  $16.529 \text{ gL}^{-1}$  de extracto de levadura no ensayada experimentalmente.

### 4.3.2. Caracterización del sobrenadante concentrado

#### 4.3.2.1. Identificación funcional de la enzima

La [figura 4.5](#) muestra la identificación funcional de la lacasa mediante zimograma (native-PAGE) usando ABTS como revelador.



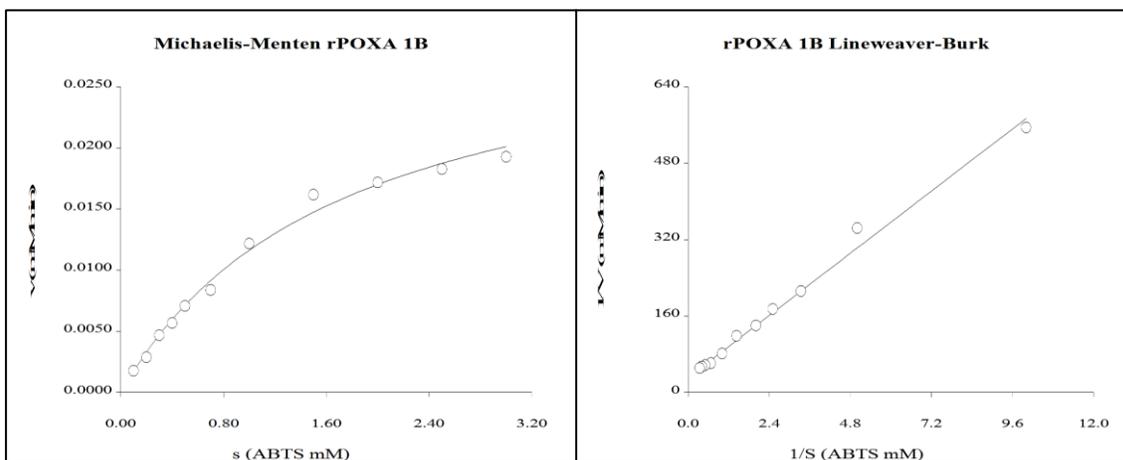
**Figura 4.5.** Identificación funcional de la enzima recombinante POXA 1B en el sobrenadante concentrado. **A.** Zimograma (native-PAGE 12% w/v), revelada con 0.5M ABTS, para la identificación funcional de la enzima rPOXA 1B, como control se empleó la enzima Lac®: *Sigma-Aldrich® Laccase*. **B.** Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática relativa del sobrenadante concentrado con la lacasa POXA 1B de *P. ostreatus* expresada en *P. pastoris* X33. La estabilidad fue evaluada usando ABTS como sustrato y todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

#### 4.3.2.2. Estabilidad a temperatura y pH

La actividad relativa del sobrenadante concentrado, donde se encuentra la lacasa POXA 1B recombinante, después de la exposición durante 1 hora a diferentes temperaturas y pHs se presenta en la [figura 4.5](#).

#### 4.3.2.3. Caracterización cinética del sobrenadante concentrado

Los parámetros cinéticos del sobrenadante concentrado de la lacasa recombinante POXA 1B para la oxidación del ABTS usando diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0 mM) se muestran en la [figura 4.6](#). Donde también se aprecian los valores para la velocidad máxima de la reacción a las condiciones de ensayo ( $V_{max}$ ) y la afinidad por el sustrato o Constante de Michaelis ( $K_M$ ).



Parámetros Cinéticos	SEM	Límite de confianza 95%	P
$V_{\max}$ (mM m <sup>-1</sup> )	3.163 x 10 <sup>-2</sup>	0.00114	0.0290
$K_m$ (mM)	1.720	0.121	1.44

$V_{\max}$  = velocidad máxima de la reacción,  $K_M$  = Constante de Michaelis.

**Figura 4.6.** Resultados cinéticos del sobrenadante concentrado, conteniendo la enzima POXA 1B recombinante. **A.** Gráfico de Michaelis-Menten. **B.** Gráfico de linealización por el método de Lineweaver-Burk. Los datos de la  $K_M$  y  $V_{\max}$  se encuentran tabulados en la parte inferior.

## 4.4. Discusión

### 4.4.1. Diseño experimental Plackett-Burman (PBED)

Como se observa en la [figura 4.1](#), todos los tratamientos superaron las  $451.08 \pm 6.46 \text{ UL}^{-1}$  de actividad enzimática obtenidas a las 156 horas en el trabajo previo [20]. Los tratamientos T<sub>4</sub> y T<sub>11</sub> fueron los más promisorios sobrepasando las 1200  $\text{UL}^{-1}$ ; siendo T<sub>11</sub> el que logró a las 168 h la actividad lacasa superior con  $1373.72 \pm 0.371 \text{ UL}^{-1}$ , lo que significa un aumento de 3.05 veces la actividad enzimática con relación al trabajo previo [20]. Sin embargo, la productividad (basada en la actividad enzimática) de los dos tratamientos seleccionados es superior a las 72 horas, siendo 12.277 para T<sub>4</sub> y 10.808 para T<sub>11</sub> ([Figura 4.1b,c](#)).

En este tipo de diseño estadístico, el ANOVA se presenta en dos vías, con la información del punto central (curvatura) separado del modelo de regresión (ajustado) y con los puntos centrales incluidos en el modelo de regresión (no ajustado). Si la curvatura es significativa, el diseño se debe aumentar usando una herramienta de diseño para añadir corridas que puedan estimar los términos cuadráticos. Por otra parte, si la curvatura no es significativa, los modelos ajustados y no ajustados serían similares (asumiendo que el modelo es significativo y la pérdida de ajuste no significativa) y cualquiera de los dos puede usarse para la predicción.

En el modelo ajustado (Adj.), el modelo factorial se aumenta con coeficientes para ajustarla media a la curvatura. Proporcionando los coeficientes del modelo factorial que se obtendrían en el caso de no contar con los puntos centrales en el diseño experimental. Adicionalmente, el modelo separa los problemas debidos a la curvatura, de los causados cuando el modelo no encaja en los puntos factoriales. En este caso, el modelo es apropiado para realizar diagnósticos o predicciones. Sin embargo, si la curvatura es significativa y la pérdida de ajuste es insignificante, el modelo podría ser utilizado para predecir sólo los puntos factoriales, pero no cualquiera de los otros puntos.

En el caso del modelo no ajustado (Unadj.) los coeficientes del modelo factorial se ajustan utilizando los datos (incluyendo los puntos centrales); este es el modelo de regresión más usual. En donde, si la curvatura es significativa, la predicción de los puntos factoriales sería parcialmente más alta o más baja por la información adicional suministrada por los puntos centrales. En tal caso, debido a que los coeficientes cuadráticos necesarios para modelar la

curvatura no pueden distinguirse entre sí, la curvatura no podría modelarse y la suma de cuadrados (SS) de la curvatura se incluye en la SS de la pérdida de ajuste. Finalmente, si la curvatura es significativa, este modelo no sería el apropiado para realizar una predicción.

Como se observa en la [tabla 4.2](#), el modelo jerárquico fue significativo en todas las horas analizadas tanto para el modelo ajustado a la curvatura como para el no ajustado; sin embargo a las 72 horas aunque la productividad (basada en la actividad enzimática) fue mayor ([Figura 4.1b, c](#)), el Lack of Fit  $p$ -valor fue significativo también, por lo cual quedó descartada esta hora para continuar el análisis. Al comparar el resto de horas, la [tabla 4.2](#) muestra que el Modelo  $p$ -valor más significativo se obtuvo a la hora 168, el Lack of Fit  $p$ -valor fue uno de los más insignificantes, así como la diferencia entre el  $R^2$  y el  $R^2$  ajustado fue la menor. Por esta razón se seleccionó la hora 168 para analizar el efecto principal de los factores sobre la actividad enzimática.

En este sentido, a las 168 h el valor F del modelo de 5.80 implica que el modelo es significativo y que existe sólo un 1.58% de oportunidad que el valor F sea más grande debido al ruido en la experimentación. La falta de ajuste del valor F de 1.53 implica que no es significativa en relación con el error puro y que existe 40.22% de oportunidad que el valor F de que la pérdida de ajuste sea grande debido al ruido generado en los experimentos; por lo tanto, una falta de ajuste no significativa es positiva para el modelo.

Por otro lado el  $R^2$  predicho de 0.2325 está de acuerdo con el  $R^2$  ajustado de 0.3905, debido a que la diferencia es más baja que 0.2 y la precisión Adeq. (mide la relación señal por ruido), en el que una mayor proporción de 4 es deseable, presentó una proporción de 6.424; indicando una señal adecuada y que este modelo puede utilizarse para navegar por el espacio del diseño.

Valorando los resultados de la [tabla 4.3](#) para continuar con el mejoramiento del medio se deberían mantener fijos los siguientes factores así: A en 300 mL, B en 0.1 mM, D en 10 gL<sup>-1</sup>, E en 20 mM y F en 20 gL<sup>-1</sup>. Los factores C y G tuvieron un efecto positivo con 24.17 y 23.14% de contribución respectivamente; lo que significa que en el próximo diseño experimental de mejoramiento se deberían ensayar concentraciones superiores. Sin embargo, para el factor C (Inóculo) ya se ensayó 10% (v/v), lo que significarían 30 mL para el próximo diseño

experimental; en este sentido en la escala en que se están haciendo los ensayos, aumentar el tamaño del inóculo no sería práctico, por lo cual, se decidió dejar el factor C fijo en 10% (v/v) a pesar de ser significativo.

Como se puede observar en la [tabla 4.4](#), la predicción para T<sub>11</sub> no supera los resultados obtenidos; en el caso de T<sub>4</sub> la predicción supera ligeramente el valor de actividad enzimática observado pero tampoco alcanza a superar el valor observado para T<sub>11</sub>. Al quedar sólo el factor G como significativo (Yeast Extract) con un porcentaje de contribución del 23.14 % se decidió realizar un diseño estadístico de tipo One Factor con tres niveles 10, 15 y 20 gL<sup>-1</sup> (-1, 0, +1), por duplicado, con el objetivo de tratar de mejorar la actividad enzimática.

#### 4.4.2. Diseño experimental One Factor (OFED)

Al comparar los resultados de actividad enzimática de los tres niveles de extracto de levadura ensayados en el OFED, es claro que la concentración de 15gL<sup>-1</sup> fue la más favorable ([Figura 4.3](#)). Pese a que, los resultados de actividad enzimática obtenidos con 15 y 20 gL<sup>-1</sup> de extracto de levadura son muy similares a los obtenidos en los tratamientos T<sub>4</sub> y T<sub>11</sub> del PBED, así como a la predicciones de este modelo, es importante destacar que se logró optimizar después del PDEB la composición del medio de cultivo pues se logró disminuir la concentración de CuSO<sub>4</sub> (importante para la actividad biológica de la enzima), se logró aumentar la concentración de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> (importante como fuente de nitrógeno inorgánico) y se logró aumentar las concentraciones de peptona y extracto de levadura (ambos importantes como fuente nitrógeno orgánico), así como incrementar el volumen de medio en el frasco agitado, lo que está relacionado con la disminución de la superficie de transferencia de oxígeno.

Varios aspectos de nuestros resultados llaman la atención de manera particular, *i*) el medio optimizado requiere menor concentración de fuente de carbono, lo que es extraño pues más carbono generaría más biomasa *ii*) el medio optimizado requiere un aumento en el volumen de medio; lo que se traduce en una reducción de la superficie de transferencia de oxígeno, y podría significar que el clon requiere una K<sub>La</sub> menor, y *iii*) todo lo anterior contrasta con el hecho de que el promotor GAP (constitutivo) es el que está gobernando la expresión del gen sintético optimizado de la lacasa POXA 1B de *Pleurotus ostreatus* [20]; lo que sugiere que la enzima debería producirse como un metabolito primario y no como uno secundario ([Figura](#)

4.1b,c). El agotamiento de la glucosa en el OFED fue similar, lo que confirma nuestra observación.

En este sentido algunos autores coinciden con nuestros hallazgos y plantean que la expresión de genes bajo el pGAP no ocurre completamente de manera constitutiva y que puede estar regulada bajo ciertas condiciones. Kern *et al.*, (2007) estudiaron la expresión de una oxidasa alternativa fusionada a la GFP bajo el control del pGAP. Dentro de los resultados encontrados, resaltan que la fluorescencia por parte de la GFP se incrementó de manera considerable luego de que se agotara la glucosa en el medio de cultivo, mientras que de manera transitoria se observó también la producción de pequeñas cantidades de etanol, fenómeno que también ha sido planteado en otras investigaciones [38,39]. Si bien es cierto que hasta el momento no existen reportes que describan de manera detallada el mecanismo por el cual se presenta este fenómeno, los autores plantean que no consideran que exista una influencia directa de una actividad oxidasa alternativa en los transportadores de hexosas, y sugieren que es más razonable que un estado alterado de energía en las células lleve a un aumento en la captación de glucosa y por ende, que la tasa de crecimiento celular aumente [37]. En este orden de ideas, para nuestro caso particular, existe la posibilidad de que una menor superficie para la transferencia de oxígeno, relacionada con el aumento en el volumen del medio de cultivo sea lo que lleve a un estado de energía alterado en las células, aumentando así la captación de glucosa.

En la [tabla 4.5](#) con el ANOVA del diseño One Factor, se puede observar que el valor F del modelo de 30.56 implica que el modelo fue significativo y que existe sólo un 1.01% de oportunidad de que el valor F sea más grande debido al error. Por otro lado el Pred R<sup>2</sup> de 0.8129 está de acuerdo con el "Adj R<sup>2</sup>" de 0.9220, debido a que la diferencia entre ellos es más baja que 0.2.

