

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA**

# **TESIS**

**“EXPRESIÓN DEL GEN LACASA EN *Trametes hirsuta* Bm-2  
DURANTE SU CULTIVO EN RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS”**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**BIOL. TANIA ROMINA ISLAS SOLIS**

ASESOR:

**DRA. SARA ELENA SOLÍS PEREIRA**

CO-ASESOR:

**DR. RAÚL TAPIA TUSSELL**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.

29 DE JUNIO DE 2016



DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.  
No. DE OFICIO: X-134/2016

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

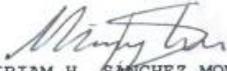
MÉRIDA, YUCATÁN A 31 DE MAYO DE 2016

C. TANIA ROMINA ISLAS SOLIS  
PASANTE DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LOS  
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

De acuerdo al fallo emitido por su asesora la Dra. Sara Elena Solis Pereira, y la comisión revisora integrada por el Dr. Raúl Tapia Tussell, el Dr. Gabriel Lizama Uc y el Dr. Luis Fernando Cuevas Glory, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

**"Expresión del gen Lacasa en Trametes hirsuta Bm-2 durante su cultivo en residuos lignocelulósicos"**

ATENTAMENTE  
IN HOC SIGNO VINCES

  
M.C. MIRIAM H. SANCHEZ MONROY  
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Cp. Archivo  
MHSM/ija.



---

## **Dedicatoria**

*A mis padres,  
por enseñarme lo necesario para llegar hasta donde estoy.*

---

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, la Dra. Sara Elena Solís Pereira y el Dr. Raúl Tapia Tussell por todo el apoyo, conocimientos, tiempo y confianza brindados durante la elaboración de este trabajo.

A mis revisores de tesis, Dr. Gabriel Lizama Uc y Dr. Luis Fernando Cuevas Glory, por sus aportaciones para la mejora del documento.

Al Instituto Tecnológico de Mérida, y al Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán por las instalaciones y los equipos brindados para la realización de este trabajo.

Al I.Q.I. Alberto Cortés Velásquez por todo el apoyo técnico durante la fase experimental del trabajo.

Al CONACYT por el financiamiento otorgado al Proyecto: Atención a Demandas Nacionales. Clave: 248295.

Al CONACYT por la beca otorgada durante la maestría. Clave: 288233

A todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Microbiana y del Laboratorio GemBio que hicieron más amena mi estancia.

---

## ÍNDICE

|   |      |
|---|------|
| RESUMEN .....                                     | viii |
| 1. INTRODUCCIÓN .....                             | 10   |
| 2. MARCO TEÓRICO.....                             | 13   |
| 2.1 Lacasas.....                                  | 13   |
| 2.2 Propiedades moleculares de las Lacasas .....  | 14   |
| 2.3 Mecanismo de acción.....                      | 17   |
| 2.4 Producción de lacasas .....                   | 19   |
| 2.5 Genes de lacasas.....                         | 20   |
| 2.6 Regulación de la expresión génica.....        | 21   |
| 2.6.1 PCR en tiempo real.....                     | 22   |
| 2.7 Regulación de la expresión de lacasas .....   | 27   |
| 2.8 Secuencias promotoras.....                    | 33   |
| 2.9 Aspectos biotecnológicos de las lacasas ..... | 35   |
| 2.9.1 Industria textil.....                       | 35   |
| 2.9.2 Industria papelera .....                    | 36   |
| 2.9.3 Industria alimentaria.....                  | 37   |
| 2.9.4 Industria farmacéutica.....                 | 38   |
| 2.9.5 Nanobiotecnología .....                     | 38   |
| 2.9.6 Biorremediación de suelos.....              | 39   |
| 2.9.7 Química sintética .....                     | 40   |
| 2.9.8 Cosmética.....                              | 40   |
| 2.10 <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2.....            | 40   |
| 3. HIPÓTESIS .....                                | 42   |
| 4. JUSTIFICACIÓN .....                            | 43   |
| 5. OBJETIVOS .....                                | 44   |
| 5.1 OBJETIVO GENERAL .....                        | 44   |
| 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                   | 44   |

---

|   |    |
|---|----|
| 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....  | 45 |
| 7. METODOLOGÍA.....   | 46 |
| 7.1 Microorganismo .....  | 46 |
| 7.2 Producción del inóculo .....  | 46 |
| 7.3 Preparación de residuos lignocelulósicos.....   | 46 |
| 7.4 Producción de lacasas .....   | 47 |
| 7.5 Actividad de la lacasa.....   | 48 |
| 7.6 Cuantificación de azúcares reductores.....  | 48 |
| 7.7 Aislamiento de ARN total y síntesis de cDNA .....   | 48 |
| 7.8 Amplificación del gen lacasa mediante qPCR .....  | 49 |
| 7.9 Estrategia de cuantificación y normalización de los datos de qPCR .....                                   | 50 |
| 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 51 |
| 8.1 Efecto de los residuos lignocelulósicos en la producción de lacasa de <i>Trametes hirsuta</i> (Bm-2)..... | 51 |
| 8.2 Dinámica transcripcional de lacasas en sustratos lignocelulósicos y medio mínimo .....                    | 58 |
| 8.3 Análisis de la expresión génica con el método $\Delta\Delta^{Cq}$ .....                                   | 62 |
| 8.4 Análisis de los niveles de expresión y actividad enzimática .....   | 66 |
| 9. CONCLUSIONES.....  | 69 |
| 10. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....   | 70 |
| 11. REFERENCIAS.....  | 71 |

---

## LISTA DE FIGURAS

|  |            |
|--|------------|
| <i>Figura 2.1 Sitio activo de la lacasa de Bacillus subtilis.....</i>  | <i>15</i>  |
| <i>Figura 2. 2 Representación cinta de la estructura cristalográfica de rayos X de la lacasa de Trametes versicolor.....</i>   | <i>16</i>  |
| <i>Figura 2.3 Mecanismo de acción de la lacasa.....</i>  | <i>18</i>  |
| <i>Figura 2.4 Marcadores fluorescentes para PCR en tiempo real. A) SYBR Green; B) Sondas de hidrólisis .....</i>   | <i>24</i>  |
| <i>Figura 2.5 Curva de amplificación de ADNc.....</i>  | <i>25</i>  |
| <i>Figura 2.6 Curva de fusión de ADNc.....</i>   | <i>25</i>  |
| <i>Figura 8.1 Cinética de producción de lacasa en cultivos sumergidos de Trametes hirsuta Bm-2 inducidos con diferentes residuos lignocelulósicos a 35 °C durante 240 horas. ....</i>  | <i>522</i> |
| <i>Figura 8.2 Consumo de glucosa medido como azúcares reductores en cultivos sumergidos de Trametes hirsuta Bm-2 inducidos con diferentes residuos lignocelulósicos a 35 °C durante 240 horas. ....</i>  | <i>555</i> |
| <i>Figura 8.3 Cinética de transcriptos del gen lacasa en Trametes hirsuta Bm-2 crecido en medio mínimo y medios inducidos. Las barras de error representan el error estándar. ....</i>   | <i>59</i>  |
| <i>Figura 8.4 Mapa de calor de los transcriptos del gen lacasa en Trametes hirsuta Bm-2 crecido en medio mínimo y medios inducidos. ....</i>   | <i>61</i>  |
| <i>Figura 8.5 A) Expresión relativa del gen lcc de Trametes hirsuta Bm-2 comparada con la expresión del cultivo sin inducción de acuerdo al método <math>\Delta\Delta CT</math>. Las barras representan el error estándar. B) Mapa de calor de expresión relativa.....</i> | <i>65</i>  |
| <i>Figura 8.6 Figura 8.5 Correlación de producción de lacasa y expresión del gen lcc en residuos de toronja (A) y salvado de trigo (B). ....</i>   | <i>68</i>  |

## LISTA DE TABLAS

|   |            |
|---|------------|
| <i>Tabla 2.1 Principales compuestos fenólicos estudiados en diferentes especies de hongos .....</i> | <i>31</i>  |
| <i>Tabla 8.1 Niveles máximos de producción de lacasas en los cultivos .....</i>                     | <i>533</i> |

---

## RESUMEN

La lignina presente en la lignocelulosa es un polímero heterogéneo muy difícil de degradar y solo los hongos de la podredumbre blanca son eficientes para degradar la lignina, donde las lacasas tienen un papel predominante. Las lacasas son enzimas que tienen amplia especificidad de sustratos y un gran potencial de aplicación en biorremediación, biopulpeo y síntesis orgánica, entre otros. Las principales dificultades del uso de lacasas son el alto costo de producción y el bajo nivel de enzimas. La adición de residuos lignocelulósicos al medio de cultivo puede inducir la producción de lacasas y favorecer su aplicación. Asimismo, el conocimiento de la regulación transcripcional de este gen en estos sustratos es importante para obtener información de las lacasas de este hongo y que podría ser usada para establecer estrategias de sobreproducción de estas enzimas. En este estudio se examinaron los niveles de producción de lacasas durante 240 horas de cultivo de *Trametes hirsuta* Bm-2 en medios suplementados con cáscara de toronja, naranja, mandarina, plátano y salvado de trigo que se usaron como inductores y en medio salino que se utilizó como control no inducido. El RNA fue extraído del micelio obtenido a diferentes tiempos de cultivo para analizar la expresión del gen lacasa usando la transcripción reversa cuantitativa (RT-qPCR). Se tomó como gen de referencia la  $\beta$ -actina para la normalización y determinación de la eficiencia de la reacción, lo que permitió la estimación adecuada de la expresión génica relativa. La actividad de lacasas en los extractos libres de células fue medida empleando ABTS como sustrato. Los resultados mostraron que en todos los medios suplementados con los residuos se incrementó la actividad de lacasas con respecto al medio salino, sin embargo, los perfiles de producción de lacasas variaron en función del sustrato. La máxima actividad obtenida fue de 5655 y 3515 U/mL a las 96h con toronja y naranja respectivamente, que representa un incremento de 81 y 58 veces con respecto al control. El nivel de los transcritos de lacasas mostró variaciones en los diferentes tiempos de cultivo. Los mayores niveles de expresión fueron alcanzados en el tratamiento con salvado de trigo. Los valores máximos de expresión relativa se obtuvieron a las 240 y 96 h (12.8 y 10.49 ER), mientras que para el tratamiento de

---

toronja el máximo nivel de expresión fue detectado a las 144 h con un valor de 6.71 ER. Es importante señalar que no hubo correlación directa en las cinéticas de actividad de lacasas y la expresión relativa del gen. Se requiere realizar más estudios para esclarecer estas diferencias, sin embargo los resultados sugieren que: a) durante el curso del cultivo se producen diferentes isoenzimas que difieren en su afinidad por el sustrato ABTS, lo que se refleja en incremento o decremento de actividad de lacasas. Otra posibilidad es que la composición de fenoles en los extractos enzimáticos, varía durante el cultivo y éstos difieren en su acción como mediadores redox favoreciendo o no la oxidación del ABTS por las lacasas.

Los hallazgos revelan un claro efecto de la cáscara de toronja y salvado de trigo en la inducción transcripcional de lacasas en *Trametes hirsuta* Bm-2. Asimismo, este estudio representa un modelo de la inducción de lacasas que contribuye a la escasa información reportada en desechos agroindustriales y que pueden contribuir al desarrollo de procesos para la producción comercial de lacasas.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas ( $\rho$ -difenol: oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) son fenol oxidasas que catalizan la oxidación de una gran variedad de compuestos fenólicos y aminas aromáticas usando oxígeno molecular como aceptor de electrones, y participan en la producción de radicales libres (Guillén *et al.*, 2000) involucrados en la degradación y transformación de la lignina, fenoles y diversos compuestos xenobióticos (Ashger *et al.*, 2008).