Considerando que la Adeq Precision mide la relación del ruido y que una tasa más grande de 4 es deseable, es evidente que el modelo puede ser usado para navegar por el espacio del diseño, debido a que la tasa del Adeq Precision obtenida fue de 10.593 y que se considera una señal estadística adecuada ([Tabla 4.2](#)).

El ajuste estadístico, la confiabilidad y la significancia del modelo cuadrático del OFED genera confianza en la predicción del mismo; sin embargo, al analizar la [figura 4.4](#) se decidió no ensayar la modificación propuesta en la predicción (utilizar 16.529 gL<sup>-1</sup> en lugar de 15 gL<sup>-1</sup> de extracto de levadura), pues en términos de actividad enzimática la actividad predicha por el modelo (1365.67 UL<sup>-1</sup>) se encuentra dentro del rango de desviación estándar de la actividad enzimática obtenida experimentalmente (1343.52 ± 40.3 UL<sup>-1</sup>).

Finalmente después del OFED se logró aumentar la actividad enzimática de 451.08 ± 6.46 UL<sup>-1</sup> obtenida en el trabajo previo [\[20\]](#) a 1343.52 ± 40.3 UL<sup>-1</sup>; lo que significa un incremento de aproximadamente 2.98 veces la actividad enzimática.

#### **4.4.3. Caracterización del sobrenadante concentrado**

##### **4.4.3.1. Identificación funcional de la enzima en el concentrado**

En la [Figura 4.5](#) el zimograma permitió la identificación funcional para actividad lacasa, al reaccionar generando una pigmentación de color verde como consecuencia de la oxidación del ABTS.

##### **4.4.3.2. Estabilidad a temperatura y pH**

El estudio de estabilidad mostró que la enzima recombinante POXA 1B de *P. ostreatus* expresada en *P. pastoris* X33 se mantuvo estable entre 10 y 50°C y retuvo más del 70% de la actividad enzimática residual a 60°C y el 50% a 70°C. Con respecto a la estabilidad a pH, POXA 1B fue más estable a pH 4 con una actividad enzimática residual superior al 90%, mientras que por debajo de pH 3.0 y por encima de pH 5.0 fue menos estable a las condiciones del ensayo. Sin embargo, la actividad enzimática residual más baja se presentó a pH 10 con aproximadamente el 60%. Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados por Giardina *et al.*, (1999) cuando purificaron y caracterizaron una isoenzima de lacasa a partir de *P. ostreatus*; en este estudio reportaron la mayor actividad enzimática a pH ácido (3.0) y temperaturas entre 20 y 50°C [\[41\]](#), lo que también coincide con los resultados del presente trabajo. Por otra parte, tomando en consideración la estabilidad a temperatura y pH, es importante destacar que POXA 1B recombinante fue más estable que otras isoenzimas (POXA 1W, POXA2, POXC) de *P. ostreatus* caracterizadas en estudios anteriores [\[41\]](#).

#### 4.4.3.3. Caracterización cinética del sobrenadante concentrado

Los valores de las constantes cinéticas de diferentes lacasas, bien sean de origen fúngico o bacteriano, presentan un amplio rango e incluso, pueden diferir frente al mismo sustrato. Sin embargo, en la mayoría de los estudios realizados por otros autores, se reporta una mayor afinidad por el ABTS en comparación con sustratos como syringaldazina o guaiacol entre otros, los cuales son oxidados con menor velocidad y sus constantes de Michaelis son más elevadas [21,45,46].

Los resultados indican que el valor de  $K_m$  fue de 1.720 mM y la  $V_{max}$  fue de  $3.163 \times 10^{-2}$ . Estos resultados están por encima de lo reportado por Giardina *et al.*, (1999) [45], quienes encontraron un valor  $K_m$  de 0.37 mM para la misma isoenzima de lacasa, diferencia que podría estar relacionada con el hecho de que la lacasa del presente estudio no se encuentra pura, por lo que se sugiere hablar de una  $K_m$  aparente, pues la naturaleza de los otros componentes del concentrado es incierta y pueden haber interferido positiva o negativamente en la actividad enzimática. Adicionalmente, se demuestra que POXA 1B tienen una mayor eficiencia catalítica hacia el ABTS comparada con otras isoenzimas de lacasas encontradas en *P.ostreatus* [46].

#### 4.5. Conclusiones

Las lacasas tienen una gran importancia debido a sus potenciales aplicaciones industriales. Como en la delignificación de material lignocelulósico, biopulpeo y bioblanqueo, tratamiento de aguas residuales, y transformación de tóxicos contaminantes orgánicos. En el presente trabajo, se mejoró el medio de cultivo para la producción de la lacasa recombinante POXA 1B [500mL Erlenmeyer con 300 mL de medio de cultivo (3/5), 10% (v/v) inóculo, 1 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 gL<sup>-1</sup> glucosa, 20 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 20 gL<sup>-1</sup> peptona, 15 gL<sup>-1</sup> extracto de levadura, durante 168 h, at 30°C y 180 rpm]. Adicionalmente, se obtuvo una actividad lacasa de 1,343.52 40.3 UL<sup>-1</sup> a las 168 horas de cultivo, representando un incremento en la actividad enzimática de 2.8 veces la actividad obtenida en los ensayos preliminares y “*screening*” de los clones obtenidos (Capítulo 3). Se identificó la funcionalidad de POXA 1B realizando zimograma. El análisis de estabilidad a pH mostró que la enzima es estable a pH 4.0, con una actividad enzimática relativa por encima del 60% en un amplio rango de pH (2.0–9.0). Con respecto a la estabilidad a temperatura, la enzima se mantuvo estable en un amplio rango entre 10 y 70°C. Los parámetros cinéticos obtenidos para la lacasa recombinante POXA 1B mostraron la afinidad por el sustrto ABTS como se reportó en el trabajo anterior con el análisis por docking molecular y su eficiencia catalítica, soportando lo reportado para otras lacasas. Esta caracterización se realizó usando el sobrenadante concentrado en lugar de utilizar la enzima pura, debido a que el propósito del grupo de investigación se encuentra encaminado al tratamiento de residuales líquidos y sólidos contaminados y trabajar con la enzima pura en dichos procesos encarecería considerablemente los tratamientos.

La lacasa recombinante POXA 1B expresada en *P. pastoris* usando el medio de cultivo optimizado, y bajo las condiciones experimentales evaluadas, puede considerarse como una enzima promisorio y con numerosas aplicaciones debido a su amplio rango de tolerancia a diferentes pHs y temperaturas.

#### 4.6. Referencias

1. Brown MA, Zhao Z, Mauk AG (2002) Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorganica Chimica Acta* 331: 232–238. doi:10.1016/S0020-1693(01)00814-3
2. Gelo-Pujic M, Hyung-Han K, Butlin NG, Palmore GTR (1999) Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5515-5521. PMID: 10584012
3. O'Callaghan J, O'Brien MM, McClean K, Dobson AD (2002) Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29: 55-59. doi:10.1038/sj.jim.7000268 PMID: 12161771
4. Taha AA, Shwaish II, Mohammed AH, Haider AJ, Stamatis H (2013) Production of a laccase from *Botrytis cinerea* (DSMZ 877) and application for textile phenolic dye decolorization. *Energy Procedia* 36: 862-871. doi:10.1016/j.egypro.2013.07.099
5. Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, et al. (2013) Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews* 27: 67-82. doi:10.1016/j.fbr.2013.07.001
6. Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, et al. (2010) Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 369-385. doi: 10.1007/s00018-009-0169-1 PMID: 19844659
7. Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang H, Zhu Y-C, Gorman MJ, et al. (2004) Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 29-41. doi:10.1016/j.ibmb.2003.08.003 PMID: 14723895
8. Zeng X, Cai Y, Liao X, Zeng X, Luo S, et al. (2012) Anthraquinone dye assisted the decolorization of azo dyes by a novel *Trametes trogii* laccase. *Process Biochemistry* 47: 160-163. doi:10.1016/j.procbio.2011.10.019
9. Hou H, Zhou J, Wang J, Du C, Yan B (2004) Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry* 39: 1415–1419. doi:10.1016/S0032-9592(03)00267-X
10. Colao MC, Lupino S, Garzillo AM, Buonocore V, Ruzzi M (2006) Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microbial Cell Factories* 5: 1-11. doi:10.1186/1475-2859-5-31 PMID: 17038162
11. Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K-H, Cavaco-Paulo A, et al. (2000) Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3357-3362. doi: 10.1128/AEM.66.8.3357-3362.2000
12. Qing Yang X, Xia Zhao X, Yun Liu C, Zheng Y, Jun Qian S (2009) Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. *Process Biochemistry* 44: 1185-1189. doi:10.1016/j.procbio.2009.06.015
13. Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhouib A, Sayadi S, Martínez AT, et al. (2006) Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 141-148. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.11.027

14. Soares GaMB, Pessoa de Amorim MT, Costa-Ferreira M (2001) Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *Journal of Biotechnology* 89: 123-129. doi:10.1016/S0168-1656(01)00302-9 PMID: 11500205
15. Majeau J-A, Brar SK, Tyagi RD (2010) Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology* 101: 2331–2350. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.087 PMID: 19948398
16. Garcia HA, Hoffman CM, Kinney KA, Lawler DF (2011) Laccase-catalyzed oxidation of oxybenzone in municipal wastewater primary effluent. *Water Research* 45: 1921-1932. doi: 10.1016/j.watres.2010.12.027 PMID: 21237478
17. Camarero S, García O, Vidal T, Colom J, del Río JC, et al. (2004) Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 113-120. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.10.019
18. Ferrer-Miralles N, Domingo-Espín J, Corchero JL, Vázquez E, Villaverde A (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* 8: 17. doi: 10.1186/1475-2859-8-17 PMID: 19317892
19. Blevé G, Lezzi C, Mita G, Rampino P, Perrotta C, et al. (2008) Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 731-741. doi: 10.1007/s00253-008-1479-1 PMID: 18443781
20. Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poveda-Cuevas SA, Reyes-Guzmán EA, Poutou-Piñales RA, et al. (2015) Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes *GILCC1* from *Ganoderma lucidum* and *POXA 1B* from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. *Plos One* 10: e0116524. doi:10.1371/journal.pone.0116524.g002 PMID: 25611746
21. Liu H, Cheng Y, Du B, Tong C, Liang S, et al. (2015) Overexpression of a Novel Thermostable and Chloride-Tolerant Laccase from *Thermus thermophilus* SG0.5JP17-16 in *Pichia pastoris* and Its Application in Synthetic Dye Decolorization. *Plos One* 10: e0119833. doi: 10.1371/journal.pone.0119833 PMID: 25790466
22. Guo M, Lu F, Du L, Pu J, Bai D (2006) Optimization of the expression of a laccase gene from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 848-852. 10.1007/s00253-005-0210-8 PMID: 16292528
23. Theerachath M, Emond S, Cambon E, Bordes F, Marty A, et al. (2012) Engineering and production of laccase from *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology* 125: 267-274. doi: 10.1016/j.biortech.2012.07.117 PMID: 23026343
24. Jolivald C, Madzak C, Brault A, Caminade E, Malosse C, et al. (2005) Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66: 450–456. PMID: 15349699
25. Saloheimo M, Niku-Paavola M-L (1991) Heterologous Production of a Ligninolytic Enzyme: Expression of the *Plebeia Radiata* Laccase Gene in *Trichoderma Reesei*. *Nature Biotechnology* 9: 987 - 990. doi:10.1038/nbt1091-987
26. Li JF, Hong YZ, Xiao YZ, Xu YH, Fang W (2007) High production of laccase B from *Trametes* sp. in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 23: 741–745. doi:10.1007/s11274-006-9286-2
27. Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 45-66. PMID: 10640598

28. Yu P, Yang J, Gu H (2014) Expression of *HpaI* in *Pichia pastoris* and optimization of conditions for the heparinase I production. *Carbohydrate Polymers* 106: 223-229. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.01.087 PMID: 24721072
29. Córdoba H, Algecira N, Poutou RA, Barrera LA (2003) *Pichia pastoris* una Alternativa para la Producción de Glicoproteínas Humanas de Uso Terapéutico. *Estrategias de Fermentación. Revista Colombiana de Biotecnología* 5: 73-84.
30. Cos C, Ramón R, Montesinos JL, Valero F (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories* 5: 17p. doi:10.1186/1475-2859-5-17 PMID: 16600031
31. Poutou-Piñales RA, Córdoba-Ruiz HA, Barrera-Avellaneda LA, Delgado-Boada JM (2010) Carbon source feeding strategies for recombinant protein expression in *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. *African Journal of Biotechnology* 9: 2173-2184.
32. Jonsson LJ, Saloheimo M, Penttilä M (1997) Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetic* 32: 425-430. PMID: 9388299
33. Hong F, Meinander NQ, Jonsson LJ (2002) Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 79: 438-449. doi: 10.1002/bit.10297 PMID: 12115407
34. Colao MC, Lupino S, Garzillo AM, Buonocore V, Ruzzi M (2006) Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microbial Cell Factories* 5: 1-11. doi:10.1186/1475-2859-5-31 PMID: 17038162
35. Bohlin C, Johnson LJ, Roth R, Van Zyl WH (2006) Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129-132: 195-214. PMID: 16915640
36. Mate DM, Gonzalez-Perez D, Kittl R, Ludwing R, Alcalde M (2013) Functional expression of a blood tolerant laccase in *Pichia pastoris*. *Protein and Enzyme Technology* 13: 38. doi:10.1186/1472-6750-13-38
37. Kern A, Hartner FS, Freigassner M, Spielhofer J, Rumpf C, et al. (2007) *Pichia pastoris* "just in time" alternative respiration. *Microbiology* 153: 1250-1260. PMID: 17379734
38. Baumann K, Maurer M, Dragosits M, Cos O, Ferrer P, et al. (2008) Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering* 100: 177-183. PMID: 18078287
39. Vogl T, Glieder A (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology* 30: 385-404. doi: 10.1016/j.nbt.2012.11.010 PMID: 23165100
40. Park M, Kim M, Kim S, Ha B, Ro H-S (2015) Differential expression of laccase genes in *Pleurotus ostreatus* and biochemical characterization of laccase isozymes produced in *Pichia pastoris*. *Mycobiology* 43: 280-287. doi: 10.5941/MYCO.2015.43.3.280 PMID: 26539044
41. Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, et al. (1999) Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal* 341: 655-663. PMID: 10417329
42. Barrabés S, Sarrats A, Fort E, De Llorens R, Rudd PM, et al. (2010) Effect of sialic acid content on glycoprotein pI analyzed by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 31: 2903-2912. doi: 10.1002/elps.200900764 PMID: 20690144