Debido a su inespecificidad, las lacasas han sido estudiadas por su uso potencial en diversas aplicaciones industriales que incluyen el bi blanqueo de la pulpa de papel, la decoloración de tintes, la detoxificación de contaminantes ambientales y la revalorización de desechos y aguas residuales (Jurado *et al.*, 2009; Madhavi y Lele, 2009; Mayer y Staples, 2002; Saparrat *et al.*, 2010).

Los hongos de la podredumbre blanca son los más eficientes organismos productores de lacasas. La mayor parte de ellos producen varias lacasas que pueden estar codificadas por familias multigenes (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2007; Valderrama, *et al.*, 2003). Esta redundancia de genes usualmente involucra diferencias en sus propiedades físico químicas y cinéticas, mecanismos de regulación y localización (Crowe y Olsson, 2001; Missall *et al.*, 2005), lo que sugiere funciones fisiológicas diferentes relacionadas con la nutrición, morfogénesis e interacciones con el medioambiente.

Las lacasas como la mayor parte de las enzimas se regulan a nivel transcripcional, algunas son expresadas constitutivamente, otras son inducibles y se producen en respuesta a señales reguladoras (Cordoba-Cañero y Roncero, 2008; Missall *et al.*, 2005) y pueden ser sensibles a represión catabólica. La síntesis y secreción de enzimas puede estar influenciada por el nivel de nutrientes, las condiciones de cultivo, la etapa de desarrollo, así como la adición de inductores al medio de cultivo. La transcripción de genes de lacasas es a menudo regulada por iones metálicos (Galhaup *et al.*, 2002a), compuestos aromáticos y fenólicos derivados de la lignina

(Terrón *et al.*, 2004), nitrógeno (Collins y Dobson, 1997) y carbono (Soden y Dobson, 2001) entre otros.

En las últimas décadas se han evaluado diversas estrategias para incrementar la productividad y mejorar las propiedades bioquímicas de las lacasas. La mayor parte de los estudios se han llevado a cabo adicionando fenoles relacionados estructuralmente a la lignina o derivados de la lignina. Los niveles de inducción varían de acuerdo al organismo y parece ser específica a ciertos compuestos aromáticos. Sin embargo estos compuestos son caros y en algunos casos tóxicos por lo que en la práctica su aplicación no resulta factible.

La utilización de residuos lignocelulósicos es otra alternativa para incrementar la producción de lacasas ya que estos residuos contienen lignina, que inducen la síntesis de enzimas ligninolíticas. Además, estos sustratos contienen azúcares que favorecen el crecimiento del hongo. El uso de estos residuos no solo provee una alternativa como sustrato, sino también contribuye a reducir o evitar problemas de contaminación ambiental (Risdianto *et al.*, 2010; Neifar *et al.*, 2011). En estos estudios generalmente se han establecido el efecto inductor a través del incremento en la actividad de lacasas usando residuos lignocelulósicos con respecto a la producida en un medio mínimo, sin embargo, es muy escasa la información de la expresión de lacasas a nivel transcripcional en sustratos agroindustriales.

La transcripción reversa seguida de qPCR representa una herramienta poderosa para amplificar y cuantificar cantidades traza de RNAm. Este método es considerado un buen estándar para medir la expresión génica por su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (Pfaffl, 2004; Qin *et al.*, 2006), lo que permite determinar los niveles de expresión de lacasas en el curso del cultivo. Esta técnica requiere la selección cuidadosa y validación de genes de referencia (estándares internos) los cuales son procesados en paralelo con el gen blanco.

*Trametes hirsuta* Bm2 es un hongo nativo de la península de Yucatán que produce lacasas extracelulares (Tapia-Tussel *et al.*, 2011). Estas enzimas han demostrado

elevado poder de decoloración de tintes y efluentes industriales. Recientemente se obtuvo la secuencia parcial de un gen lacasa de *T. hirsuta* que presenta características moleculares semejantes a la de otras lacasas de hongos y también se ha identificado la presencia de al menos otros dos genes que codifican para lacasas (Tapia Tussell, 2011). El estudio de la regulación transcripcional del gen lacasa en *T. hirsuta* en residuos agroindustriales es importante para desarrollar procesos rentables y para obtener más información del sistema oxidativo de este hongo que podría ser utilizado para el establecimiento de estrategias para la sobreproducción de estas enzimas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Lacasas

Las lacasas (EC 1.10.3.2, p-difenol oxidasa) son enzimas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos incluyendo mono-, di- y polifenoles, aminofenoles, metoxifenoles, aminas aromáticas y ascorbato (Galhaup *et al.*, 2002b). Son enzimas que contienen cobre y por esto se encuentran dentro del grupo de las proteínas azules de cobre u oxidasas azules de cobre. La habilidad de las lacasas para oxidar compuestos fenólicos mediante la reducción del oxígeno molecular a agua, ha llevado a estudios intensivos de estas enzimas (Madhavi y Lele, 2009).

Las lacasas están distribuidas ampliamente en plantas superiores y hongos así como en algunas bacterias y varios géneros de insectos (Madhavi y Lele, 2009). Sin embargo, recientemente se han estudiado lacasas de otro tipo de organismos como camarones (Le Bris *et al.*, 2014), ostras (Luna-acosta *et al.*, 2010), almejas (Le Bris *et al.*, 2013). La mayoría de las lacasas descritas han sido aisladas de hongos ascomicetes, deuteromicetes y principalmente de los basidiomicetes de la podredumbre blanca como *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerena máxima*, *Corilopsis polizona*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus eryngii*, etc. (Morozova *et al.*, 2007).

Las lacasas fúngicas son secretadas durante la degradación de lignina sin embargo, en algunos casos las reacciones de la lacasa no están relacionadas a la lignolisis. Estas enzimas juegan un papel en la morfogénesis y diferenciación de estructuras de esporulación y descanso en basidiomicetes así como la degradación de madera en hongos de la podredumbre blanca. La lacasa es responsable de la formación de pigmento en micelio y cuerpos fructíferos, mejora la adhesión de las células, asiste en la formación de rizomorfos y es responsable de la formación de pegamento polifenólico que mantiene juntas a las hifas. Varios

patógenos de plantas también producen lacasas extracelulares que permiten al hongo superar la respuesta inmune del huésped. También facilitan la detoxificación del tejido de planta vía oxidación de fenoles antifúngicos o desactivación de fitoalexinas. Ha sido postulado que la lacasa está involucrada en varias actividades celulares y microbianas. Estudios recientes de la función fisiológica de la lacasa engloban la biosíntesis de la pared celular de plantas, fitopatogénesis, degradación de material maderoso y humificación, esclerotización de insectos, melanización bacteriana y melanina relacionada con la virulencia para humanos (Missall *et al.*, 2005).

## **2.2 Propiedades bioquímicas de las Lacasas**

La lacasa es un monómero glicosilado o proteína homodimérica que está unida a un monosacárido generalmente manosa aunque también pueden ser glucosa, galactosa, fucosa o arabinosa. En SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) la mayoría de las lacasas muestran moviidades correspondientes a un peso molecular de 60-100 kDa, del cual 10-50% puede ser atribuido a la glicosilación. Esta glicosilación es la responsable de la secreción, susceptibilidad proteolítica, actividad, retención de cobre y estabilidad térmica (Madhavi y Lele, 2009).

Las lacasas purificadas exhiben una apariencia azul característica de su absorción alrededor de 600nm. En la holoenzima, la mayoría de las lacasas contienen cuatro átomos de cobre por monómero que pueden clasificarse en tres grupos utilizando luz UV/Visible y resonancia paramagnética electrónica (EPR) (Figura 1). El cobre tipo I (T1) es responsable del color azul intenso de la enzima y su EPR detectable, el cobre tipo II (T2) es incoloro pero detectable en EPR y el cobre tipo 3 (T3) consiste en un par de iones cobre que da una absorbancia débil cerca del espectro UV pero sin señal EPR. Los sitios de cobre T2 y T3 están muy juntos y forman un centro trinuclear involucrado en el mecanismo catalítico de la enzima en el cual se une el oxígeno diatómico y la reducción de agua se produce (Madhavi y Lele, 2009).

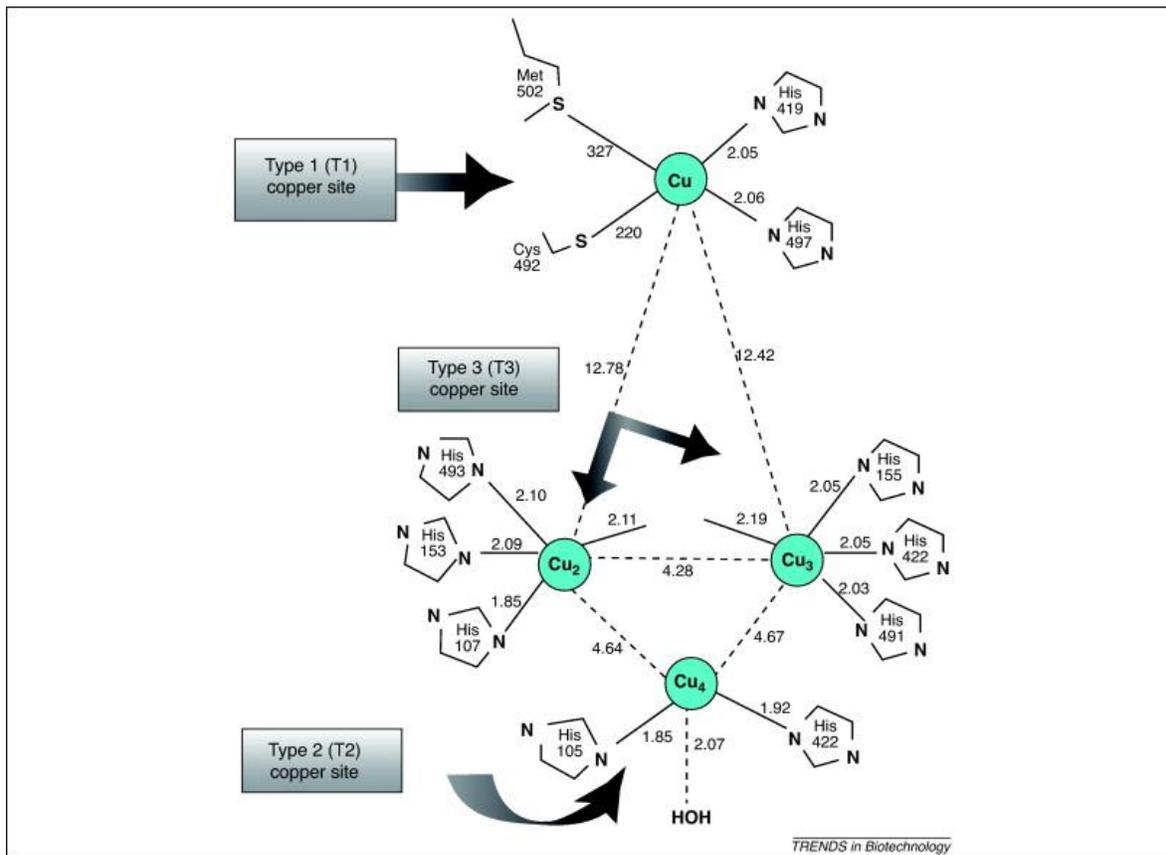
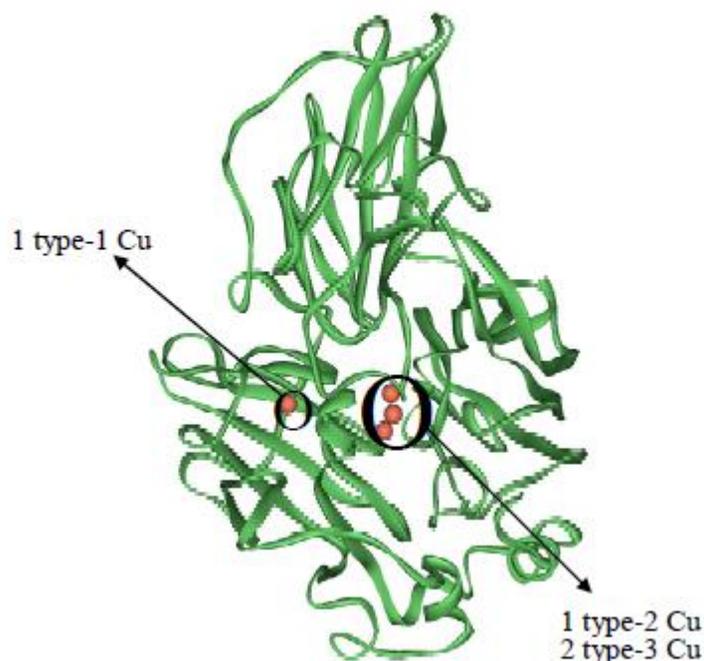


Figura 2.1 Sitio activo de la lacasa de *Bacillus subtilis*

Todas las lacasas fúngicas muestran una arquitectura similar que consiste en tres dominios arreglados secuencialmente de una estructura tipo  $\beta$ -barril (Figura 2.2). El sitio activo está bien conservado con cuatro sitios de cobre T1 está localizado en el dominio 3 con cobre situado en una depresión poco profunda y el grupo de cobre trinuclear está en la interfaz entre los dominios 1 y 3 con cada dominio proporcionando residuos de ligando en la coordinación de los iones de cobre. El cobre T1 está coordinado con His-N y Cys-S como ligandos ecuatoriales conservados. La posición axial tiene Leu o Phe que no participan en la coordinación. El enlace cobre-thioether y el residuo no coordinado influyen fuertemente el potencial redox de la enzima. Las lacasas de diferentes fuentes muestran rangos amplios de potencial redox de 780-880mV (Pointek *et al.* 2002)

mientras que la enzima de la planta *Rhus vernifera* tiene un valor de 420 mV (Viswanath *et al.*, 2008).



**Figura 2. 2 Representación cinta de la estructura cristalográfica de rayos X de la lacasa de *Trametes versicolor***

El pH óptimo de la lacasa es altamente dependiente del sustrato. Para fenoles, el pH óptimo puede ir de 3 a 7 para lacasas fúngicas. Cuando se usa ABTS como sustrato, el pH óptimo es más ácido y se encuentra en el rango entre 3 y 5. En general, las curvas de actividad de la lacasa tienen forma de campana con un pH óptimo que varía considerablemente. Esta variación puede ser debido a los cambios en la reacción causados por el sustrato, oxígeno o la enzima misma (Madhavi y Lele, 2009).

La diferencia en el potencial redox entre el sustrato fenólico y el cobre T1 podría incrementar la oxidación del sustrato a valores altos de pH, pero el anión hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) unido a los cobres T2/T3 resulta en una inhibición de la actividad de la

lacasa debido a la interrupción de la transferencia interna del electrón entre el T1 y los centros T2/T3. Estos dos efectos opuestos pueden jugar un papel importante en la determinación del pH óptimo de las enzimas lacasas bifásicas (Xu, 1999). El papel del cobre T1 en el pH óptimo de la enzima fue confirmado por Palmieri *et al.* (1997) quien encontró que el cobre T1 estaba ausente en enzimas que exhibían un pH óptimo más cercano a 7.

La temperatura óptima de la lacasa puede diferir grandemente de una cepa a otra. La lacasa aislada de *Ganoderma lucidum* mostró una temperatura óptima de entre 20 a 25 °C y se encuentra estable entre 10-50 °C por 4 horas (Ko *et al.*, 2001). En las lacasas aisladas de *Marasmius quercophilus* se encontró que son estables por 1 hora a 60 °C. Además que la pre incubación de enzimas a 40 °C y 50 °C incrementa grandemente la actividad de la lacasa (Farnet *et al.*, 2000).

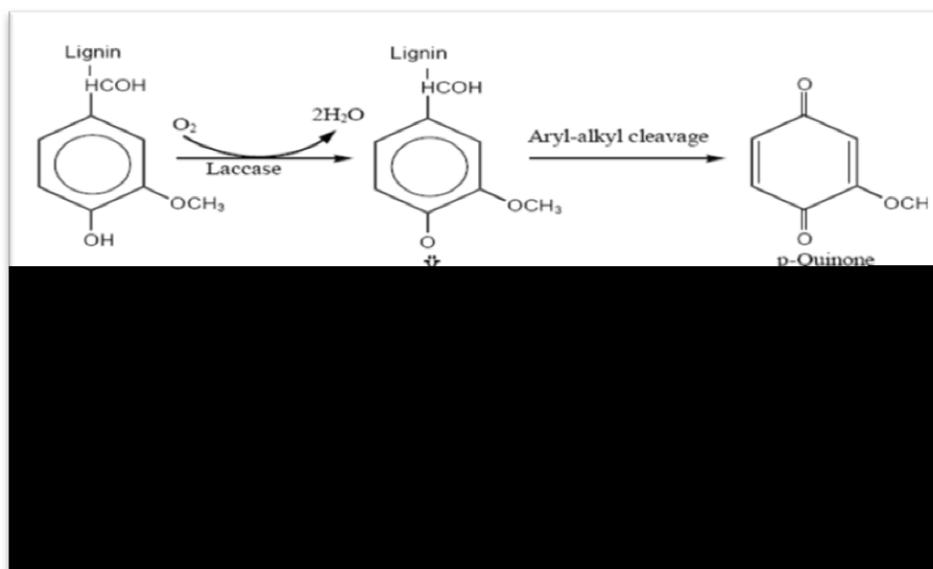
Las lacasas generalmente son inhibidas por diversos agentes químicos (Madhavi y Lele, 2009). En un estudio dirigido por Bollag y Leonowicz (1984) se encontró que azida, ácido tioglicólico, y ácido dietilditiocarbámico inhiben la actividad de la lacasa, mientras EDTA afectó la actividad de la lacasa en menor medida. Aniones pequeños tales como halógenos (excluyendo yoduro), azida, cianuro e hidróxido unidos al cobre tipo 2 y tipo 3, resultan en una interrupción en la transferencia interna del electrón e inhibición de la actividad. Otros inhibidores incluyen iones metálicos (por ejemplo  $Hg^{+2}$ ), ácidos grasos, reactivos sulfhidrilos, hidroxiglicina, ácido fólico y detergentes de catión de amonio cuaternario (Madhavi y Lele, 2009).

### **2. 3 Mecanismo de acción**

La lacasa actúa sobre las subunidades fenólicas de la lignina, lo que conlleva la oxidación del carbono  $\alpha$ , rompiendo el enlace entre los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  y la escisión de un radical arilo-alquilo. Madhavi y Lele (2009) proponen tres pasos involucrados en la catálisis de las lacasas:

1. Reducción del cobre tipo 1 mediante la oxidación del sustrato.
2. Transferencia interna del electrón del cobre tipo 1 al cobre tipo 2 y cobre tipo 3.
3. Reducción del oxígeno a agua en el sitio de cobre tipo 2 y tipo 3.

La oxidación de un sustrato por una lacasa involucra la pérdida de un electrón y la formación de un radical libre (catión). El radical es generalmente inestable y puede experimentar una oxidación catalizada por la lacasa (por ejemplo, formar quinonas de fenol) o reacciones no enzimáticas (como hidración, disproporción o polimerización) (Figura 2.3). La transferencia del electrón desde el sustrato al cobre tipo 1 probablemente está controlada por la diferencia de potencial redox. Un potencial de oxidación más bajo del sustrato o uno más alto de la lacasa (en el sitio tipo 1) resulta frecuentemente en una mayor velocidad de oxidación del sustrato.



**Figura 2.3 Mecanismo de acción de la lacasa**

El sitio de unión donde el sustrato es reducido (o sitio cobre tipo 1) parece ser bastante superficial y tiene un efecto estérico limitado en fenoles simples. En contraste, el sitio de unión del  $\text{O}_2$  (o sitios de cobre tipo 2 y tipo 3) parece restringir

el acceso de otros agentes oxidantes. La activación de O<sub>2</sub> probablemente involucra la formación de un enlace químico en el cobre trinuclear. Bajo condiciones normales, la transferencia del electrón desde el sustrato al sitio tipo 1 (el aceptor inicial del electrón del sustrato) es el paso que determina la velocidad de la reacción.

En contraste con otras enzimas ligninolíticas, las lacasas solo pueden oxidar los fragmentos fenólicos de la lignina debido al su bajo potencial redox (450-850 mV). Las lacasas pueden usar agentes cooxidantes llamados mediadores. Los mediadores son moléculas de bajo peso molecular que al ser oxidados por las lacasas alcanzan un alto potencial de óxido-reducción que los hace capaces de oxidar la parte no fenólica de la lignina (Nityanand y Desai, 2006). El uso de mediadores sintéticos como el 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico) (ABTS) ha permitido extender el rango de sustratos sobre los cuales pueden actuar las lacasas, sin embargo, estos compuestos de origen sintético son caros y tóxicos. Recientemente se han encaminando los esfuerzos a la búsqueda de fenoles derivados de la lignina que son mediadores naturales no tóxicos y han demostrado mejorar la eficiencia en la remoción de compuestos xenobióticos (Kunanmeni *et al.*, 2008).

#### **2.4 Producción de lacasas**

La producción de lacasas por basidiomicetos del género *Trametes*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Pycnoporus*, *Phanerochaete* y *Agaricus* han sido ampliamente estudiada debido a la facilidad con la cual estos microorganismos son cultivados *in vitro* y porque las lacasas son excretadas al medio de cultivo. Mediante estudios de la producción de lacasas se han evaluado en sistemas de fermentación sólida y sumergida la fuente de carbono (azúcares y residuos lignocelulósicos), el uso de inductores fenólicos y no fenólicos (Poojary y Mujeraya, 2012; Neifar *et al*, 2011). En años recientes ha surgido la tendencia del uso de residuos orgánicos tales como los desechos de la agricultura, bosques e industrias como sustratos de

fermentación. La mayoría de estos residuos contienen azúcares, lo que hace más económico el proceso (Moldes *et al.*, 2003). Por ejemplo, la adición de cáscara de nuez molida incrementó 25 veces la producción de lacasas usando el hongo *Coriolopsis rígida*. Yasmeeen *et al.* (2013) usó cáscara de plátano como fuente lignocelulósica para incrementar 1.3 veces la actividad de lacasas de *T. hirsuta*.