43. Du H, Levine M, Ganesa C, Witte DP, Cole ES, et al. (2005) The role of mannosylated enzyme and the mannose receptor in Enzyme Replacement Therapy. *American Journal of Human Genetics* 77: 1061-1074. doi: 10.1086/498652
44. Laukens B, De Visscher C, Callewaert N (2015) Engineering yeast for producing human glycoproteins: where are we now? *Future Microbiology* 10: 21-34. doi: 10.2217/fmb.14.104 PMID: 25598335
45. Manavalan T, Manavalan A, Thangavelu KP, Heese K (2013) Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal* 70: 106-114.
46. Patel H, Gupte S, Gahlout M, Gupte A (2014) Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. *3 Biotech* 4: 77-84. doi: 10.1007/s13205-013-0129-1
47. Leitner C, Hess J, Galhaup C, Ludwig R, Nidetzky B, et al. (2002) Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98-100: 497-507.
48. Shin K-S, Lee Y-J (2000) Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384: 109-115. doi:10.1006/abbi.2000.2083 PMID: 11147821
49. Min K-L, Kim Y-H, Kim YW, Jung HS, Hah YC (2001) Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 392: 279–286.
50. Palmieri G, Giardina P, Marzullo L, Desiderio B, Nitti G, et al. (1993) Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39: 632-636. PMID: 7763931
51. You L-F, Liu Z-M, Lin J-F, Guo L-Q, Huang X-L, et al. (2014) Molecular cloning of a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Basic Microbiology* 54: S134–S141. doi: 10.1002/jobm.201200808 PMID: 23720193
52. Li Q, Pei J, Zhao L, Xie J, Cao F, et al. (2014) Overexpression and characterization of laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 50: 140-147.
53. Gu C, Zheng F, Long L, Wang J, Ding S (2014) Engineering the Expression and Characterization of Two Novel Laccase Isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by Fusing an Additional Ten Amino Acids Tag at N-Terminus. *Plos One* 9: e93912. doi: 10.1371/journal.pone.0093912 PMID: 24710109
54. Nelson DL, Cox MM (2005) LEHNINGER, Principles of Biochemistry. New York, USA: W.H. Freeman and Company.
55. Sáenz-Suárez H, Rivera-Hoyos C, Morales-Álvarez E, Poutou-Piñales R, Sáenz-Moreno J, et al. (2014) Modelación computacional preliminar de la estructura 3D de dos lacasas fúngicas. *Salud Arte y Cuidado* 7: 5-16.
56. Poutou RA, Amador E, Candelario M (1994) Banco de células primario (BCP): Caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Biotecnología Aplicada* 11: 55-59.
57. Sarria-Alfonso V, Sánchez-Sierra J, Aguirre-Morales M, Gutiérrez-Rojas I, Moreno-Sarmiento N, et al. (2013) Culture media statistical optimization for biomass production of a ligninolytic fungus for future rice straw degradation. *Indian Journal of Microbiology* 53: 199-207. doi: 10.1007/s12088-013-0358-3 PMID: 24426109

58. González JC, Medina SC, Rodríguez A, Osma JF, Alméciga-Díaz CJ, et al. (2013) Production of *Trametes pubescens* Laccase under Submerged and Semi-Solid Culture Conditions on Agro-Industrial Wastes. Plos One 8: e73721. doi:10.1371/journal.pone.0073721
59. Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R (2001) Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. Letters in Applied Microbiology 32: 331-335. doi: 10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x PMID: 11328500
60. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685. PMID: 5432063
61. Reynolds III JE, Josowicz M, Vegh RB, Solntsev KM (2013) Spectral and redox properties of the GFP synthetic chromophores as a function of pH in buffered media. Chemical Communications 49: 7788-7790. doi: 10.1039/C3CC44113J
62. Burquillo FJ, Holgado M, Bardsley WG (2003) Uso del Paquete Estadístico SIMFIT en la Enseñanza del Análisis de Datos en Ciencias Experimentales. Journal of Science Education 4: 8-14.
63. Miller G (1959) Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31: 426-428. doi: 10.1021/ac60147a030
64. Plummer DT (1981) Introducción a la Bioquímica Práctica. Bogotá: McGraw -Hill.

**CAPÍTULO 5.**  
**PRUEBAS PRELIMINARES DE TRATABILIDAD DE LICOR**  
**NEGRO SINTÉTICO OBTENIDO A PARTIR DE ASERRÍN**  
**DE PINO**

## 5.1. Introducción

La industria papelera consume importantes cantidades de agua, energía y productos químicos; ocupando el tercer puesto a nivel mundial con respecto al consumo de agua potable, para la obtención de pulpa de celulosa. Dependiendo el grado de tecnificación de las empresas se pueden utilizar entre 15 y 700 m<sup>3</sup> de agua potable por tonelada de papel producido. Para la obtención de papel y cartón se utilizan diversas materias primas como bagazo de caña, astillas de madera o subproductos de aserrinaje [1, 2]. Estas materias primas son fragmentadas y pre-tratadas, para obtener la fibra de celulosa con bajos contenidos de lignina. El proceso se realiza en dos etapas, en la primera se realiza la cocción de las astillas con hidróxido de sodio, sulfato de sodio y carbonato de calcio, a elevadas temperaturas y presión (Pulpeo Kraft), [3, 4]. Posteriormente, la pulpa se separa del licor negro el cual es tratado como un residual industrial o se envía a un ciclo de recuperación de reactivos, donde se obtiene energía para el proceso y se recicla una fracción importante de los insumos químicos requeridos en la etapa de pulpeo [5]. La pulpa café continúa al proceso de blanqueo, el cual se lleva a cabo por métodos químicos empleando oxidantes fuertes como cloro elemental (Cl<sub>2</sub>), dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oxígeno (O<sub>2</sub>) y otros agentes [3, 6].

Los efluentes generados durante estas dos etapas presentan concentraciones variables de DQO (1000- 10000 mgL<sup>-1</sup>), DBO<sub>5</sub> (500-5000 mgL<sup>-1</sup>), color (1000-8000 UC), pH (6.5-11.0) clorofenoles totales (20- 50 mgL<sup>-1</sup>), entre otros [1]. Si estos contaminantes se vierten a cuerpos de agua superficiales, pueden causar un grave impacto ambiental porque consumen el oxígeno disuelto, impiden el paso de luz solar, inhiben el proceso de fotosíntesis y algunos de los compuestos clorados se bioacumulan y son tóxicos para diferentes especies [7, 8, 9]. Para tratar estas aguas residuales las empresas implementan tratamientos primarios (físicos y químicos) y secundarios (aeróbicos y anaeróbicos), que son eficientes para la remoción de DQO, DBO<sub>5</sub>, sólidos sedimentables y sólidos en suspensión [2, 10, 112]. Sin embargo, algunos compuestos aromáticos clorados y el color, no son eliminados en su totalidad; lo que implica que las empresas deben evaluar otras alternativas de tratamiento para cumplir con la legislación vigente y mantener un desempeño ambiental sostenible. Para lograr estos objetivos una opción es utilizar tecnologías no convencionales, como el uso de hongos ligninocelulosicos y/o microorganismos recombinantes productores de proteínas heterólogas con aplicación ambiental [6, 8]. Los hongos ligninolíticos producen diferentes enzimas

extracelulares (Lacasas E.C. 1.10.3.2, Lignino peroxidases E.C. 1.11.1.14, Manganeso peroxidases E.C. 1.11.1.13), compuestos de bajo peso molecular (quelantes) y especies reactivas de oxígeno (radicales hidroxilo), que participan en la degradación de lignina (biopulpeo) y compuestos con estructura similar (clorofenoles, lignina modificada, colorantes, entre otros), [1, 6, 12-14]. Diferentes autores han demostrado que los hongos ligninolíticos son una alternativa promisorio para el tratamiento de aguas residuales de la industria papelera. [Moldes and Vidal \(2008\)](#) demostraron que las enzimas lacasas producidas por varios hongos de podredumbre blanca decoloraron la pulpa Kraft de *Eucalyptus* sp., obteniendo 45% de delignificación. [Salis et al., \(2009\)](#), reportaron que la lacasa inmovilizada de *Pleurotus* sp. eliminó diferentes concentraciones de fenoles presentes en aguas de pulpeo con eficiencias superiores al 50%. [Ortega et al., \(2009\)](#), demostraron que *Trametes versicolor* fue una alternativa eficiente para realizar el postratamiento de aguas residuales de pulpeo, tratadas previamente en un reactor anaeróbico y demostraron que los dos sistemas incrementaron significativamente la remoción de color, DQO y clorofenoles. Por otro lado, [Freitas et al., \(2009\)](#), realizaron el tratamiento biológico de un efluente kraft empleando lacasas de Basidiomycetes y Zygomycetes, observando que los primeros son más eficientes en relación al porcentaje de remoción y tiempos de retención.

Debido a que las lacasas pueden degradar un amplio rango de sustratos, y tienen la capacidad de utilizar el oxígeno atmosférico en lugar del peróxido de hidrógeno como es el caso de las peroxidases, son características que convierten a las lacasas en candidatas promisorias para su uso en diversas aplicaciones industriales. Sin embargo, debido a la dificultad para cultivar los hongos nativos a gran escala, y a que en la mayoría de los casos las actividades enzimáticas no son muy elevadas, el uso de sistemas heterólogos para la producción de enzimas como las lacasas ha ganado especial interés en la industria biotecnológica con el fin de incrementar la productividad. Algunos de los hospederos usados para expresar de manera heteróloga incluyen levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis*, usados para producir las lacasas ya sea en fermentaciones de estado líquido o sólido [18].

En el presente estudio se evaluó el uso de *Pleurotus ostreatus* productor de lacasas y una cepa recombinante de *Pichia pastoris* (X33/pGAPZ $\alpha$ A-LaccPost-Stop), productora de la lacasa

heteróloga POXA 1B de *Pleurotus ostreatus* [19], para el tratamiento de aguas residuales producidas durante el pulpeo alcalino de residuos de aserrinaje de *Pinus caribaea*. Por otro lado, se determinó el número de ciclos de operación que pueden soportar los dos hongos y el efecto de los efluentes postratados sobre el índice de germinación de semillas de *Lactuca sativa*.

## 5.2. Materiales y Métodos

### 5.2.1. Microorganismos y medios de cultivo

*P. ostreatus* (Pontificia Universidad Javeriana, Colombia) se reactivó en agar extracto de salvado de trigo (AEST) cuya composición en g/L fue: (10 glucosa, 5 peptona, 2 extracto de levadura, 0.1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.076  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 15 agar, 175 extracto líquido de salvado de trigo) a 30°C durante 8 días [20]. La producción de biomasa para los estudios en medio líquido se realizó en caldo extracto salvado de trigo (CEST), cultivando el hongo durante 8 días a 30°C y 120 rpm. Posteriormente la biomasa se recuperó por filtración, se lavó tres veces con agua destilada estéril y se guardó refrigerada a 4°C hasta el momento de ser utilizada.

Para la producción de biomasa de *Pichia pastoris* (X33/pGAPZ $\alpha$ A-LaccPost-Stop) se tomaron viales del Banco de Células Primario (MCB), [21]; una vez descongelados fueron inoculados en tubo de vidrio con tapa de rosca con 5 mL de medio estéril YPG suplementado con 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de zeocina (Z) y se incubaron a 30°C, durante toda la noche a 180 rpm. Posteriormente se inocularon dos Erlenmeyers de 500 mL con 100 mL (VET, volumen efectivo de trabajo) de medio YPG-Z fresco y se cultivó a las mismas condiciones durante 12 horas. El cultivo resultante fue verificado por Tinción de Gram para descartar la presencia de morfologías contaminantes y sirvió de inóculo al 10% (v/v) para la producción a baja escala del extracto crudo conteniendo la POXA 1B recombinante (rPOXA 1B).

La producción a baja escala de rPOXA 1B se realizó en el medio y las condiciones de cultivo previamente optimizadas [500mL Erlenmeyer with 300 mL of culture media (3/5), 10% (v/v) inoculum, 1.0 mM  $\text{CuSO}_4$ , 10g $\text{L}^{-1}$  glucose, 20 mM  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 20g $\text{L}^{-1}$  peptone, 15g $\text{L}^{-1}$  yeast extract, during 168 h, at 30°C and 180 r.p.m.], [22].