El principal foco de las investigaciones es la producción de enzimas con alto impacto en la biotecnología industrial. Las diferentes fuentes de residuos son baratas y son una fuente efectiva de sustratos naturales que inducen la producción de lacasas.

## 2.5 Genes de lacasas

La mayoría de los hongos secreta más de una isoenzima de lacasa dependiendo de la especie o de las condiciones medioambientales. Los mecanismos fisiológicos que ocurren durante el desarrollo del micelio pueden también modular los niveles de expresión de las isoenzimas. Algunas isoformas han sido observadas durante la fases lag y exponencial de fermentación y podrían estar involucradas en la degradación del sustrato. Otras isoformas han sido detectadas en la fase estacionaria que podrían estar relacionadas con la morfogénesis del hongo y los procesos de pigmentación (Lettera *et al.*, 2010).

En los hongos de la podredumbre blanca varía la producción de isoformas de lacasas cuyo número depende de las condiciones del medio de cultivo o por la presencia de algún inductor. Esta variabilidad puede deberse a varios factores, originalmente se pensaba que las isoenzimas de lacasas eran producto de un mismo gen pero con variantes postraduccionales; sin embargo, se han aislado y caracterizado varios genes de lacasas. En *Rhizoctonia solani* se obtuvieron cuatro secuencias diferentes de DNA para lacasa (Wahleithner *et al.*, 1996). En *Coprinopsis cinérea* se han encontrado 17 genes que codifican para lacasa (Kilaru *et al.*, 2006). Tal es el caso de *Pleurotus pulmonarius* que produce tres isoformas

de lacasas dos constitutivas (*lcc1* y *lcc2*) y una inducible (*lcc3*) (Marques de Souza *et al.*, 2004). Las distintas isoenzimas producidas por *Pleurotus ostreatus* han sido extensamente estudiadas. POXC es la más abundante producida bajo diferentes condiciones de crecimiento con peso molecular de 59 kDa y pI 2.7 (Palmieri *et al.*, 1993); otras isoenzimas secretadas por el micelio han sido purificadas y caracterizadas como POXA2, POXB1 y POXB2 que muestran un peso molecular similar alrededor de 67 kDa (Giardina *et al.*, 1999; Palmieri *et al.*, 1997, 2001). Dos isoenzimas heterodiméricas (POXA3a y POXA3b) con características estructurales inusuales fueron producidas en cultivos suplementados con cobre (Palmieri *et al.*, 2003). *Trametes* sp. AH28-2 produce al menos dos tipos de isoenzimas lacasa A inducida por lignina kraft (Xiao *et al.*, 2003) y lacasa B inducida por moléculas pequeñas de compuestos fenólicos (Xiao *et al.*, 2004). *Coriolopsis rigida* secreta dos isoenzimas LacI y LacII en cultivos inducidos con cobre (Saparrat *et al.*, 2002) y en presencia de residuos de la producción de aceite de oliva (Díaz *et al.*, 2010). *Pleurotus sajor-caju* presenta tres isoenzimas inducibles (Psc lac1, Psc lac 2 y Psc lac 4) y una constitutiva (Psc lac 3) (Soden y Dobson, 2001). En *Trametes* sp C30 se ha reportado que LAC1 es una enzima constitutiva mientras que LAC2 y LAC3 necesitan ser inducidas para ser detectadas (Klonowska *et al.*, 2002, 2005).

## 2.6 Regulación de la expresión génica

La expresión génica es el proceso por el que la información de un gen es usada en la síntesis de un producto génico funcional. Estrictamente el término abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se localiza en el lugar adecuado y realiza su función (Hernandez *et al.*, 1994), aunque en algunos casos como en los genes no codificantes de proteínas, el producto génico es un ARN funcional (ARNm, ARNr o ARNt). En todos los organismos vivos las células regulan sus actividades activando o desactivando la expresión de sus genes y esta expresión es generalmente proporcional al número de copias de ARN mensajero de un gen determinado. Este hecho es crucial si tratamos de identificar la presencia de productos celulares específicos ya que el ARNm es traducido en

los ribosomas para formar proteínas. Por lo tanto, es posible obtener datos relativos a la producción de elementos biológicos si la expresión de los genes de una célula es conocida (McPherson *et al.*, 2008). Los métodos de estudio de la expresión génica se basan en su capacidad para detectar ARNm específicos, y durante mucho tiempo el Northern blot ha sido la técnica más utilizada para detectar moléculas de ARN. Actualmente han aparecido técnicas mucho más precisas para el estudio de la expresión génica como la RT-qPCR (o RT-PCR a tiempo real), y técnicas de alta productividad como los chips de ADN, la secuenciación de ESTs, el RNAseq o la tecnología SAGE y SSH. Las estrategias basadas en la secuenciación masiva proporcionan enormes cantidades de datos y son muy útiles para estudios de transcriptómica comparada, mientras que la RT-qPCR es más específica y adecuada para el estudio de genes concretos.

### **2.6.1 PCR en tiempo real**

Higuchi *et al.* (1993) desarrollaron un método de análisis cuantitativo para cualquier secuencia de ADN amplificable que utiliza una videocámara para monitorizar múltiples PCRs simultáneas detectando la acumulación de ADN de doble cadena en base al incremento de fluorescencia del bromuro de etidio. Hoy en día esta técnica es conocida como qPCR o PCR a tiempo real y su capacidad para detectar y medir minúsculas cantidades de ácidos nucleicos en un amplio rango de muestras de diferentes orígenes la convierte en una herramienta excelente para el diagnóstico molecular, las ciencias de la vida, agricultura y medicina (Bustin, 2000). Sus aplicaciones se dividen claramente en técnicas de diagnóstico y de investigación, siendo en esta última muy útil para amplificar y cuantificar moléculas de ADNc específicas obteniendo datos precisos y fiables sobre la expresión genética de las células en estudio (Heid *et al.*, 1996).

Algunas de las ventajas que hacen esta tecnología tan competitiva son:

- Todo el proceso se realiza dentro del termociclador.
- Posee una gran sensibilidad, detectando bajos niveles de ADNc molde.
- Es muy precisa en la cuantificación.

- Posee un amplio rango de cuantificación, de hasta siete órdenes de magnitud.
- Procesamiento de un elevado número de muestras en paralelo.
- Rapidez.
- Reproducibilidad.

Los principales inconvenientes de esta técnica son:

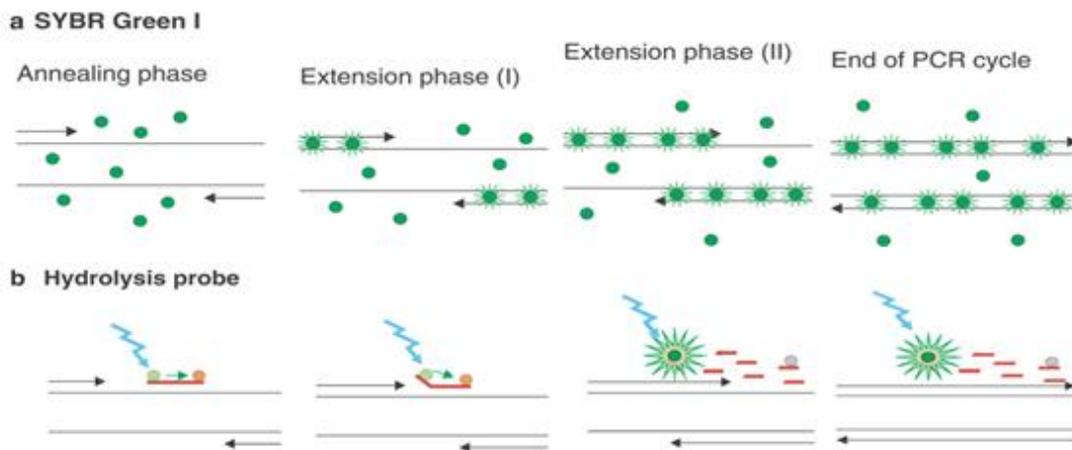
- No aporta información sobre los tamaños de ARNm.
- Es sensible a la estructura del ARNm.
- Tiene menos capacidad de resolución que otros métodos.
- Requiere información previa sobre la secuencia del transcrito.
- El resultado se ve afectado por el error cometido por la Taq DNA polimerasa.
- La cuantificación absoluta requiere un trabajo muy complejo.

En conjunto, el método RT-qPCR consiste en una extracción de ARN seguida de la síntesis de una cadena de ADNc a partir del ARNm utilizando una transcriptasa inversa y de una PCR en la que el producto amplificado puede detectarse a tiempo real dado que la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADNc producida en cada ciclo.

Para ello son componentes imprescindibles los elementos de excitación (laser, diodos o lámparas halógenas), elementos ópticos de detección integrados al termociclador y marcadores fluorescentes, que pueden ser de dos tipos:

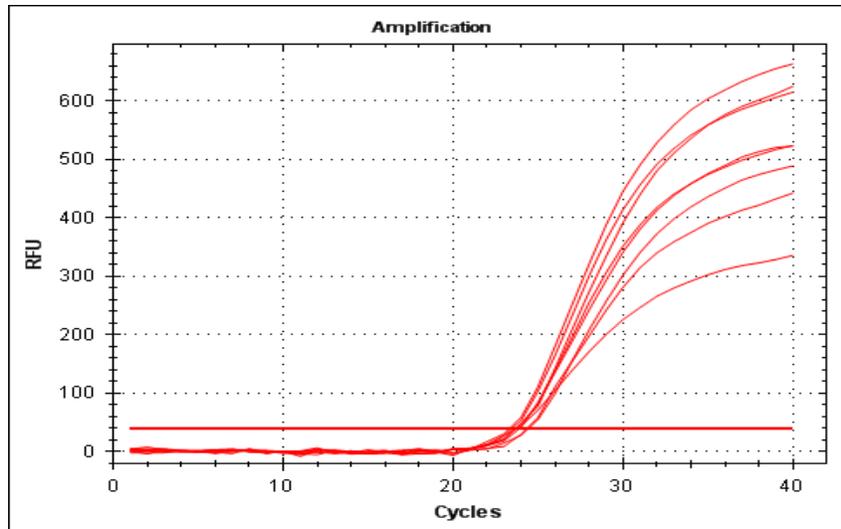
- Marcadores genéricos: Son moléculas fluorescentes que se unen inespecíficamente al ADN de doble cadena emitiendo una señal fluorescente que se procesa a tiempo real, de modo que un aumento en el producto de PCR supone un aumento de fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR. Estos marcadores son muy utilizados por su bajo costo y porque no requieren de un diseño experimental previo (Ririe *et al.*, 1997). A este tipo de marcadores pertenece el fluoróforo SYBR® Green (Figura 2.4 A).

- Marcadores específicos: Utilizan sondas de ácidos nucleicos marcadas con moléculas fluorescentes que se unen a productos amplificados específicos y emiten señales luminosas que se miden en el termociclador a medida que se obtiene el producto de la PCR. Estos métodos son muy precisos, aunque requieren de un diseño de secuencias específicas para su uso como sondas y por consiguiente es más laborioso y costoso (Figura 2.4 B).