### 5.2.2. Técnicas analíticas

La Demanda Química de oxígeno (DQO) se determinó usando el método de reflujo cerrado utilizando el Kit comercial HACH, con rango de detección de 15-15.000  $\text{mgL}^{-1}$ . La concentración de carbono orgánico total (COT) se determinó usando la técnica de oxidación del persulfato de sodio (Kit comercial HACH 0-20  $\text{mgL}^{-1}$ ), las unidades de color (UC) y porcentaje de decoloración se estimaron empleando la metodología reportada por Shintani and Shoda (2013). La actividad lacasa se cuantificó siguiendo la metodología reportada por Tinoco

*et al.*, (2001). La cuantificación de azúcares reductores se realizó empleando la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico reportada por Miller *et al.*, (1959).

### 5.2.3. Obtención y caracterización del licor negro pos pulpeo químico

Se preparó un licor negro sintético (SBL) realizando un proceso Kraft modificado “*in vitro*”, adicionando 50 g de aserrín de *Pino caribea* a 500 mL de NaOH al 5 % (w/v) y la extracción se realizó a 15 PsI, 121°C durante 15 minutos. El licor negro se separó de la pasta de celulosa por centrifugación a 8000 rpm durante 20 min. El pH del licor se ajustó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 M y se refrigeró a 4° C hasta el momento de su uso. En la [Tabla 5.1](#) se observan la caracterización inicial del SBL al 100, 75, 50, 25, 10, 5 y 1% (v/v).

### 5.2.4. Efecto de la concentración del licor negro sobre la capacidad de remoción de *Pleurotus ostreatus* y *Pichia pastoris* (X33/pGAPZαA-LaccPost-Stop)

El SBL al 100% (v/v) se diluyó con agua destilada para obtener concentraciones del 75, 50, 25, 10, 5 y 1% (v/v). Los experimentos con *P. ostreatus* se realizaron por triplicado en Erlenmeyer del 100 mL que contenían 50 mL de SBL suplementado con: 5 gL<sup>-1</sup> glucosa, 0.05 gL<sup>-1</sup> sulfato de amonio y 1 mM de sulfato de cobre con un pH final de 7.0 ± 0.2. A cada Erlenmeyer se le adicionó un inóculo del 5 % (w/v) de biomasa pelletizada. Los recipientes se incubaron por 192 h a 120 r.p.m., y 30°C. Al finalizar el período de incubación el SBL postratado se recuperó por centrifugación a 8000 rpm, durante 20 min y como variables de respuesta se determinaron el porcentaje de decoloración, la remoción de DQO y la actividad lacasa (UL<sup>-1</sup>). La selección de la concentración de SBL a utilizar en los siguientes experimentos se realizó tomando como base aquella concentración en la cual se evidenció una remoción superior al 50 % y la máxima actividad lacasa (UL<sup>-1</sup>).

Para las pruebas con *P. pastoris*, se preparó SBL a concentraciones de 10, 5 y 1% (v/v), ya que en las pruebas preliminares se determinó que la levadura fue inhibida a concentraciones del 25, 50, 75 y 100% (v/v). El SBL fue suplementado con: Glucosa 10 gL<sup>-1</sup>, Peptona 20 gL<sup>-1</sup>, extracto de levadura 15 gL<sup>-1</sup>, sulfato de cobre 0.1 mM, sulfato de amonio 20 mM y un pH final de 7.0 ± 0.2. Los experimentos se realizaron por triplicado en erlenmeyer de 500mL con 300mL de SBL y se inocularon con 10% (v/v) de biomasa de *P. pastoris*. Los Erlenmeyer se incubaron por 192 h a 180 rpm., y 30°C. Al finalizar el período de incubación las muestras de SBL pos

tratadas fueron recuperadas por centrifugación a 8000 rpm, durante 20 min. En el sobrenadante se cuantificaron las mismas variables de respuesta que las evaluadas para *P. ostreatus*. Adicionalmente, para verificar la viabilidad de la levadura se realizaron diluciones decimales y siembra por microgota en agar YPD, siguiendo la metodología reportada por Rojas-Higuera *et al.*, (2010). La concentración de SBL a utilizar en las curvas de remoción se seleccionó de la misma forma que para *P. ostreatus*.

### 5.2.5. Decoloración, remoción de COT y TOC del efluente SBL por *P. ostreatus* y *P. pastoris*

Se realizaron por triplicado curvas de remoción, empleando Erlenmeyer de 100mL con 50mL de SBL al 10% (v/v) para *P. ostreatus* y SBL al 5 y 1% (v/v) para *P. pastoris*, suplementando el SBL de acuerdo con las necesidades nutricionales de cada hongo. Los porcentajes de inóculo de biomasa viable (VB) y condiciones de operación fueron las mismas que se usaron en las pruebas de tolerancia. Para estos experimentos se realizaron muestreos periódicos hasta completar 192 h y para el control de adsorción se utilizó biomasa no viable (Esterilización en autoclave por 15 minutos a 121° C y 1 atm.), la cual fue identificada como non-viable biomass para *P. ostreatus* (NVB/P.O) y *P. pastoris* (NVB/P.P). Las variables de respuesta evaluadas fueron: porcentaje de Decoloración, remoción de DQO, COT, glucosa residual (gL<sup>-1</sup>), lignina residual (gL<sup>-1</sup>), pH y actividad lacasa (UL<sup>-1</sup>). Adicionalmente, se realizó cromatografía gases acoplada a masas al inicio y final de las curvas, para los experimentos con biomasa viable (VB).

### 5.2.6. Determinación del índice de germinación con semillas de *Lactuca sativa*

El efecto del SBL inicial (T<sub>1</sub>) y postratado con los dos hongos, sobre el índice de germinación de semillas *Lactuca sativa* (IG) se realizó siguiendo la metodología reportada por Celis *et al.*, (2006) y Morales *et al.*, (2016). Los controles y tratamientos evaluados fueron: Agua destilada (1), ZnSO<sub>4</sub> a 0.001M (2) SBL inicial (3), SBL postratado con VB/P.O (4) y SBL postratado con VB/P.P (4), En la Figura 5.1 los números 5, 6 y 7, corresponden a las diluciones realizadas a los SBL postratados; entendiéndose como diluciones al 75, 50 y 25% (v/v), tanto para *P. ostreatus* como *P. pastoris*. La variable de respuesta fue el índice de germinación IG (%) y se calculó empleando la ecuación XII propuesta por Zucconi *et al.*, (1985).

$$\%IG = \frac{G*L}{GC*Lc} * 100 \quad (XII)$$

**Donde:** IG es el índice de germinación (%),  $G$  es el promedio de semillas germinadas en la muestra analizada,  $G_c$  es el promedio de semillas germinadas en el control negativo,  $L$  es el promedio de longitud de la radícula en la muestra (mm), y  $L_c$  es el promedio de longitud de la radícula en el control negativo (mm). El valor del IG puede variar entre 0 y superar el 100 %.

### **5.2.7. Número de ciclos de operación**

Para estimar el número de ciclos que soportaban las biomásas viables de *P. ostreatus* y *P. pastoris*, se realizaron nuevos ensayos a escala de Erlenmeyer empleando SBL al 10% (v/v) para *P. ostreatus* y SBL al 1% (v/v) para *P. pastoris*. Cada experimento se incubó durante 5 días a 30°C y 120 r.p.m. Al final del primer ciclo, se retiró el SBL postratado y los Erlenmeyers se alimentaron con un nuevo lote de SBL. El procedimiento se repitió hasta completar 5 ciclos, en cada ciclo se determinó el porcentaje de decoloración, remoción de COT, DQO, actividad lacasa ( $UL^{-1}$ ) y el pH; la viabilidad de los hongos se monitoreo por crecimiento radial en agar PDA (*P. ostreatus*) y recuento por microgota (*P. pastoris*).

### **5.2.8. Análisis estadístico**

Previamente se realizó la comprobación de normalidad y homogeneidad y posteriormente se realizaron varios análisis estadísticos. Comparación de medias entre tratamientos para: efecto de las concentraciones del SBL sobre la capacidad de remoción de los dos hongos, comparación entre biomasa viable y muerta para las curvas de remoción, comparación entre ciclos de operación y un análisis múltiple de correlación de variables para las curvas de remoción. Para todas las pruebas se utilizó el programa SAS 9.0.

### 5.3. Resultados y discusión

#### 5.3.1. Caracterización del SBL

El SBL al 100% presentó concentraciones elevadas de unidades de color, DQO, COT y lignina; demostrando que durante el proceso de extracción, la lignina es solubilizada por el hidróxido de sodio, la presión y la temperatura. El subproducto líquido o licor negro sintético (SBL) se caracterizó por tener un color café oscuro posiblemente por la presencia de grupos cromóforos de baja degradabilidad como anillos aromáticos fenólicos conjugados con grupos carbonilo (CH=CH), quinonas, radicales libres, entre otros. Adicionalmente, el SBL puede tener compuestos alifáticos con diferente peso molecular que incrementan la DQO, SST, SS y SDT [10]. Por otro lado, se evidenciaron absorbancias altas a  $\lambda_{254\text{ nm}}$ ,  $\lambda_{280\text{ nm}}$  y  $\lambda_{465\text{ nm}}$ , las que estarían relacionadas con compuestos aromáticos, lignina y grupos cromóforos (Tabla 5.1). A medida que el SBL fue diluido para preparar los experimentos para los dos hongos, la composición fue variando por el efecto dilución y por el ajuste nutricional que se realizó. Los niveles de suplemento fueron determinados experimentalmente por nuestro grupo (**datos no mostrados**) para favorecer el crecimiento miceliar y la actividad enzimática de cada microorganismo (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1.** Synthetic Black Liquor characterization

Parámetro	100 % (v/v)	10%* (v/v)	10%** (v/v)	5%** (v/v)	1%** (v/v)
pH	7.0±0.2	7.0±0.2	6.5±0.2	6.5±0.3	6.5±0.1
SST mgL <sup>-1</sup>	3352±12	807±21	934±42	541±33	213±65
SS mL <sup>-1</sup>	45±3.2	14±1.8	13±1.9	6.4±0.7	2.1±0.3
COD mgL <sup>-1</sup>	50000±234	7250±866	51166±125	29200±230	13666±126
TOC mgL <sup>-1</sup>	7730±256	873±22	ND	1846±89	1543±51
Lignina mgL <sup>-1</sup>	2789±567	350±65	1166±288	1066±115	400±10
Unidades de Color $\lambda_{465\text{ nm}}$	99521±879	12058±760	29671±345	15656±437	6439±178

Absorbancia a $\lambda_{465 \text{ nm}}$	1.345±0.34	0.678±0.02	0.789±0.01	0.126±0.02	0.067±0.02
Absorbancia a $\lambda_{280 \text{ nm}}$	3.876±	1.765±0.56	1.987±0.45	1.175±0.34	0.872±0.03
Absorbancia a $\lambda_{254 \text{ nm}}$	2.45±0.87	1.98±0.065	1.23±0.031	0.935±0.1	0.567±0.02

Los asteriscos en la tabla indican: \* Concentración de SBL suplementado para *P. ostreatus*. \*\* Concentración de SBL suplementado para *P. pastoris*

### 5.3.2. Efecto de la concentración del licor negro sobre la capacidad de remoción de *P. ostreatus* y *P. pastoris*

La concentración inicial del SBL, juega un papel fundamental sobre la capacidad de remoción tanto de la cepa nativa (*P. ostreatus*) como de la cepa recombinante (*P. pastoris*) porque a concentraciones elevadas de materia orgánica puede generar un efecto inhibitorio por el exceso de sustrato o toxicidad de ciertos compuestos que superan la capacidad de tolerancia de los hongos. En relación con *P. ostreatus* se realizaron pruebas preliminares que demostraron que el hongo nativo removió eficientemente el color y la DQO del SBL al 100, 75, 50 y 25 % (v/v) con porcentajes superiores al 50% (**datos nos mostrados**). Sin embargo, en el SBL al 10, 5 y 1% (v/v) se evidenciaron las remociones más elevadas donde se obtuvieron porcentajes de decoloración del 84, 87 y 90%, respectivamente. En relación con la remoción de DQO los valores obtenidos fueron 98, 97 y 90% para SBL al 10, 5 y 1% (v/v), respectivamente. La actividad lacasa en las tres concentraciones osciló entre 290 y 400 UL<sup>-1</sup> (Figura 5.1a).

*P. pastoris* productora de rPOXA 1B fue más sensible a elevadas concentraciones de SBL y no se evidenció remoción al 100, 75, 50 y 25 % (v/v), llevando a que sólo se pudiera evaluar el SBL al 10, 5 y 1 % (v/v). Bajo estas condiciones, la decoloración a los 5 días fue del 19, 53 y 59%, para SBL al 10, 5 y 1% (v/v) respectivamente. En relación con la remoción de DQO, los porcentajes fueron del 5, 30 y 53% respectivamente. La actividad lacasa en las tres concentraciones fue de 1399, 1346 y 1327 UL<sup>-1</sup> (Figura 5.1b).

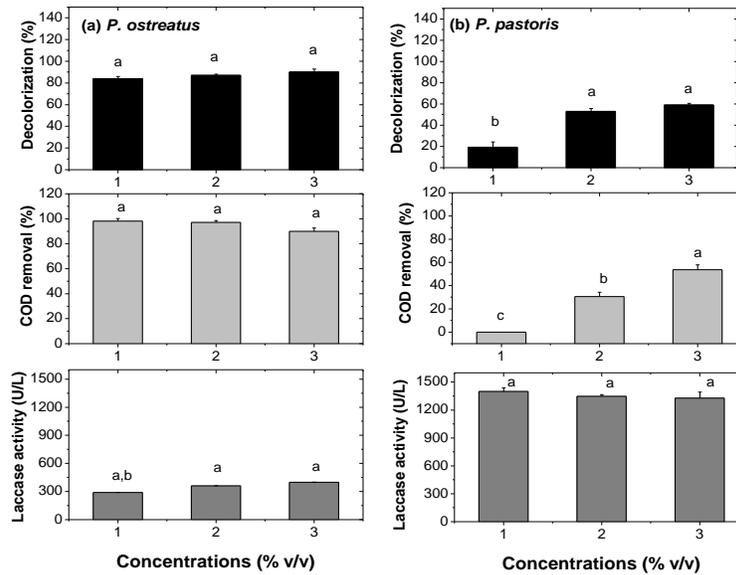
Al realizar la comparación de medias entre concentraciones para *P. ostreatus* no se observaron diferencias significativas tanto para la decoloración como para la remoción de DQO y

actividad lacasa ( $p > 0.0001$ ); demostrando que la cepa nativa podía ser empleada para remover la materia orgánica de cualquiera de las tres concentraciones. Por esta razón, para las curvas de remoción sólo se evaluó la concentración más alta (10% v/v) cuya composición química fue similar a un licor de pulpeo Kraft real (Irfan *et al.*, 2013).

Al realizar el mismo análisis para *P. pastoris*, se observaron diferencias significativas entre concentraciones para la decoloración y remoción de DQO ( $p < 0.0001$ ); lo que justificó que en el SBL al 10 % (v/v) se obtuvieran las remociones más bajas (menor al 50 %) y por tanto las curvas se realizaron solamente con SBL al 5 y 1 % (v/v).

La capacidad de remoción de *P. ostreatus* está relacionada con el sistema enzimático ligninolítico que produce el hongo nativo, el cual está formado por diferentes isoformas de lacasa, enzimas dependientes de  $H_2O_2$  (MnP y LiP) y los sistemas generadores de peróxido de hidrogeno [29, 30]. El sistema ligninolítico puede actuar sobre licor negro, licor blanco o lignosulfonatos ricos en compuestos fenólicos de bajo y alto peso molecular, involucrando reacciones sucesivas de oxidación para formar radicales catiónicos, compuestos alifáticos y posible mineralización hasta  $CO_2$  [31]. Adicionalmente, la biomasa de *P. ostreatus* pudo remover parte del SBL por adsorción a la pared fúngica y este sería un mecanismo físico/químico adicional no asociado con el metabolismo primario que ayuda a incrementar la eficiencia de remoción [32, 33].

En contraste, *P. pastoris* sólo produce un tipo de lacasa la cual podría actuar sobre los compuestos aromáticos fenólicos. Sin embargo, es factible que se requiera mayor tiempo de tratamiento para incrementar la eficiencia de remoción en todas las concentraciones evaluadas. En relación con su capacidad de adsorción posiblemente fue menor porque el tamaño y morfología del hongo levaduriforme es diferente y la pared celular tiene menor cantidad de sitios activos potenciales para la remoción por adsorción.



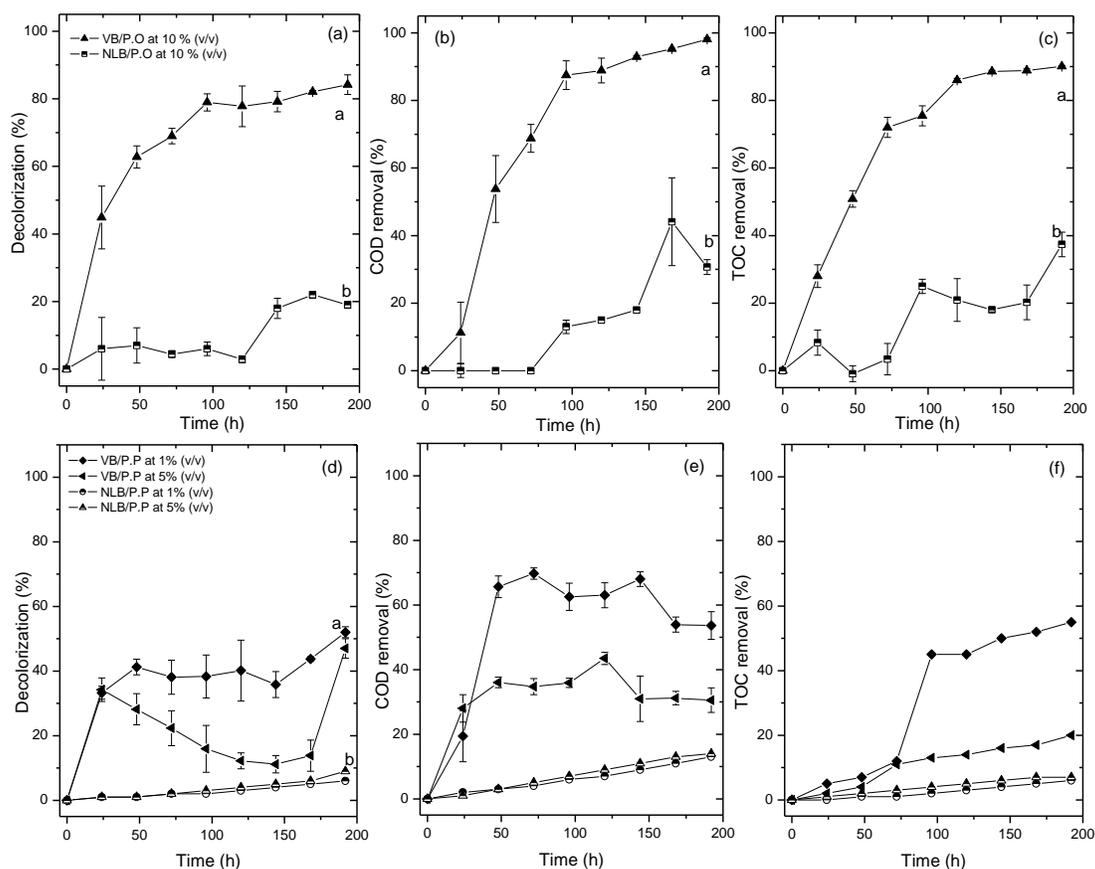
**Figura 5.1.** Efecto de diferentes concentraciones de SBL sobre la capacidad de remoción de *P. ostreatus* y *P. pastoris*. **(a)** Experimento con *P. ostreatus*. Concentración 1: SBL al 10% (v/v). Concentración 2: SBL al 5% (v/v). Concentración 3: SBL al 1% (v/v). **(b)** Experimento con *P. pastoris*. Concentración 1: SBL al 10% (v/v). Concentración 2: SBL al 5% (v/v). Concentración 3: SBL al 1% (v/v). Las letras representan los subgrupos homogéneos de Tukey. a corresponde al mejor resultado, seguido en orden por b y c. Las barras representan la desviación estándar del promedio de tres replicas.

### 5.3.3. Decoloración, remoción de COT y TOC del efluente SBL por *Pleurotus ostreatus* y *Pichia pastoris*

En la [Figura 5.2 a, b, c](#) se presentan los porcentajes de remoción para las tres variables dependientes obtenidas con *P. ostreatus* después de 192 h de proceso. En términos de la decoloración se evidenciaron diferencias significativas entre la biomasa viable y la biomasa muerta (NLB/P.O) ( $p < 0.0001$ ) con porcentajes del 84 % y 19 %. Simultáneo con la remoción de color se obtuvieron remociones significativas de DQO y COT ( $p < 0.0001$ ) con valores de 98 y 90 % a las 192 h, las cuales fueron superiores a las obtenidas con NLB/P.O (30 y 37 % para DQO y COT respectivamente). Por otro lado, se observaron correlaciones positivas significativas entre la decoloración, remoción de DQO y COT ( $r = 0.934, 0.977$  y  $0.989$  respectivamente) con un valor de  $p < 0.05$  para los tres parámetros.

El comportamiento de la biomasa viable y NLB/P.P de *P. pastoris* en SBL al 5 y 1% (v/v) se presentan en la [Figura 5.2 d, e, f](#). Para este hongo los porcentajes también fueron incrementado en función del tiempo hasta obtener valores del 47.5, 52, 30, 53, 20 y 55 % para decoloración,

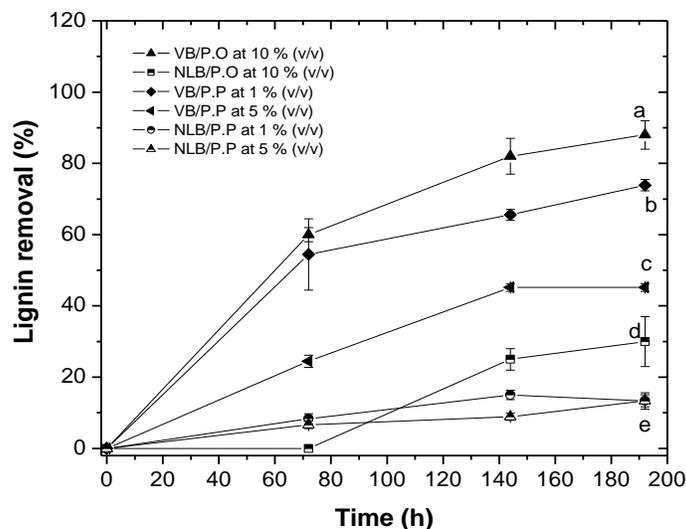
DQO y COT en SBL al 5 y 1% (v/v). Estos valores fueron significativamente superiores a los obtenidos con NLB/P.P (9, 6.3, 14 y 13%, para decoloración y DQO con SBL al 5 y 1%) ( $p < 0.0001$ ). La remoción de COT no fue superior al 10% en las dos concentraciones evaluadas. En relación con los análisis de correlación para la biomasa viable, se obtuvo una correlación positiva significativa entre las tres variables para el SBL al 1% ( $r = 0.81, 0.80$  y  $0.81$  decoloración, remoción de DQO y COT) con valores de  $p$  iguales a 0.047, 0.049 y 0.042. En el SBL al 5% se evidenció una correlación positiva pero no significativa ( $p > 0.05$ ).



**Figura 5.2.** Curvas de remoción *P. ostreatus* viable (VB) y no viable (NLB/P.O). (a) Decolorización. (b), COD removal. (c) TOC removal. *P. pastoris* viable (VB) y no viable (NLB/P.P). (d) Decolorización. (e), COD removal. (f) TOC removal. Las letras representan los grupos heterogeneos obtenidos con la prueba de Tukey. La letra **a** corresponde al mejor tratamiento, seguido por la letra **b**. Las barras representan la desviación estándar del promedio de tres replicas.

En cuanto al comportamiento del porcentaje de remoción de lignina se analizaron menos datos (inicial, 72, 144 y 192 h); se observó una remoción alta con la biomasa viable de los dos hongos. Alcanzando porcentaje del 88 y 73 % para *P. ostreatus* y *P. pastoris* respectivamente en

SBL al 10 y 1 % (v/v). La remoción por adsorción para los dos microorganismos osciló entre 13 y 30 % (Figura 5.3).



**Figura 5.3.** Remoción de lignina para *P. ostreatus* viable (VB), no viable (NLB/P.O), *P. pastoris* viable (VB) y no viable (NLB/P.P) en SBL al 10%, 5% y 1% (v/v). Las letras representan los grupos heterogéneos obtenidos con la prueba de Tukey. La letra **a** corresponde al mejor tratamiento, seguido por las letras **b,c,d** y **e**. Las barras representan la desviación estándar del promedio de tres replicas.

*P. ostreatus* tiene la capacidad para realizar la modificación del polímero de lignina. [Dashtban et al., 2010](#), reportaron que los hongos de podredumbre blanca pueden realizar de manera simultánea una degradación enzimática y no enzimática de este polímero; lo que al mismo tiempo produce una disminución de color, DQO y COT en aguas residuales de industria papelera. En esta degradación enzimática participan polifenol oxidasas, hemoperoxidasas y enzimas accesorias generadoras de peróxido de hidrógeno. La acción combinada de los tres grupos enzimáticos permite llevar a cabo la deslignificación parcial o total, para formar radicales libres que pueden continuar oxidándose hasta intermediarios de bajo peso molecular. En relación con la degradación no enzimática, durante el proceso de deslignificación los hongos disminuyen el pH y dejan libre ciertas cantidades de peróxido de hidrógeno. Este compuesto puede reaccionar con sales de hierro para generar radicales hidroxilo con elevado poder oxidante (Proceso Fenton biológico). Esta reacción favorece de forma indirecta la oxidación de anillos aromáticos hasta ácidos carboxílicos y CO<sub>2</sub>. Por otro lado, en el SBL también se encontraban otras fuentes de C y N (suplementación nutricional de SBL), las cuales pueden ser asimiladas por el hongo para la formación de nueva biomasa y producción de energía;

generando una disminución en la DQO, COT y SST. [Sharma et al., \(2014\)](#) reportaron que la producción de celulasas y hemicelulasas, son otra estrategia desarrollada por los hongos y bacterias para generar cambios en los subproductos líquidos o efluentes de la industria papelera. Aunque en este estudio no se cuantificaron estas enzimas se conoce por trabajos previos reportados de [Rojas-Higuera et al., \(2016\)](#) que este hongo produce Endoglucanasas, endoxilasansas,  $\beta$ -glucosidasas, y celobiohidrolasas, cuando es cultivado en aserrines de pino, roble y eucalipto. La producción de estas enzimas podría incrementar la remoción de DQO y COT. Otro factor que favoreció la remoción de DQO y COT en el SBL, está reacionado con la elevada relación C/N que tenía el residual, la cual fue aportada por los compuestos propios del SBL y el suplemento de carbono que se realizó al residual para favorecer el metabolismo fúngico (5.0 gL<sup>-1</sup> glucosa). Un resultado similar fue reportado por [Pedroza et al., \(2013\)](#), en su trabajo se determinó que al incrementar gradualmente la relación C/N de un efluente papelerero se favoreció la remoción de DQO (>80%) y decoloración (>80%) al tratarlo con biomasa inmovilizada de *Trametes versicolor*.