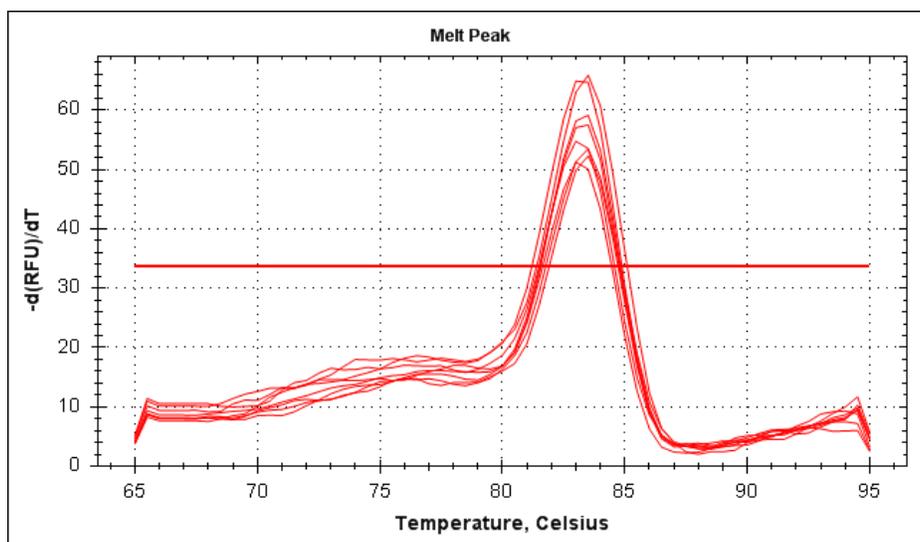
**Figura 2.4 Marcadores fluorescentes para PCR en tiempo real. A) SYBR Green; B) Sondas de hidrólisis**

Los valores acumulados en la generación de fragmentos quedan registrados formando una curva de fluorescencia (figura 2.5) que sigue una ecuación logística similar a la que describe el crecimiento bacteriano (Wang *et al.*, 1989). En esta curva el investigador fija un punto por encima de la línea base que se denomina umbral del ciclo. Los valores umbral del ciclo (Cq value) se determinan identificando el ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente atraviesa el punto umbral, por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción, y son los valores que se utilizarán para calcular la expresión génica relativa.



**Figura 2.5** Curva de amplificación de ADNc

Por otra parte, al representar gráficamente la fluorescencia detectada en función de la temperatura se obtienen curvas de fusión. Ririe *et al.* (1997) determinaron que la forma y posición de esta curva depende del contenido de GC/AT y de la longitud de la secuencia, concluyendo que en muchos casos elimina la necesidad de realizar geles de electroforesis ya que en ellas se pueden diferenciar los productos específicos de la PCR de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas (figura 2.6).



**Figura 2.6** Curva de fusión de ADNc

A la hora de poner a punto un protocolo de RT-qPCR es muy importante conseguir que las variaciones normales de la prueba no causen efectos importantes en los valores Cq y que tengan un impacto mínimo en la cantidad de fluorescencia observada. Los criterios más importantes para la optimización son la especificidad, eficiencia y reproducibilidad de la PCR en tiempo real (Edwards, 2004). La especificidad depende exclusivamente de los cebadores usados, y la eficiencia de cada reacción se calcula a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas de ADNc (Pfaffl, 2004). En condiciones óptimas es del 100%, lo que significa que en cada ciclo se duplica el número de copias obtenidas.

La eficiencia de la reacción se calcula en base a la pendiente de la recta de regresión ajustada según la fórmula  $E=10^{[-1/\text{pendiente}]}$ . En función de los objetivos del estudio se pueden llevar a cabo diferentes estrategias de cuantificación. Una de ellas es la cuantificación absoluta, mediante la cual es posible conocer el número de copias de ARNm de un gen relacionando la señal de fluorescencia obtenida con un número de copias fijo de una secuencia estándar utilizando una curva de calibración. Estas curvas son muy reproducibles y permiten la generación de datos específicos y sensibles, pero deben ser rigurosamente validadas ya que la cuantificación de la expresión genética dependerá exclusivamente de la precisión de los estándares empleados (Pfaffl, 2004). En otros casos, el objetivo no es determinar de forma absoluta el número de moléculas de ARNm, sino detectar diferencias cuantitativas en la expresión de varios genes en distintas situaciones, lo que se conoce como cuantificación relativa. Esta técnica se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gen en estudio en comparación con uno o más genes de referencia (Pfaffl, 2004). Estos genes, comúnmente llamados housekeeping o controles endógenos, son escogidos porque su expresión es constante en todas las condiciones del estudio y actúan como control interno eliminando la variación debida a posibles diferencias producidas por la degradación parcial del ARN en alguna muestra, distinta

eficiencia en la transcripción inversa, errores de pipeteo, etc. (Hernandez *et al.*, 1994). Algunos de los controles internos más utilizados son la  $\beta$ -actina, cicloflina, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, hipoxantina guanina, fosforibosil-transferasa y 18S del ARN ribosomal (Huggett *et al.*, 2005). Existen varios modelos matemáticos disponibles para el cálculo de la expresión relativa, y todos ellos se basan en la comparación de los valores Cq obtenidos en cada condición del estudio, normalizados con los controles internos. Uno de los métodos más utilizados es el  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , desarrollado por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forster City, CA), que asume una eficiencia del 100% en todas las reacciones. Otros métodos, como el propuesto por (Pfaffl, 2001) si tienen en cuenta la eficiencia de la reacción tanto para el gen diana como para el gen de referencia.

## **2.7 Regulación de la expresión de lacasas**

Los organismos producen siempre algunas lacasas que son llamadas constitutivas, pero también existen otras que requieren de un inductor que estimule su síntesis que son denominadas enzimas inducibles. La producción de lacasas por hongos ligninolíticos puede ser estimulada por una gran variedad de compuestos relacionados con la lignina o sus derivados (Marquez de Souza *et al.*, 2004) Los compuestos aromáticos o fenoles generalmente son considerados inductores de lacasas no solo porque incrementan su producción sino porque modifican el perfil de isoformas.

Se ha descrito que los genes de lacasas son regulados diferencialmente y que los patrones de regulación difieren sustancialmente entre especies (Palmieri *et al.*, 2000; Soden y Dobson, 2001). La regulación de la síntesis de lacasas es un evento muy complejo debido a que pueden existir uno o varios genes cuya regulación varía en función del tipo de compuesto y/o degradación de los productos a un tiempo particular. Se ha sugerido que la inducción de lacasas ocurre como una respuesta de protección contra los compuestos que pueden ser tóxicos (de la Rubia *et al.*, 2008).

La regulación de la expresión de lacasas difiere substancialmente entre las especies (Cullen, 1997). Especies individuales pueden expresar varias isoenzimas, las cuales pueden diferir en características como el pH óptimo, especificidad por sustrato y peso molecular (Baldrian, 2006). Existen reportes en hongos como *M. quercophilus* que produce tres enzimas constitutivas y cuatro inducibles (Farnet *et al.*, 2000) y *Pleurotus ostreatus* produce una lacasa constitutiva pero al cambiar el medio de crecimiento produce seis enzimas con características catalíticas diferentes (Tinoco *et al.*, 2001). La variación de las lacasas se ha observado también en *Trametes versicolor* (Bourbonnais *et al.*, 1995), *Picnoporus cinnabarinus* (Otterbein *et al.*, 2000) y *Rigidosporus lignosus* (Cambria *et al.*, 2000) por mencionar algunos. La regulación puede ocurrir a diferentes niveles, como la regulación transcripcional a través de la inducción por compuestos fenólicos (Wahleithner *et al.*, 1996) y metales como el cobre (Galhaup *et al.*, 2002a), modificaciones postraduccionales por proteólisis (Palmieri *et al.*, 2001) y diferentes niveles de glicosilación (Yaver *et al.*, 1996).

La regulación de la expresión por metales como cobre y hierro es común en hongos. Se han documentado diversas especies de hongos en los que la actividad de la lacasa se incrementa o se induce en presencia del cobre. *Trametes versicolor* 290 incrementa su actividad después de 24 h de incubación solo cuando el cobre estaba presente. Los niveles más altos de actividad (2500 U/L) fueron alcanzados en cultivos suplementados con 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ , correspondiendo a un nivel 18 veces más alto que en ausencia de cobre (Collins y Dobson, 1997). En *Trametes pubescens* MB 89 la formación de lacasa puede ser estimulada por la adición de 1.5-2.0 mM durante la fase exponencial para su máximo efecto, alcanzando valores de 65 U/ml (Galhaup y Haltrich, 2001). En *Trametes versicolor* (CBS100.29) la adición de 3.5 mM de  $\text{Cu}^{2+}$  al medio de cultivo incrementó hasta 12 veces la actividad mostrando valores máximos alrededor de 8000 U/L (Lorenzo *et al.*, 2006). *Trametes sp.* 48424 alcanzó los valores más altos (15273 U/L) en presencia de 1mM de  $\text{Cu}^{2+}$  (Fan *et al.*, 2010). En *Pleurotus sajor-caju* se determinó que los iones  $\text{Cu}^{2+}$  presentes en el medio de crecimiento lograron estimular de 3 a

7 veces la síntesis de lacasas cuando se adicionó 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  (Soden y Dobson, 2001).

La regulación de la expresión genes de lacasas a nivel molecular ha sido escasamente estudiada. En los hongos *Trametes versicolor* (Collins y Dobson, 1997), *Ceriporiopsis subvermispora* (Álvarez *et al.*, 2009), *Pleurotus ostreatus* (Faraco *et al.*, 2003; Palmieri *et al.*, 2000), *Pleurotus sajor-caju* (Soden y Dobson, 2001), *Coriolopsis rigida* (Jurado *et al.*, 2009) y *Trametes pubescens* (Galhaup *et al.*, 2002a) la regulación de la producción de lacasas por cobre ha sido demostrada que ocurre a nivel transcripcional. En *Pleurotus ostreatus* (ATCC MYA-2306), el cobre tiene un marcado efecto en la inducción de las isoenzimas POXC, POXA3 y POXA1b. El efecto del cobre en la síntesis de lacasas puede ser explicado no solo a nivel transcripcional. A cierta concentración el cobre disminuye la actividad proteolítica extracelular perjudicando la degradación de la lacasa (Palmieri *et al.*, 2001).

Los iones  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Mn}^{+2}$  también han sido reportados como moduladores de la transcripción de la enzima (Manubens *et al.*, 2007; Soden y Dobson, 2001). Sin embargo el mismo metal puede ejercer efectos opuestos en diferentes especies de hongos (Manubens *et al.*, 2007).  $\text{Mn}^{+2}$  actúa como inductor a nivel transcripcional en *Pleurotus sajor-caju* (Soden y Dobson, 2001), *Clitocybula dusenii* y *Nematoloma frowardii* (Scheel *et al.*, 2000) pero muestra un inhibidor en la expresión de lacasa en *Ceriporiopsis subvermispora* (Manubens *et al.*, 2007).

Los compuestos fenólicos y aromáticos estructuralmente relacionados a la lignina o derivados de la lignina son añadidos rutinariamente a cultivos fúngicos para incrementar la producción de lacasas, o inducir la producción de otras. La inducción de lacasas por sustancias fenólicas puede representar una respuesta desarrollada por el hongo contra compuestos aromáticos tóxicos. Catalizando su polimerización, las lacasas juegan un papel defensivo, reduciendo el estrés oxidativo causado por radicales de oxígeno procedentes de la reacción de estas moléculas (Thurston, 1994). En la mayoría de los hongos de la pudredumbre blanca se han utilizado como inductores la 2,5-xilidina, el ácido ferúlico, el ácido

gálico, toluidina, guayacol, el alcohol veratrílico, y 1-hidroxibenzotriazol (HBT). En la Tabla 2.1 se muestran diversos compuestos aromáticos que inducen la síntesis de lacasas en hongos de la podredumbre blanca. Los niveles de inducción varían de acuerdo al organismo y parece ser específica a ciertos compuestos aromáticos (Piscitelli *et al.*, 2011).