Al comparar nuestros resultados con otros autores se evidencio que entre los mismos hongos de podredumbre blanca se pueden presentar diferencias. [Freitas et al., \(2009\)](#) evaluaron el uso de *Pleurotus sajor caju* para la remoción de DQO, lignina y color presentes en efluentes papeleros y observaron que a los 10 días de tratamiento la remoción fue del 72, 79 y 72 %, valores más bajos si se comparan con nuestro estudio y fueron obtenidos dos días después.

Por el contrario, la capacidad de remoción de *P. pastoris* se relacionaría más con la producción de un sólo tipo de lacasa, el uso de la glucosa y el extracto de levadura, como fuentes de carbono y nitrógeno para su metabolismo primario (suplementación nutricional del SBL). La enzima lacasa pudo generar cambios en los anillos aromáticos que tenían grupos -OCH<sub>3</sub>. Adicionalmente pudo producir cambios o estiramientos en los enlaces C=O de los carbonilos conjugados y grupos carboxilos ácidos [36].

#### **5.3.4. Actividad lacasa, consumo de glucosa y pH**

En relación con la actividad lacasa se presentaron tendencias diferentes en los dos hongos, en las curvas con *P. ostreatus* se observó un incremento hasta las 48 horas de proceso obteniendo un valor de 862 UL<sup>-1</sup>, posteriormente la actividad disminuyó para finalizar con 290 UL<sup>-1</sup> a las

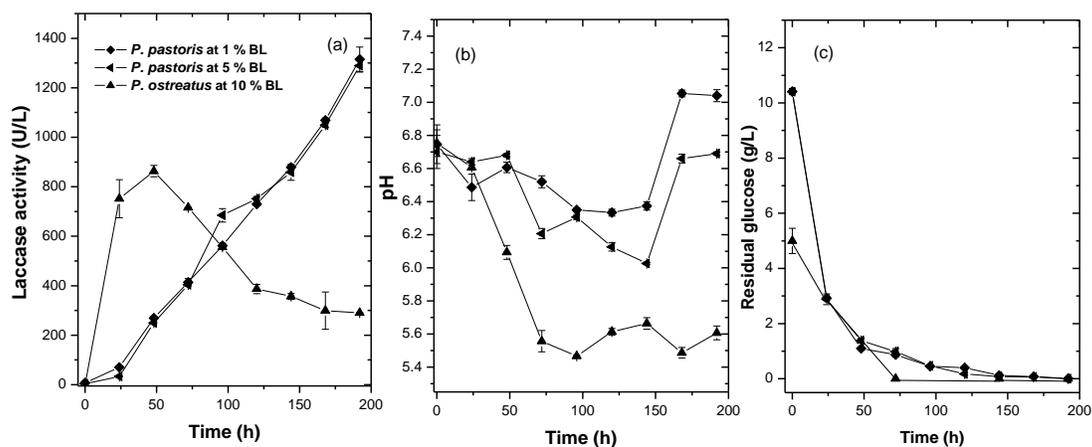
192 h. Esta tendencia podría sugerir que la lacasa producida por *P. ostreatus* está siendo inducida por los compuestos fenólicos presentes en el SBL. Sobre estos compuestos las enzimas pueden realizar oxidaciones y demetilaciones de las subunidades aromáticas que tienen grupos metoxilo en los carbonos 3 y 5. Posteriormente, podrían actuar otras enzimas como las peroxidasas, las cuales podrían generar intermediarios alifáticos y ácidos carboxílicos [36]. Por esta razón, no se evidenció una correlación positiva significativa entre la actividad lacasa con la remoción de color, DQO, COT y lignina ( $p= 0.051, 0.057, 0.067$  y  $0.071$  respectivamente), con valores de  $p>0.05$  (Figura 5.4a).

La inducción de las lacasas por los compuestos aromáticos, los cambios en la tendencia de la actividad enzimática en función del tiempo y su relación con las peroxidasas, han sido reportados con anterioridad por nuestro grupo. En un trabajo realizado en el 2013 con *Trametes versicolor* se determinó que cuando el hongo está en contacto con un efluente de industria papelera, la primera enzima en cuantificarse fue la lacasa y posteriormente se empieza a producir Manganese peroxidasa; sin embargo, las dos estuvieron relacionadas con la remoción de color, DQO y dechlorinación de compuestos aromáticos clorados [35]. Una tendencia similar se presenta cuando se utiliza un cocultivo fúngico de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* para el tratamiento de aguas residuales textiles. Estos resultados sugieren que los compuestos aromáticos inducen fuertemente la actividad lacasa y su potencial de biotransformación se complementa por la intervención de las peroxidasas que son producidas después de la polifenol oxidasa, [37].

El comportamiento de la lacasa heteróloga producida por *P. pastoris* en función del tiempo fue diferente. Esta enzima se produce de manera constitutiva en las dos concentraciones de SBL y finaliza con 1346 y 1327  $UL^{-1}$ , para SBL al 5 y 1 %. La actividad lacasa presentó correlación positiva significativa con todas las variables en las dos concentraciones (valores de  $r$  superiores a 0.9 y valores de  $p$  menores a 0.05), lo que sugiere que la única lacasa que está produciendo *P. pastoris* podría estar participando en la remoción de algunos de los compuestos presentes en el SBL (Figura 5.4a).

En relación con el consumo de glucosa y la variación de pH, se observó que los dos hongos consumen gradualmente la fuente de carbono y generan una disminución del pH por la

producción de ácidos orgánicos. La suplementación de los efluentes industriales, con fuentes de carbono sencillas es una estrategia que se utiliza frecuentemente para favorecer el metabolismo primario de los microorganismos, de tal manera que posteriormente puedan acceder a la fuente de carbono compleja como los compuestos aromáticos provenientes del proceso de extracción alcalina o licor de blanqueo [35]. Adicionalmente, el consumo de glucosa por *P. ostreatus* podría favorecer la producción de ácidos orgánicos y peróxido de hidrogeno, que son necesarios para la actividad de la Manganese peroxidasa y la Lignino peroxidasa, (Figura 5.4bc).



**Figura 5.4.** (a) Actividad lacasa. (b) pH y (c) glucosa residual para *P. ostreatus* en SBL al 10% (v/v) y *P. pastoris* en SBL al 1 y 5 % (v/v). Las barras representan la desviación estándar del promedio de tres replicas.

### 5.3.5. Cromatografía de gases acoplada a masas

Los análisis de CG-MS para el SBL inicial y postratado con *P. ostreatus* y *P. pastoris* viables se presentan en la [tabla 5.2](#). Los compuestos identificados en el SBL sin tratamiento fueron: Phenol 2,4-methyl RT= 10.47, Phenol 2,4-dichloro RT: 11.36 y 2,6-Dimethoxyphenol RT=15.96. La presencia de clorofenoles podría relacionarse con el proceso de extracción empleado, bajo estas condiciones los anillos aromáticos libres son inestables y pueden sufrir procesos de clorinacion por la presencia de pequeñas cantidad de cloro libre en el agua. Los resultados demostraron que los dos hongos realizaron un proceso de biotransformación de los compuestos fenólicos clorado y no clorados, pero la forma y secuencia como la hacen varió para la cepa nativa y la cepa recombinante.

En los resultados del SBL postratado con *P. ostreatus* se evidenció la desaparición de ciertos compuestos identificados en SBL sin tratamiento, como el Phenol 2,4- di methyl, Phenol 2,4-dichloro y 2,6-Dimethoxyphenol. Las enzimas producidas por *P. ostreatus* pudieron realizar demetilaciones del Phenol 2,4-dimethyl tanto en posición 2 como 4, para generar Phenol 2-methyl y Phenol 4-methyl. En relación con el Phenol 2,4-dichloro también se evidencio una declorinacion de este compuesto en posición 2 y 4; generando la eliminación del SBL postratado. Otra biotransformación que se evidenció fue la demetoxilacion en posición 6 del dimethoxyphenol para formar 2 methoxyphenol, el cual no estaba presenten en el SBL inicial. Este compuesto es considerado como uno de los intermediarios aromáticos finales de la degradación de lignina y se reportado que tiene efecto bactericida e inhibitorio sobre muchas semillas y plantas [34], (Tabla 5.2).

En el SBL pos tratado con *P. pastoris* se obtuvieron mayor variedad de compuestos fenólicos clorados y no clorados, como: Phenol 2-chloro, phenol 2,4 dichloro, Phenol 2-methyl, Phenol 4-methyl, 2-Methoxyphenol y 2-methoxy-4-ethyl-phenol. La presencia de phenol 2 methyl, pheno 4 methyl y 2 methoxyphenol, en los dos SBL postratados demostró que la biotransfomacion de los precursores (Phenol 2,4- Di methyl y 2,4-dimethoxyphenol) está siendo realizada por la enzima lacasa. Ya que en *P. pastoris* sólo se está expresando un único tipo de lacasa regulada por el promotor constitutivo *pGap* que regula la producción de la enzima heterologa. En relación con los compuestos aromáticos clorados, se evidenció que la capacidad de declorinacion en *P. pastoris* es diferente que con *P. ostreatus*. En *P. pastoris* se detectó 2,4- diclorofenol y el 2-clorofenol, lo que estaría indicando que para la levadura puede faltar un ciclo de declorinacion, más tiempo de proceso o no puede realizar declorinaciones en posición 4.

La literatura reporta que para compuestos aromáticos clorados las enzimas ligninolíticas pueden realizar diferentes procesos como oxidación, demetilaciones, reducción de benzoquinonas, hidroxilaciones y dehalogenaciones reductivas [38]. Otro factor fundamental que se ha estudiado es número y posición de los átomos de cloro (orto, meta y para), siendo más difíciles de remover los cloros en posición meta. Esto limita la capacidad de biotransformación y la velocidad de la reacción [8, 39].

**Tabla 5.2.** Compuestos fenólicos identificados por CG-MS del licor inicial SBL y las muestras tratadas con *P. ostreatus* and *P. pastoris*.

RT (min)	Presente en					Compuestos
	a	b	c	d	e	
7.83	-	-	+	-	+	Phenol 2-chloro
8.90	-	+	+	-	-	Phenol 2-methyl
9.29	-	+	+	-	-	Phenol 4-methyl
10.28	-	-	-	-	-	Phenol 2-nitro
10.47	+	-	-	-	-	Phenol 2,4- di methyl
11.36	+	-	+	-	-	Phenol 2,4-dichloro
13.26	-	-	-	-	-	Phenol 2,3,5-trichloro
13.59	-	-	-	-	-	Phenol 2,4,5-trichloro
14.68	-	+	+	-	-	2-Methoxyphenol (guayacol)
15.96	+	-	-	-	-	2,6-Dimethoxyphenol (sirongol)
16.38	-	-	+	-	-	2-methoxy-4-ethyl- phenol (4-ethyl guaia- col)
19.04	-	-	-	-	-	3-allyl-6-methoxyphenol (m-eugenol)

RT: tiempo de retención (min); **a:** Fenol inicial en SBL; **b:** SBL tratado con *P. ostreatus* luego de 192 h; **c:** SBL tratado con *P. pastoris* luego de 192 h; **d:** SBL tratado con *P. ostreatus* y CuTiO<sub>2</sub> luego de 10 h; **e:** SBL tratado con *P. pastoris* y CuTiO<sub>2</sub> luego 10h. + Presente, - Ausente.

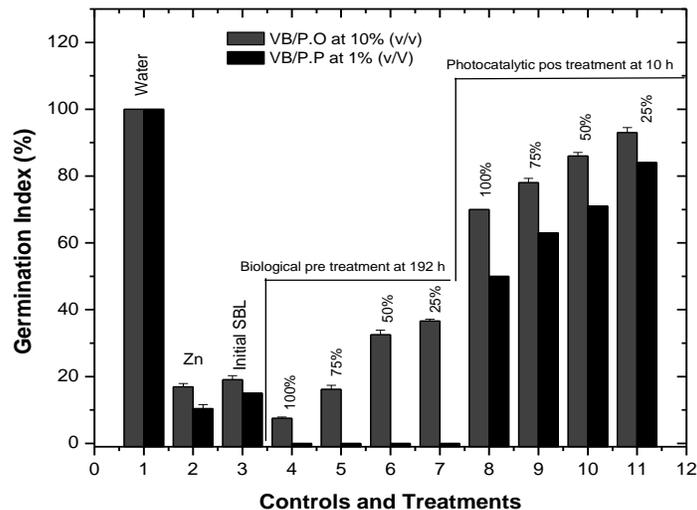
### 5.3.6. Determinación del índice de germinación para *Lactuca sativa*

Los ensayos de germinación, ponen en evidencia la respuesta que tiene un modelo biológico vegetal ante la presencia de compuestos iniciales y finales del SBL tratados con biomasa viable de *P. ostreatus* y *P. pastoris*. Con los datos obtenidos, se calculó el índice de germinación (%IG) el cual sirve como referente para evaluar la toxicidad de un efluente complejo hacia una planta. Cuando los valores de este índice son menores al 50% se considera que la sustancia genera alta fitotoxicidad sobre la planta evaluada [40].

De acuerdo con los resultados obtenidos para el SBL inicial, este licor tiene alta fitotoxicidad (18.96 %) valor similar al obtenido para el control positivo con Zn (16.9 %). Al realizar el tratamiento con la biomasa viable de *P. ostreatus* por 192 h el índice disminuyó (7.47%), lo que demuestra que la fitotoxicidad fue mayor que al inicio del experimento. A medida que el efluentes fue diluido los índices de germinación aumentaron pero no superaron el 50%, por lo

tanto el SBL pos tratado continua teniendo un efecto fitotóxico alto. Algunos autores, han realizado estudios con diferentes tipos de efluentes Kraft y observaron que las muestras iniciales tienen toxicidad elevada tanto en bacterias como en semillas de *Vigna radiata*. En el estudio de Xavier la toxicidad se incrementó, siendo similar a nuestros resultados, lo cual podría relacionarse con la presencia de resinas acidas no transformadas o resinas parcialmente decarboxiladas e intermediarios producidos por el hongo. Por otro lado, compuestos como Pheno 2-methyl, Phenol 4-methyl y 2-metoxi fenol, fueron detectados con la cromatografía de gases acoplada a masas en las muestras de SBL postratadas con *P. ostreatus*; estos compuestos de bajo peso molecular pueden pasar a través de la pared de las semillas y en interior afectan algunos procesos bioquímicos relacionados con la germinación [7], (Tabla 5.2).

En los ensayos de germinación realizados con *P. pastoris*, el efecto fitotóxico fue más alto que con *P. ostreatus* ya que el IG fue igual a cero en todas las concentraciones evaluadas (100, 75, 50 y 25 % v/v), (Figura 5.5), esto se pudo asociar con la presencia de mayor cantidad de intermediarios detectados por cromatografía. Como se observa en la Tabla 5.2 en el SBL tratado con *P. pastoris* se detectaron: phenol 2-chloro, phenol 2,4-chloro, phenol 2-methyl, phenol 4-methyl, 2 methoxyphenol y 2 methoxy-4-ethyl-phenol. La suma de todos estos compuestos con diferente grado de complejidad pudo potencializar el efecto adverso sobre las semillas. En estudios por compuestos separados Liu *et al.*, (2011) demostraron que el 2 methoxyphenol tiene efecto inhibitorio en bacterias y se considera que puede tener un efecto a nivel de membranas celulares; generando daños irreversibles en el transporte celular. Por otro lado también se ha demostrado que el 2,4-clorofenol a concentraciones de 50 y 100 mgL<sup>-1</sup> tiene efecto fitotóxico en semillas de *Lactuca sativa* [42].



**Figura 5.5.** Determinación del índice de germinación para biomasa viable de *P. ostreatus* y *P. pastoris* viable a las 192 h (sección **a** de la gráfica). Índices de germinación para efluentes de *P. ostreatus* y *P. pastoris* pos tratados con fotocatalisis visible usando Cu/TiO<sub>2</sub> por 5 h (sección **b** de la gráfica). Las barras representan la desviación estándar del promedio de tres replicas.

### 5.3.7. Ciclos de operación

La determinación del número de ciclos de operación en que la biomasa viable puede ser reutilizada hace parte una serie pruebas que se deben hacer para determinar la factibilidad económica que podrían tener este tipo de tecnologías, ya que el uso de la biomasa en un único ciclo limitaría la eficiencia. De acuerdo con los resultados obtenidos para *P. ostreatus* se demostró que la biomasa viable puede ser reutilizada por 3 ciclos continuos de operación que equivalen a 576 h ya que no se observaron diferencias significativas entre ciclos para la decoloración, remoción de DQO, COT y lignina (valores de  $p < 0.0001$ ). La actividad lacasa y el crecimiento radial de la biomasa reflejó la funcionalidad del hongo por largos períodos de tiempo; lo que favorecería la remoción por biotransformación y por adsorción. La disminución en la actividad y menor crecimiento de la biomasa en los ciclos 4 y 5, se podrían relacionar con la saturación de la biomasa, formación de intermediarios que se adsorben a la pared fúngica y que generaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la actividad enzimática. La versatilidad de los hongos ligninolíticos para operar por varios ciclos ha sido reportada por varios autores. [Castillo \(2012\)](#) demostró que la biomasa viable de *T. versicolor* pudo ser utilizada por 3 ciclos continuos de 7 días para la remoción de colorantes azoicos sin que la decoloración disminuyera más del 50%. Por otro lado, cuando se utiliza lacasa inmovilizada de *P. sajor-caju*

para oxidación de compuesto fenólicos la estabilidad puede alcanzar hasta 14 ciclos. Estos resultados demostraron que la inmovilización de la enzima es una estrategia tecnológica que favorece la reutilización y la estabilidad de las enzima [14].

Para los ensayos de ciclos con *P. pastoris* sólo se utilizó SBL al 1 % (v/v). De acuerdo con los resultados, la levadura recombinante se podría realizar tres ciclos consecutivos para la remoción de COD, ya que no se observaron diferencias significativas entre los tres ciclos ( $p>0.0001$ ). Sin embargo, la remoción de color y lignina, disminuye a medida que se realizan más ciclos, lo que podría estar relacionado con la acumulación y adsorción de compuestos clorados (2,4 clorofenol y 4 clorofenol). En relación con la viabilidad de la levadura y la actividad enzimática se mantienen por 4 ciclos (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3.** Ciclos operativos: Porcentaje de decoloración con biomasa viable de *P. ostreatus* and *P. pastoris*

<i>Pleurotus ostreatus</i> viable al 10 % (v/v)					
Parámetro	C1	C2	C3	C4	C5
COD (%)	94±0.4 <sup>a</sup>	94±0.3 <sup>a</sup>	94±0.3 <sup>a</sup>	69±1 <sup>b</sup>	66±2 <sup>b</sup>
Lignina (%)	78±1.2 <sup>a</sup>	82±2 <sup>a</sup>	70±1.5 <sup>a</sup>	51±0.5 <sup>b</sup>	37±3.8 <sup>c</sup>
Remoción de color (%)	78.3±0.8 <sup>a</sup>	77.5±1.1 <sup>a</sup>	74.7±0.7 <sup>a</sup>	68.2±2 <sup>b</sup>	31.5±1 <sup>c</sup>
Crecimiento mm	90±9 <sup>a</sup>	80±5 <sup>b</sup>	66±5 <sup>c</sup>	20±0.1 <sup>e</sup>	10±0.3 <sup>f</sup>
Actividad Lacasa (U/L)	1159±51 <sup>a</sup>	1028±29 <sup>b</sup>	1018±34 <sup>c</sup>	628±16 <sup>d</sup>	596±41 <sup>d</sup>

<i>Pichia pastoris</i> viable al 1% (v/v)					
Parametro	C1	C2	C3	C4	C5
COD (%)	87.1±5.5 <sup>a</sup>	87±3.5 <sup>a</sup>	84.3±5.0 <sup>ab</sup>	79.7±7.0 <sup>b</sup>	53±1.8 <sup>c</sup>
Lignina (%)	76±2.8 <sup>a</sup>	68±1.6 <sup>ab</sup>	61±1.2 <sup>b</sup>	46±5.7 <sup>c</sup>	30±2.6
Remoción de color (%)	61±1.7 <sup>a</sup>	58±1.9 <sup>ab</sup>	18±1.2 <sup>c</sup>	17±0.9	5.3±0.5
Crecimiento	6.7±0.01 <sup>a</sup>	6.7±0.4 <sup>a</sup>	6.5±0.6 <sup>a</sup>	6.9±0.4 <sup>a</sup>	5.5±0.2 <sup>b</sup>

Log <sub>10</sub> FCU/mL					
Actividad Lacasa (U/L)	1315±49 <sup>a</sup>	1126±11 <sup>a</sup>	1091±9 <sup>b</sup>	803±19 <sup>c</sup>	602±49 <sup>d</sup>

#### 5.4. Conclusiones

Finalmente, los resultados obtenidos a escala de laboratorio con los dos hongos permitieron demostrar que son microorganismos con potencial para la biorremediación de licor de pulpeo y podrían utilizarse por varios ciclos de operación. Sin embargo, se hace necesario complementar el tratamiento con otra tecnología para eliminar los intermediarios que están afectando la germinación de semillas de *L. sativa*. Por otro lado, nuestros resultados dejan abierta la posibilidad de usar este tipo de tecnologías secuenciales, usando inicialmente tratamiento biológico y seguido del tratamiento fotocatalítico, no sólo para dar cumplimiento con la normatividad ambiental vigente sino que también podrían ser utilizados en otras etapas de la industria papelera como el pulpeo biológico acoplado a pulpeo químico, obtención de subproductos de alto valor agregado para la industria química y farmacéutica, usando el licor negro como materia prima. Todas estas posibilidades deben explorarse y podrían ayudar a las empresas en el fortalecimiento de programas de producción más limpia manteniendo un desarrollo sostenible y amigable con el medio ambiente.

## 5.5. Referencias

1. Kamali M, Khodaparast Z. Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2015; 114: 326-342.
2. Irfan M, Butt T, Imtiaz N, Abbas N, Khan RA, Shafique A. The removal of COD, TSS and colour of black liquor by coagulation–flocculation process at optimized pH, settling and dosing rate, *Arabian Journal of Chemistry* 2013; IN PRESS.
3. Lei Y, Liu S, Li J, Sun R. Effect of hot-water extraction on alkaline pulping of bagasse, *Biotechnology Advances* 2010; 28: 609-612.
4. Sarwar Jahana M, Shamsuzzaman M, Mostafizur Rahman M, Iqbal Moeiz SM, Ni Y. Effect of pre-extraction on soda-anthraquinone (AQ) pulping of rice straw, *Industrial Crops and Products* 2012; 37: 164-169.
5. Chávez-Sifontes M, Domine ME. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial, *Avances en Ciencias e Ingeniería* 2013; 4 (4): 15-46.
6. Sharma A, Thakur VV, Shrivastava A, Jain RK, Mathur RM, Gupta R, Kuhad RC. Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: A pilot scale study, *Bioresource Technology* 2014; 169: 96-102.
7. Ali M, Sreekrishnan TR. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review, *Advances in Environmental Research* 2001; 5: 175-196.
8. Menale C, Nicolucci C, Catapane M, Rossi S, Bencivenga U, Mita DG, Diano N. Optimization of operational conditions for biodegradation of chlorophenols by laccase-polyacrylonitrile beads system, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2012; 78: 38-44.
9. Vlastos D, Antonopoulou M, Konstantinou I. Evaluation of toxicity and genotoxicity of 2-chlorophenol on bacteria, fish and human cells, *Science of the Total Environment* 2016; 551-552: 649-655.
10. Raj A, Reddy MMK, Chandra R. Identification of low molecular weight aromatic compounds by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) from kraft lignin degradation by three *Bacillus* sp., *International Biodeterioration & Biodegradation* 2007; 59: 292-296.
11. Haq I, Kumar S, Kumari V, Singh SK, Raj A. Evaluation of bioremediation potentiality of ligninolytic *Serratia liquefaciens* for detoxification of pulp and paper mill effluent, *Journal of Hazardous Materials* 2016; 305: 190-199.
12. Leiviska T, Nurmesniemi H, Poykio R, Ramo J, Kuokkanen T, Pellinen J. Effect of biological wastewater treatment on the molecular weight distribution of soluble organic compounds and on the reduction of BOD, COD and P in pulp and paper mill effluent, *Water Research* 2008; 42: 3952-3960.
13. Gulsoy SK, Eroglu H. Biokraft pulping of European black pine with *Ceriporiopsis subvermispora*, *International Biodeterioration & Biodegradation* 2011; 65: 644-648.
14. Salis A, Pisano M, Monduzzi M, Solinas V, Sanjust E. Laccase from *Pleurotus sajor-caju* on functionalised SBA-15 mesoporous silica: Immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2009; 58: 175–180.
15. Moldes D, Vidal T. Laccase–HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp: Influence of the operating conditions, *Bioresource Technology* 2008; 99: 8565–8570.

16. Ortega-Clemente A, Caffarel-Méndez S, Ponce-Noyola MT, Barrera-Córtés J, Poggi-Valardo HM. Fungal post-treatment of pulp mill effluents for the removal of recalcitrant pollutants, *Bioresource Technology* 2009; 100: 1885-1894.
17. Freitas AC, Ferreira F, Costa AM, Pereira R, Antunes SC, Gonçalves F, Rocha-Santos TAP, Diniz MS, Castro L, Peres I, Duarte AC. Biological treatment of the effluent from a bleached kraft pulp mill using basidiomycete and zygomycete fungi, *Science of the Total Environment* 2009; 407: 3282-3289.
18. Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V, Giovanni S. Heterologous laccase production and its role in industrial applications *Bioengineered Bugs* 2010; 1 (4): 252-262.
19. Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poveda-Cuevas SA, Reyes-Guzmán EA, Poutou-Piñales RA, Reyes-Montañó EA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Cardozo-Bernal ÁM. Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes *GLCC1* from *Ganoderma lucidum* and *POXA 1B* from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*, *Plos One* 2015; 10 (1): e0116524.
20. Morales-Álvarez ED, Rivera-Hoyos CM, Chaparro-Núñez LE, Daza CE, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM. Decolorization and detoxification of Malachite Green by *Ganoderma lucidum*: Determination of key operating parameters and adsorption studies, *Journal of Environmental Engineering* 2016; Submitted to Journal.
21. Poutou RA, Amador E, Candelario M. Banco de células primario (BCP): Caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes., *Biotecnología Aplicada* 1994; 11 (1): 55-59.
22. Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Cardozo-Bernal AM, Albarracín-Pardo DA, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Díaz-Rincón DJ, Rodríguez A, Alméciga-Díaz CJ, Rodríguez-Vázquez R, Cuervo-Patiño CL. Media improvement, low scale production, purification and characterization of POXA 1B recombinant laccase expressed in *Pichia pastoris*, *Plos One* 2016; Submitted.
23. Shintani N, Shoda M. Decolorization of oxygen-delignified bleaching effluent and biobleaching of oxygen-delignified kraft pulp by non-white-rot fungus *Geotrichum candidum* Dec 1, *Journal of Environmental Sciences* 2013; 25 (S): S164-S168.
24. Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains, *Letters in Applied Microbiology* 2001; 32: 331-335.
25. Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry* 1959; 31 (3): 426-428.
26. Rojas-Higuera N, Sánchez-Garibello A, Matiz-Villamil A, Salcedo-Reyes JC, Carrascal-Camacho AK, Pedroza-Rodríguez AM. Evaluación de tres métodos para la inactivación de coliformes y *Escherichia coli* presentes en agua residual doméstica, empleada para riego, *Universitas Scientiarum* 2010; 15 (2): 139-149.
27. Celis J, Sandoval M, Zagal E, Briones M. Effect of sewage sludge and salmon wastes applied to a Patagonian soil on lettuce (*Lactuca Sativa* L.) germination, *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal* 2006; 6 (3): 13-25.
28. Zucconi F, Monaco A, Forte M, De Bertoldi M. Phytotoxins during the stabilization of organic matter, in Gasser JKR, (Eds). *Composting of Agricultural and Other Wastes*. Elsevier, London, UK, 1985, p.
29. Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Delgado-Boada JM. Fungal laccases, *Fungal Biology Reviews* 2013; 27 (3-4): 67-82.