El efecto del alcohol veratrílico en la producción de lacasas varía también con la composición del medio basal utilizado (D'souza *et al.*, 1999), aumentando la producción de 2 a 200 veces. La adición de guayacol (1 mM) incrementa la producción de lacasas de 2 a 232 veces en diferentes hongos, teniendo máximo efecto estimulador en *Phebia spp.* y *Pleurotus ostreatus* (Hou *et al.*, 2004), sin embargo disminuye la producción de estas enzimas en cultivos de *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert *et al.*, 1996).

El-Shora *et al.*, 2008, reportó la inducción de lacasas en especies de *Penicillium* por guayacol, ácido cafeico, siringaldazina y ácido sinapínico. La producción de lacasa de *Pleurotus flavido-alba* es afectada por diversos compuestos aromáticos simples, siendo altamente inducido en cultivos añadidos de *p*-hidrobenzaldehído o vainillina, (1 mM) mientras que otros inductores como alcohol veratrílico, guayacol o ácido ferúlico no mostraron diferencias con respecto al control (de la Rubia *et al.*, 2002).

En *Pleurotus pulmonaris* el ácido ferúlico y la vainillina (0.2 mM) producen los niveles más altos de actividad de lacasas (18 y 15 veces, respectivamente), induciendo la expresión de la isoenzima *lcc3* no detectada en condiciones basales (de Souza *et al.*, 2004). En *Pleurotus ostreatus* el inductor más significativo es el ABTS (0.5-1 mM), incrementando más de 5 veces la producción de lacasa. 2,5-xilidina, guaiacol y ácido ferúlico también incrementan la actividad de 2 a 3 veces, mientras el alcohol veratrílico no estimula la producción de la enzima (Hou *et al.*, 2004.) Por otra parte, la presencia de ácido ferúlico en cultivo líquido de *Pleurotus ostreatus* (ATCC MYA-2306) también produce diferentes patrones de isoenzimas (Palmieri *et al.*, 2000).

Tabla 2.1 Compuestos fenólicos estudiados en diferentes especies de hongos

| Organismo                          | Inductores   | Inhibidores  |
|------------------------------------|--|--|
| <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> | 2,5-xilidina   |  |
| <i>Cerrena unicolor</i>            | Catecol, Dimetilfenol, Ácido verátrico   | Ácido ferúlico, Hidroquinona, Vainilina, Ácido vainílico, 2,5-xilidina |
| <i>Corioloopsis rigida</i>         | Ácido siríngico  |  |
| <i>Ganoderma lucidum</i>           | Ácido veratrílico  | Dimetilfenol, Ácido ferúlico, 2,5-xilidina                             |
| <i>Lentinula edodes</i>            |  | Catecol, Ácido hidroxibezoico, Vainilina                               |
| <i>Lentinus strigosus</i>          | Dimetilfenol, Ácido gálico   | Ácido veratrílico  |
| <i>Mycena galopus</i>              | Ácido veratrílico, 2,5-xilidina  | Ácido vainílico, Ácido verátrico                                       |
| <i>Marasmius spp.</i>              | Ácido ferúlico, Guaiacol   |  |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | Ácido gálico, Guaiacol, Ácido veratrílico  |  |
| <i>Phlebia spp.</i>                | Guaiacol, Ácido verátrico, Ácido veratrílico, 2,5-xilidina   |  |
| <i>Pleurotus eryngii</i>           | Ácido vainílico, Ácido verátrico, 2,5-xilidina   | Ácido veratrílico  |
| <i>Pleurotus ostreatus</i>         | ABTS, Ácido ferúlico, Guaiacol, 2,5-xilidina   | Vainilina, Ácido vainílico, Ácido veratrílico                          |
| <i>Pleurotus sajor-caju</i>        | Ácido ferúlico, Ácido gálico, Ácido verátrico, 2,5-xilidina  |  |
| <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>     | Ácido ferúlico, Ácido veratrílico, 2,5-xilidina  | Guaiacol   |
| <i>Pycnoporus sanguineus</i>       | Ácido ferúlico, Ácido veratrílico, 2,5-xilidina  |  |
| <i>Stereum hirsutum</i>            | Guaiacol, Ácido veratrílico  |  |
| <i>Trametes versicolor</i>         | Ácido ferúlico, Ácido gálico, Guaiacol, Hidroquinona, Ácido siríngico, Ácido veratrílico, 2,5-xilidina | Ácido ferúlico, Catecol, Dimetilfenol, Ácido verátrico                 |
| <i>Volvariella volvacea</i>        | Ácido ferúlico, Ácido hidroxibezoico, Ácido verátrico, 2,5-xilidina                                    |  |

La inducción de lacasas también ha sido demostrada en presencia de colorantes, el nivel de inducción es altamente sensible a pequeñas diferencias en sus estructuras químicas (Vanhulle *et al.*, 2007). Además de la estructura molecular y

concentración, el efecto inductor de los fenoles depende también del tiempo de su adición al cultivo (Shuttleworth *et al.*, 1986). En cultivos de *Pleurotus pulmonaris* y *Botryosphaeria rhodina*, la inducción parece ser más eficiente cuando el inductor es añadido al momento de la inoculación (Marques de Souza *et al.*, 2004; Dekker *et al.*, 2007), mientras en *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus* y *Trametes modesta* el acondicionamiento del medio se realiza generalmente después de 2-5 días de la inoculación con el fin de evitar la inhibición del crecimiento (Vanhulle *et al.*, 2007; Nyanhongo *et al.*, 2002). Altas concentraciones (>1 mM) de compuestos aromáticos exógenos en medios de cultivo puede afectar negativamente el crecimiento fúngico si el micelio aún no está adaptado a los cambios de las condiciones de crecimiento o si se ve comprometido por el estrés ambiental o mecánico (homogenización del preinóculo o subcultivo de la placa de agar hacia el medio líquido (Piscitelli *et al.*, 2011).

La inducción de lacasas por compuestos aromáticos ocurre a nivel transcripcional, diferenciándose entre los hongos que han sido estudiados, sino también entre las diferentes isoenzimas del mismo organismo. En *Trametes hirsuta* la presencia de 1-hidroxibenzotriazol y 2,5-xilidina activa la transcripción de *lcc*, pero no se observa la inducción en presencia de ácido veratrílico o ácido ferúlico (Collins y Dobson, 1997). La transcripción del gen *lcc1* de *Trametes villosa* es inducida por la adición de 2,5-xilidina y un segundo gen se expresa constitutivamente bajo las condiciones de ensayo (Yaver *et al.*, 1996). En *Trametes* sp. I62 nueve compuestos aromáticos relacionados parecen tener diferentes efectos en la expresión de genes. Los tres genes de este hongo se expresan diferencialmente en respuesta a estos compuestos con patrones de inducción específicos para cada molécula (Terrón *et al.*, 2004). En *Trametes* sp. AH28-2 se han identificado 3 genes, *lacA*, *lacB* y *lacC*, en los que diferentes compuestos aromáticos pueden inducir selectivamente la producción de distintas isoenzimas. La o-toluidina (2mM) induce la expresión de LacA y 3,5-dihidroxitolueno (10 mM) estimula principalmente a producción de LacB. El análisis por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real competitiva mostró que la acumulación de transcritos de RNA de lacasa está acompañada por el incremento de actividad de enzima

correspondiente en los cultivos (Xiao *et al.*, 2006). En *Volvariella volvacea*, los títulos de transcritos de *lcc1* están regulados diferencialmente por la adición de varios compuestos aromáticos mientras la transcripción de *lcc4* no resulta afectada por estas moléculas (Chen *et al.*, 2004).

## 2.8 Secuencias promotoras

Varias secuencias promotoras de lacasas reflejan la presencia de muchos elementos de respuesta diferentes distribuidos diferencialmente a lo largo de secuencias promotoras. El análisis de los promotores permite la correlación entre los efectos regulatorios observados en la transcripción del gen lacasa y la presencia de elementos de respuesta específicos y en algunos casos postular un mecanismo para su funcionamiento. Las diferencias en el número de copias, locación u orientación de los elementos de respuesta putativos determinan una imagen compleja de la regulación (Piscitelli *et al.*, 2011).

La región promotora del gen que codifica para la isoenzima principal de lacasa LAP2 de *Trametes pubescens*, se extiende alrededor de 1420 pares de bases río arriba del codón de inicio ATG (Galhaup *et al.*, 2002a). Esta región río arriba contiene los promotores como la caja TATA y siete motivos CAAT, con dos elementos de respuesta a metales (MREs), cuatro secuencias consenso CreA, 27 elementos a choques térmicos (HSEs) y un elemento de respuesta al estrés “general” (STRE). La expresión de LAP2 es altamente inducida por cobre y otros iones de metales pesados pero es reprimido por glucosa. El efecto del metal puede estar relacionado a la presencia de múltiples MREs, causando un alto nivel de inducción (Mager y De Kruijff, 1995; Lewin, 1997).

Soden y Dobson (2001) estudiaron las regiones promotoras de cuatro genes de lacasa (*lac1*, *lac2*, *lac3* y *lac4*, que se extienden 724 pb, 214 pb, 840 pb y 1740 pb río arriba del codón de inicio, respectivamente) de *Pleurotus sajor-caju* mostrando regulación diferencial en respuesta a diferentes estímulos (Soden & Dobson,

2003). Un número de elementos de respuesta putativos incluyendo MRE, XRE (elementos de respuesta a xenobióticos), ARE (elementos de respuesta a antioxidantes y HSE han mostrado estar diferencialmente distribuidos en las regiones promotoras que han sido estudiadas. La presencia de secuencias de consenso putativamente involucradas en la regulación de carbono y nitrógeno como sitios de unión CreA, Mig y NIT2, puede explicar la regulación por fuentes de nutrientes de carbono y nitrógeno detectado para algunos genes de lacasa de *Pleurotus sajor-caju*, mediados por proteínas como Mig1p o NIT2. Un solo MRE ha sido identificado en la región promotora del gen *lac4* fuertemente inducido por cobre, mientras secuencias con homología perfecta con XRE han sido detectados en los promotores de *lac1* y *lac4*. El análisis transcripcional de lacasa indica que *lac1* y *lac4* son regulados por la adición de 2,5-xilidina y ácido ferúlico, mientras *lac2* y *lac3* los cuales aparecen en ausencia de XRE, son expresados constitutivamente bajo estas condiciones (Piscitelli *et al.*, 2011). Xiao *et al.* (2006) estudiaron la expresión diferencial de tres genes de lacasa (*lacA*, *lacB* y *lacC*) de *Trametes sp.* AH28-2. Una caja TATA inferida y varias secuencias consenso putativas CAAT, MRE, XRE y CreA han sido identificadas en las regiones promotoras de *lacA*, *lacB* y *lacC* (1881 pb, 993 pb y 1703 pb respectivamente). La diferencia en el número de copias y distribución de XREs entre los tres genes (siete XREs en *lacA* y solo dos en *lacB* y *lacC*) probablemente es debido a sus diferentes respuestas a compuestos aromáticos: *lacA* es inducida por todos los compuestos aromáticos analizados, *lacB* es inducida principalmente por guayacol y 3,5-dihidroxitolueno, mientras que los niveles de transcritos de *lacC* no son detectables en presencia de estos compuestos. El traslape de un elemento XRE con la caja TATA en el promotor de *lacC* es probablemente la respuesta a la ausencia de inducción de este gen por los compuestos aromáticos.