30. Barragán-Huerta BE, Cabrera-Soto ML, Cruz MT, Pedroza-Rodríguez AM. The valorization of tequila industry agricultural waste through its use as a substrate for laccase production in a fluidized bed bioreactor, *Freawnius Environmental Bulletin* 2015; 24 (6): 2026-2034.
31. Dashtban M, Schraft H, Syed TA, Qin W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin, *Int J Biochem Mol Biol* 2010; 1 (1): 36-50.
32. Puentes-Cárdenas J, Florido-Cuellar A, Cardona-Bedoya J, Bohorquez-Echeverry P, Campos-Pinilla C, Gutiérrez-Romero V, Pedroza-Rodríguez A. Simultaneous decolorization and detoxification of black reactive 5 using TiO<sub>2</sub> deposited over borosilicate glass, *Universitas Scientiarum* 2012; 17 (1): 53-63.
33. Puentes-Cárdenas IJ, Pedroza-Rodríguez AM, Navarrete-López M, Villegas-Garrido TL, E. C-U. Biosorption of trivalent chromium from aqueous solutions by *Pleurotus ostreatus* biomass, *Environmental Engineering and Management Journal* 2012; 11 (10): 1741-1752.
34. Rojas Higuera NS, Pava Sánchez AM, Pinzón Rangel DL, Díaz Ariza LA, Quevedo Hidalgo B, Pedroza Rodríguez AM. Bio-transformed sawdust by white rot fungi used as a carrier for plant growth promoting bacteria, *European Journal of Wood and Wood Products* 2016; IN PRESS.
35. Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R. Optimization of C/N Ratio and Inducers for Wastewater Paper Industry Treatment Using *Trametes versicolor* Immobilized in Bubble Column Reactor, *Journal of Micology* 2013; 2013 (Article ID 536721): 11 pages.
36. Chen Y, Wan J, Ma Y, Tang B, Han W, Ragauskas AJ. Modification of old corrugated container pulp with laccase and laccase–mediator system, *Bioresource Technology* 2012; 110: 297-301.
37. Blanco-Vargas YA, Ramírez-Sierra CF, Duarte-Castañeda M, Beltrán-Villarraga M, Medina-Córdoba LK, Florido-Cuellar AE, Cardona-Bedoya JA, Campos-Pinilla C, Pedroza-Rodríguez AM. A novel alternative for the textile wastewater discoloration, detoxification and re use using a ligninolytic co-culture and photocatalysis with TiO<sub>2</sub>, 2014; Sometido.
38. Szatkowski L, Dybala-Defratyka A. A computational study on enzymatically driven oxidative coupling of chlorophenols: An indirect dehalogenation reaction, *Chemosphere* 2013; 91: 258-264.
39. Olaniran AO, Igbinsola EO. Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: Properties, distribution and microbial degradation processes, *Chemosphere* 2011; 83: 1297-1306.
40. Emimo ER, Warman PR. Biological assay for compost quality, *Compost Science & Utilization* 2004; 12 (4): 342-348.
41. Liu G, Liao S, Zhu D, Cio J, Zhou W. Solid-phase photocatalytic degradation of polyethylenefilm with manganese oxide OMS-2, *Solid State Science* 2011; 13: 88-94.
42. Angelini VA, Orejas J, Medina MI, Agostini E. Scale up of 2,4-dichlorophenol removal from aqueous solutions using *Brassica napus* hairy roots, *Journal of Hazardous Materials* 2011; 185: 269–274.
43. Castillo-Carvajal L, Ortega-González K, Barragán-Huerta BE, Pedroza-Rodríguez AM. Evaluation of three immobilization supports and two nutritional conditions for reactive black 5 removal with *Trametes versicolor* in air bubble reactor, *African Journal of Biotechnology* 2012; 11 (14): 3310-3320.

## **CAPÍTULO 6.**

### **ANEXOS**

## 6.1. Presentaciones en congresos relacionadas con la tesis

- 6.1.1. *Claudia Marcela Rivera Hoyos\**, *Edwin David Morales-Álvarez*, *Raúl A. Poutou-Piñales*, *Aura Marina Pedroza*, *Refugio Rodríguez*, *Julio M. Delgado-Boada*. “*Análisis computacional y diseño de una secuencia optimizada de lacasa de Pleurotus ostreatus*“. V Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Mayo 7 al 10 del 2013. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, D.C., **Colombia**. (Poster).
- 6.1.2. *Edwin David Morales-Álvarez\**, *Claudia Marcela Rivera Hoyos*, *Aura Marina Pedroza*, *Raúl A. Poutou-Piñales*, *Refugio Rodríguez*, *Julio M. Delgado-Boada*. “*Design, synthesis and cloning of a laccase gene GILCCI originated from Ganoderma lucidum* “. V Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Mayo 7 al 10 del 2013. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, D.C., **Colombia**. (Poster).
- 6.1.3. *Juan Camilo Roncallo-Sarmiento*, *Claudia Marcela Rivera Hoyos\**, *Edwin David Morales-Álvarez*, *Raúl A. Poutou-Piñales*, *Aura Marina Pedroza*, *Refugio Rodríguez*, *Julio M. Delgado-Boada*. “*Eliminación por PCR del codón de parada del gen sintético POXA 1B de Pleurotus ostreatus*“. V Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Mayo 7 al 10 del 2013. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, D.C., **Colombia**. (Poster).
- 6.1.4. *Sergio Alejandro Poveda Cuevas*, *Edwin Alfredo Reyes Guzmán*, *Edgar Antonio Reyes Montaña\**, *Raúl Alberto Poutou Piñales*, *Claudia Marcela Rivera Hoyos*, *Edwin David Morales Álvarez*, *Aura Marina Pedroza*, *Homero Sáenz Suárez*. “*Predicción y análisis de interacciones entre lacasas de Ganoderma lucidum y Pleurotus ostreatus con colorantes tóxico-industriales por docking molecular*“. Segundo Congreso Colombiano de Biología Computacional (CCBCOL). Septiembre 25 al 27. Hotel Carretero, Manizales, **Colombia**. (Presentación Oral).
- 6.1.5. *Edwin David Morales-Álvarez*, *Claudia M. Rivera-Hoyos*, *Diego A. Albarracín-Pardo*, *Raúl A. Poutou-Piñales \**, *Aura Marina Pedroza-Rodríguez*. “*Plackett-Burman statistical design to improve the culture media composition and the enzyme activity of two recombinant laccases in Pichia pastoris*“. The 6<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2015). 7-11 June 2015, Maastricht, **Netherlands** (Poster).
- 6.1.6. *Claudia M. Rivera-Hoyos*, *Edwin D. Morales-Álvarez*, *María Fernanda Rojas-Fajardo*, *Luis Miguel Chávez-Tequia*, *Angela María Cardozo-Bernal*, *Raúl A. Poutou-Piñales\**, *Eliana María González-Neira*, *Aura Marina Pedroza-Rodríguez*. “*Sequential statistical designs for improvement a recombinant laccase production in Pichia Pastoris immobilized cells*“. The 6<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2015). 7-11 June 2015, Maastricht, **Netherlands** (Poster).
- 6.1.7. *Edwin David Morales-Álvarez*, *Claudia M. Rivera-Hoyos*, *Diego A. Albarracín-Pardo*, *Raúl A. Poutou-Piñales\**, *Aura Marina Pedroza-Rodríguez*. “*Estabilidad y propiedades cinéticas de las lacasas recombinantes POXA 1B y GILCCI*“. XX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, IX Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, XIV Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. 16-18 Marzo 2016, Boca del Rio, Veracruz, **México** (Poster).

## 6.2. Publicaciones hechas o sometidas relacionadas con la tesis

- 6.2.1. Claudia Marcela Rivera-Hoyos, Edwin David Morales-Álvarez, Raúl A. Poutou-Piñales\*, Aura Marina Pedroza-Rodríguez\*, Refugio Rodríguez-Vázquez, Julio M. Delgado-Boada. (2013) “*Fungal laccases*”. **Fungal Biology Reviews**. 27(3-4): 67-82. ISSN: 1749-4613, United Kindon. Editorial Elsevier (Scopus, Publindex A1, etc), (SJR2012 1.346-Q2).
- 6.2.2. Homero Sáenz-Suárez\*, Claudia M. Rivera-Hoyos, Edwin David Morales-Álvarez, Raúl A. Poutou-Piñales, José A. Sáenz-Moreno, Aura M. Pedroza-Rodríguez. (2014) “*Modelación computacional preliminar de la estructura 3D de dos lacasas fúngicas*”. **Salud Arte y Cuidado**: 7(1): 5-16. ISSN: 1856-9528, Venezuela. Editorial Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado. (Imbiomed, Dialnet, Revencyt, Latindex, Doaj, Scirus, Academic Journals, etc).
- 6.2.3. Claudia M. Rivera-Hoyos, Edwin David Morales-Álvarez, Sergio Alejandro Poveda-Cuevas, Edwin Alfredo Reyes-Guzmán, Raúl A. Poutou-Piñales, Edgar Antonio Reyes-Montaño, Aura Marina Pedroza-Rodríguez, Refugio Rodríguez-Vázquez, Angela M. Cardozo-Bernal (2015) “*Computational Analysis and Low-Scale Constitutive Expression of Laccases Synthetic Genes GLCC1 from Ganoderma lucidum and POXA 1B from Pleurotus ostreatus in Pichia pastoris*”. **PLOS ONE** (SJR<sub>2015</sub>: 1.395-Q<sub>1</sub>)1-21 DOI:10.1371/journal.pone.0116524.
- 6.2.4. Edwin D. Morales-Álvarez, Claudia M. Rivera-Hoyos, Laura Stephanie Chaparro, Natalia González Ogliastrri, Carlos Enrique Daza, Raúl A. Poutou-Piñales, Aura Marina Pedroza-Rodríguez\* (2016) “*Decolorization and detoxification of Malachite Green by Ganoderma lucidum: determination of key operating parameters and adsorption studies*”. **Journal of Environmental Engineering (ASCE)**. IN PRESS 06-09-2016. ISSN: 0733-9372, United States of America. Editorial American Society of Civil Engineers (ASCE), (ISI, Scopus, etc), (SJR<sub>2014</sub>: 0.499-Q<sub>2</sub>). doi: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001180
- 6.2.5. Edwin David Morales-Álvarez, Claudia M. Rivera-Hoyos, Natalia González Ogliastrri, Refugio Rodríguez Vazquez, Raúl A. Poutou-Piñales, Carlos E. Daza, Aura Marina Pedroza-Rodríguez\* (2016) “*Partial detoxification and removal of Malachite Green and Crystal Violet from laboratory artificially contaminated water by Pleurotus ostreatus*”. **Universitas Scientiarum**. Aceptado. ISSN: 0122-7483, Colombia. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. (Scopus, etc), (SJR<sub>2014</sub>: 0.115-Q<sub>4</sub>).

## 6.3. Otras publicaciones hechas o sometidas en el período de tesis

- 6.3.1. Edwin David Morales-Álvarez, Claudia Marcela Rivera-Hoyos, Angélica María Baena-Moncada, Patricia Landázurri\*, Raúl A. Poutou-Piñales\*, Homero Sáenz-Suárez, Luis A. Barrera-Avellaneda, Olga Y. Echeverri-Peña (2013) “*Low scale expresión and purification of putative active iduronate 2-sulfate sulfatase-Like from E. coli K12*”. **The Journal of Microbiology**. 51(2): 213-221. ISSN: 1225-8873, South Korea. Editorial Springer (ISI, Scopus, etc), (SJR<sub>2012</sub>: 0.542-Q<sub>3</sub>).

- 6.3.2.** *Edwin David Morales-Álvarez, Claudia Marcela Rivera-Hoyos, Patricia Landázuri\*, Raúl A. Poutou-Piñales, Aura Marina Pedroza-Rodríguez* (2016) *Bioinformatic analysis of the human recombinant iduronate 2-sulfate sulfatase*. **The Open Microbiology Journal**. 10(1): 124-132. **ISSN:** 1874-2858, **Netherlands**. Editorial Bentham Science Publishers B.V. (Scopus, etc), (**SJR**<sub>2014</sub>: **0.873-Q<sub>2</sub>**).