## 2.9 Aspectos biotecnológicos de las lacasas

Las características catalíticas de las lacasas permiten su aplicación en numerosos procesos desde industriales hasta ambientales. Su inespecificidad por sustratos las hace capaces de oxidar un amplio rango de compuestos xenobióticos incluyendo fenoles clorados (Bollag *et al.*, 2003), tintes sintéticos como es el tinte índigo en la fabricación de tejidos (Xu, 2005) y los que se encuentran en efluentes generados por la industria textil (Wesenberg *et al.*, 2003), pesticidas (Torres-Duarte, Bernal, Román, & Vázquez-Duhalt, 2003) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Cho *et al.*, 2002). Pozdnyakova *et al.*, 2004 encontró que las lacasas amarillas de *P. ostreatus* son capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos como el antraceno que es degradado 95 % en 2 días y el fluorantreno 14 % en 2 días. En relación a la degradación de pesticidas, se ha observado que la lacasa de *P. ostreatus* hidroliza compuestos organofosforados, los cuales son altamente tóxicos, altamente persistentes en el ambiente y no pueden ser suficientemente hidrolizados de manera no enzimática (Martin *et al.*, 2007).

### 2.9.1 Industria textil

La industria textil reporta dos tercios del total de colorantes del mercado y consume grandes volúmenes de agua y químicos para el procesamiento húmedo de los textiles (Riu *et al.*, 1998). Los reactivos químicos usados son muy diversos en composición química, que van desde compuestos inorgánicos a polímeros y productos orgánicos (Mishra y Tripathy, 1993; Banat *et al.*, 1996; Juang *et al.*, 1996). Debido a su estructura química, los colorantes son resistentes a la degradación en exposición a la luz, agua y diferentes químicos y la mayoría de ellos son difíciles de decolorar debido a su origen sintético (Poots *et al.*, 1976; McKay, 1979). Surge la preocupación que muchos colorantes están hechos de carcinógenos conocidos como bencidina y otros compuestos aromáticos (Baughman y Perenich, 1988). Los procesos existentes para tratar el tinte de aguas residuales son inefectivos y costosos (Cooper, 1995; Stephen, 1995). Por lo tanto, el desarrollo de procesos basados en lacasas parece ser una solución

atractiva debido a su potencial en la degradación de colorantes de diversa estructura química (Abadulla *et al.*, 2000; Blázquez *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2004), incluyendo colorantes sintéticos empleados actualmente en la industria (Rodríguez-Couto *et al.*, 2004a, 2005).

El uso de lacasa en la industria textil está creciendo muy rápido, ya que además de decolorar efluentes textiles, la lacasa es usada para blanquear textiles e incluso para sintetizar colorantes (Setti *et al.*, 1999). Relacionado al blanqueamiento textil, en 1996 Novozyme (Novo Nordisk, Denmark) puso en marcha una nueva aplicación industrial de la enzima en el acabado de la mezclilla: DeniLite®, la primera lacasa industrial y el primer blanqueamiento enzimático con la ayuda de una molécula mediadora. En 2001, la compañía Zytex (Zytex Pvt. Ltd., Mumbai, India) desarrolló una formulación basada en LMS capaz de degradar índigo de manera muy específica. El nombre comercial del producto es Zylite (Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006).

### **2.9.2 Industria papelera**

La preparación industrial del papel requiere la separación y degradación de la lignina en la pulpa de la madera.

Las lacasas pueden ser utilizadas para llevar a cabo el biopulpeo que es un proceso fundamental para separar y eliminar la lignina de la celulosa. Durante el bioblanqueo, las lacasas eliminan los residuos de la lignina que causan el amarillamiento.

Pretratamientos de la pulpa de la madera con enzimas ligninolíticas pueden proveer estrategias más suaves y limpias de delignificación que son respetuosas de la integridad de la celulosa (Kuhad *et al.*, 1997).

Aunque se han llevado a cabo estudios extensivos para el desarrollo de sistemas alternativos de bioblanqueamiento, pocos tratamientos enzimáticos exhiben las capacidades delignificación/aclaramiento de blanqueamientos químicos modernos. Una de las pocas excepciones, es el desarrollo de tecnologías de delignificación

LMS para pulpas kraft. En adición la lacasa está más disponible y es más fácil de manipular que la lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa y LMS ya ha encontrado aplicaciones prácticas como el proceso Lignozym® (Call y Mücke, 1997). Varios autores han aplicado el LMS para bioblanqueamiento de pulpa. Sin embargo, todos los estudios de bioblanqueamiento se han enfocado en pulpas de madera y poco es sabido acerca de la eficiencia de los LMS en pulpas no maderosas incluyendo aquellas usadas para la manufacturación de papeles especiales. Camarero *et al.* (2004) estudió el potencial de LMS para remover productos derivados de la lignina responsables del color de una pulpa de lino de alta calidad. Se demostró la factibilidad de los LMS para sustituir los agentes que contienen cloro en la manufactura de estas pulpas de papel de precios altos.

La capacidad de las lacasas para formar radicales reactivos en la lignina también puede ser utilizada en la modificación específica de fibras de madera. Por ejemplo, las lacasas pueden ser utilizadas en la adhesión enzimática de fibras en la manufacturación de materiales compuestos a base de lignocelulosa como fibras vulcanizadas. Otra posibilidad es hacer funcionales fibras de lignocelulosa por lacasas con el fin de mejorar las propiedades químicas o físicas de los productos de estas fibras. Resultados preliminares han mostrado que las lacasas son capaces de injertar varios derivados de ácidos fenólicos sobre las fibras de pulpa kraft (Lund y Ragauskas, 2001; Chandra y Ragauskas, 2002). Esta habilidad podría ser utilizada en el futuro para añadir compuestos químicamente versátiles a las superficies de las fibras, resultando posiblemente en materiales de fibra con propiedades completamente nuevas como hidrofobicidad o carga (Rodríguez Couto y Toca Herrera, 2006).

### **2.9.3 Industria alimentaria**

Las lacasas pueden ser aplicadas a ciertos procesos que mejoren o modifiquen la apariencia del color de la comida o bebidas. De esta manera, una aplicación de las lacasas involucra la eliminación de fenoles no deseados responsables del oscurecimiento, formación de turbidez en jugos de fruta, cerveza y vino (Rodríguez

Couto y Toca Herrera, 2006). Las lacasas actualmente son de interés en la panificación debido a su habilidad para atravesar enlaces de biopolímeros. Selinheimo *et al.* (2006) demostró que una lacasa de *Trametes hirsuta* incrementó la resistencia máxima de la masa y disminuyó la extensibilidad en masa de harina y masa de gluten. Minussi *et al.* (2002) ha descrito las aplicaciones potenciales de lacasa en diferentes aspectos de la industria alimentaria como biorremediación, procesamiento de bebidas, determinación de ácido ascórbico, gelificación de pectina de remolacha azucarera, en la panificación y como biosensor. Sin embargo, sugieren más estudios sobre producción de lacasa y técnicas de inmovilización de menores costos son necesarias para mejorar las aplicaciones industriales de esta enzima.

#### **2.9.4 Industria farmacéutica**

Se han utilizado lacasas en la obtención de vinblastina que es un fármaco utilizado para el tratamiento de la leucemia. Mediante el acoplamiento químico-enzimático con lacasas de la katarantina y vindolina se consigue vinblastina (Yaropolov, 1994). Otras drogas antineoplásicas como la mitomicina que está bajo investigación y derivados de la nakijiquinona (Stahl *et al.*, 2002) han sido obtenidas a partir de las aminoquinonas sintetizadas mediante el uso de lacasas (Pöckel *et al.*, 2006)

#### **2.9.5 Nanobiotecnología**

Dado que las lacasas son capaces de catalizar reacciones de transferencia del electrón sin cofactores adicionales, su uso también ha sido estudiado en biosensores para detectar varios compuestos fenólicos, oxígeno o azidas. Por otra parte, han sido desarrollados biosensores para la detección de morfina y codeína (Bauer *et al.*, 1999), catecolaminas (Lisdatt *et al.*, 1997; Leite *et al.*, 2003; Ferry y Leech, 2005), flavonoides de plantas (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2004) y también para electroinmunoensayos (Kuznetsov *et al.*, 2001). La nanotecnología contribuye al desarrollo de biosensores más pequeños y más eficientes a través de

deposición controlada y adsorción específica de biomoléculas en diferentes tipos de superficies, alcanzando orden micro y nanómetro. Por lo que se refiere a lacasas, la inmovilización tiene una influencia importante en la actividad de biosensor (Freire *et al.*, 2001). Martele *et al.* (2003) han mostrado que el micropatrón es un método eficiente para la inmovilización de lacasas en una superficie sólida en orden de desarrollar un biosensor multifuncional. También Roy *et al.* (2005) encontró que cristales de enzima reticulados (CLEC) de lacasa de *Trametes versicolor* podría ser usada como biosensor con una gran ventaja sobre la enzima soluble. Cabrita *et al.* (2005) han inmovilizado la lacasas de *Coriolus versicolor* en N-Hidroxisuccianimida terminado en monocapas autoensambladas en oro. Este procedimiento podría ser útil para el desarrollo de biosensores. En suma, un electrodo enzimático basado en la coinmovilización de un polímero redox de osmio y una lacasa de *Trametes versicolor* en electrodos de carbono vítreo ha sido aplicado para la detección amperométrica ultrasensitiva de neurotransmisores catecolamina y dopamina, epinefrina y norepinefrina, alcanzando límites de detección nanomolares (Ferry y Leech, 2005). La lacasa también puede ser inmovilizada en el cátodo de celdas de biocombustibles que podrían proveer poder, por ejemplo, para sistemas pequeños de transmisión (Chen *et al.*, 2001; Calabrese *et al.*, 2002). Las celdas de biocombustibles son extremadamente atractivas desde un punto de vista medio ambiental porque la energía eléctrica es generada sin combustibles de combustión, proveyendo así una fuente de energía más limpia (Rodríguez-Cuoto y Toca-Herrera, 2006).

#### **2.9.6 Biorremediación de suelos**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) junto con otros xenobióticos son una fuente importante de contaminación de suelos, por lo tanto, su degradación es de gran importancia para el medio ambiente. Las propiedades catalíticas de las lacasas pueden ser usadas para degradar dichos compuestos. Así, las lacasas son capaces de mediar el acoplamiento de metabolitos reducidos de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) a una matriz orgánica de suelo, lo que resulta en la detoxificación de residuos de munición (Durán y Esposito, 2000). Por otra parte,

los PAHs, los cuales surgen de depósitos de aceite natural y la utilización de combustibles fósiles también han sido degradados por lacasas (Pointing, 2001).

### **2.9.7 Química sintética**

Las lacasas también pueden ser de gran interés en la química sintética donde han sido propuestas para aplicarse en la desprotección oxidativa (Semenov *et al.*, 1993) y producción de polímeros complejos y agentes médicos (Xu, 1999; Mai *et al.*, 2000; Uyama y Kobayashi, 2002; Kurisawa *et al.*, 2003; Nicotra *et al.*, 2004). Mustafa *et al.* (2005) sintetizó colorantes fenólicos usando una lacasa industrial llamada Suberase® (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark).

### **2.9.8 Cosmética**

En la industria cosmética estas enzimas podrían ser utilizadas por ejemplo en tintes para cabello a base de lacasa que sean menos irritantes y más fáciles de manejar que los tintes actuales ya que las lacasas remplazan el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante en la fórmula del tinte (Roure *et al.*, 1992; Aaslyng *et al.*, 1996; Lang y Cotteret, 1999). Recientemente se han desarrollado las preparaciones cosméticas y dermatológicas contienen proteínas para el aclaramiento de la piel (Golz-Berner *et al.*, 2004).

### **2.10 *Trametes hirsuta* Bm-2**

El basidiomiceto *Trametes hirsuta* Bm-2 fue aislado en estudios previos a partir de muestras de desechos de madera. Se purificaron parcialmente tres isoformas (Lac1, Lac2 y Lac3) que muestran algunas propiedades similares pero difieren en otras. Algunas características importantes fueron su resistencia a solventes orgánicos y estabilidad en amplios rangos de temperatura (Zapata-Castillo *et al.*, 2012). Se demostró que estas lacasas son capaces de decolorar el

índigo carmín y efluentes textiles y que su eficiencia de remoción de tintes incrementa notablemente con la adición de mediadores redox (Zapata-Castillo *et al.*, 2014). También se determinó que la adición de guayacol y 2,6 dimetoxifenol y metales como el cobre y hierro a bajas concentraciones (0.05 mM) en medio salino incrementan la producción de lacasas de *T. hirsuta* (Burgos-Jiménez, 2010).

Se detectó la presencia de al menos dos isoformas de lacasas (Lac 1 y Lac2) con pesos moleculares aparentes de 65 y 125 kDa en geles SDS-PAGE y se determinó la inducción diferencial en presencia de fenoles guayacol, ácido ferúlico, 2-6 dimetoxifenol y 2,5 xilidina y la concentración de los mismos. En presencia de cobre y hierro se encuentran ambas isoformas. Tapia-Tussell (2011) aisló un fragmento del gen lacasa de 208 pb que presentó un 100% de identidad con secuencias de genes de lacasas. El análisis molecular mediante RT-PCR evidenció que el ácido ferúlico, la vainillina y el guayacol inducen la expresión del gen de la lacasa de *T. hirsuta* a nivel transcripcional. Asimismo, se reveló la presencia de dos genes que se expresan diferencialmente.

### **3. HIPÓTESIS**

Los residuos lignocelulósicos inducirán la transcripción del gen lacasa y los niveles de lacasa extracelular.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Las lacasas son enzimas que poseen un alto potencial biotecnológico para diversos procesos industriales. Algunas limitaciones para su aplicación son el alto costo de producción, la baja actividad y el escaso conocimiento a nivel bioquímico y genético de estas enzimas. El hongo *Trametes hirsuta* Bm-2 ha demostrado un potencial de aplicación en el tratamiento de efluentes, por tanto, es importante el desarrollo de procesos rentables para incrementar la actividad de lacasas. Previamente se demostró en este hongo que la adición de fenoles exógenos al medio salino estimula la síntesis de lacasas y que la regulación ocurre a nivel transcripcional, sin embargo, los fenoles son caros y tóxicos. Otra alternativa para aumentar la producción de lacasas es el uso de residuos agroindustriales que son muy abundantes y generalmente se acumulan como desperdicios. Existe una gran cantidad de estudios donde se utilizan estos residuos como sustratos, sin embargo solo se analiza la fisiología de la producción de estas enzimas, siendo muy escasos los reportes donde simultáneamente se evalúa la síntesis de enzimas a nivel molecular. Por esta razón es importante conocer las diferencias que existen en la expresión del gen de lacasa durante el curso de su cultivo, cuyo conocimiento podría ser utilizado para el desarrollo de estrategias para la sobreexpresión de la misma, para escalar su producción y utilizarla en procesos biotecnológicos como la decoloración de tintes.

## 5. OBJETIVOS

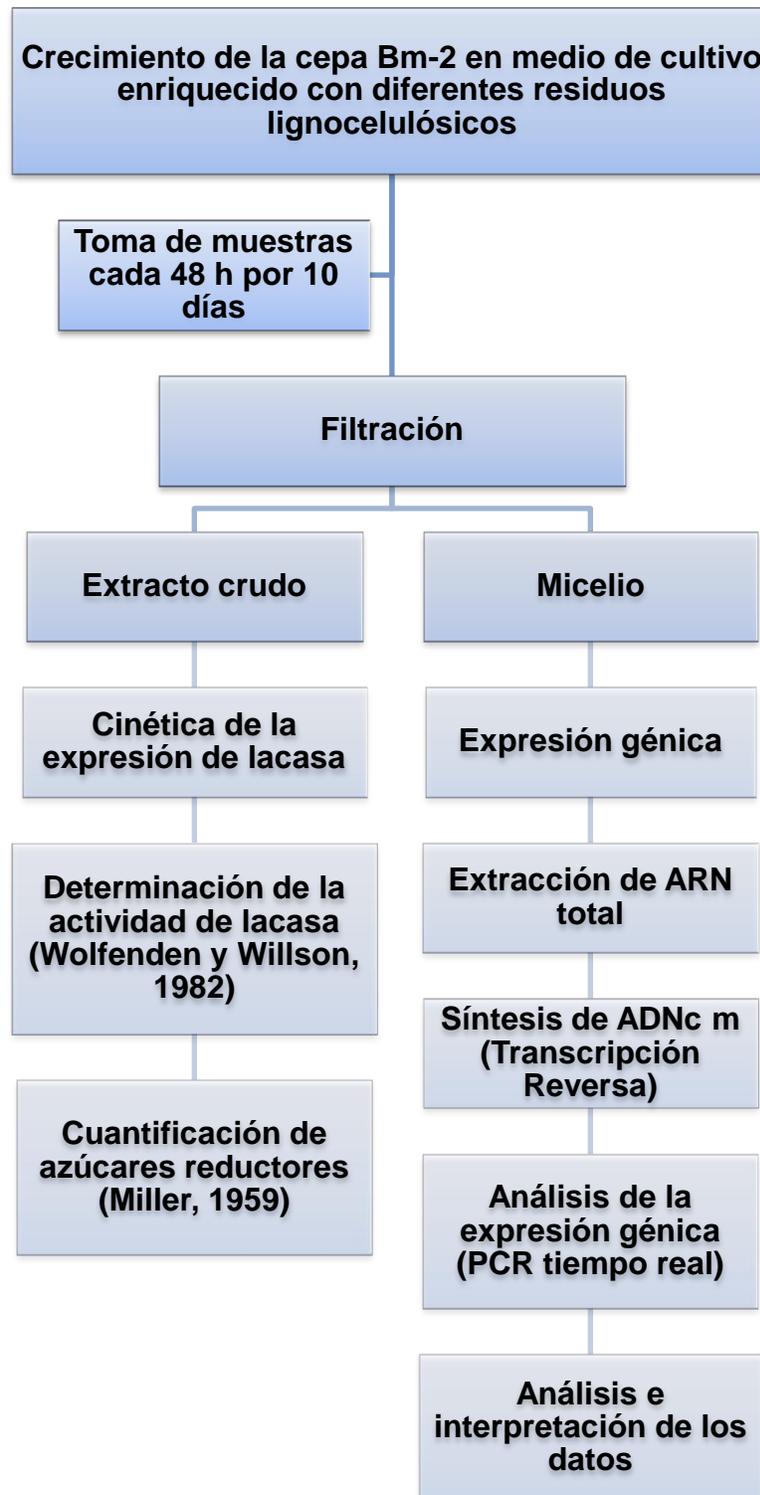
### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la cinética de expresión del gen de la lacasa de *Trametes hirsuta* Bm-2 inducido por residuos lignocelulósicos.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las cinéticas de producción de la enzima lacasa durante los cultivos de *T. hirsuta* Bm-2 en medio mínimo y enriquecidos con residuos lignocelulósicos.
2. Conocer la cinética de transcripción del gen de lacasa durante el cultivo de *T. hirsuta* (Bm-2) en los medios suplementados con cáscara de toronja y salvado de trigo.
3. Analizar los niveles de expresión del gen de la lacasa entre los diferentes tratamientos.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa *Trametes hirsuta* Bm-2 (GQ280373), aislada de desechos de madera de Yucatán que forma parte de la colección de cultivos del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Microbiana del Instituto Tecnológico de Mérida. La cepa se mantuvo en placas con extracto de malta 2% y agar bacteriológico 2%.

### 7.2 Producción del inóculo

Para la obtención del inóculo se utilizó el medio YMPG cuya composición por litro es: Glucosa 10.0 g, Extracto de malta 10.0 g, Peptona 2.0 g, Extracto de levadura 2.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50.0 g, Hidrocloruro de tiamina 1.0 mg, Asparagina 1.0 g. Se ajustó el pH a 4.5, se transfirieron 50 ml del medio a matraces de 250 ml y se esterilizaron a 121 °C por 15 min en autoclave. En cada matraz se adicionaron 2 cuadros del hongo de 1 cm<sup>2</sup> y se incubaron a 35°C y 150 rpm durante 4 días. La biomasa obtenida se homogenizó con el T18 Basic ULTRA-TURRAX® de IKA®.

### 7.3 Preparación de residuos lignocelulósicos

Se utilizaron cáscaras de plátano, mandarina, naranja dulce y toronja como residuos lignocelulósicos. El tamaño de partícula fue de 7.5 mm x 7.5 mm aproximadamente. Se sumergieron 1 hora en KOH 83.17 mM, se enjuagaron con agua destilada y fueron secados a 65°C. Posteriormente se molieron en una licuadora de laboratorio Waring comercial modelo 51BL30 durante 60 segundos.

El salvado de trigo utilizado fue de la marca comercial Bran Flakes de Kellog's y no recibió tratamiento alguno.

#### **7.4 Producción de lacasas**

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL medio Rodríguez Couto *et al.* (2006). La composición por litro fue: Glucosa 2 g, Extracto de malta 15 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.9 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g, Hidrocloruro de Tiamina 0.5 ml. A cada matraz se le añadió 3% (p/v) de los residuos lignocelulósicos pretratados con KOH. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 20 minutos. Para el medio no inducido se utilizó el medio basal (BL) o salino que es una modificación del medio descrito por Kirk *et al.* (1986) y no se le adicionó el Tween 20 y ni el alcohol veratrílico. La composición por litro fue: glucosa 10 g, tartrato de amonio 1.32 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  10 mg, Hidrocloruro de Tiamina 10 mg, solución de elementos traza. El pH se ajustó a 4.5 con NaOH concentrado. La composición de la solución de elementos traza por litro fue: ácido nitriloacético 1.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3 g, NaCl 1 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.185 g,  $\text{CaCl}_2$  0.08 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.18 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01 g,  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.01 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.01 g y  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.012 g. El medio y la solución se esterilizaron por separado, el primero se esterilizó en un autoclave a 121 °C por 15 minutos y la segunda por filtración estéril mediante un sweenex que contenía una membrana millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro.

La inoculación se llevó a cabo añadiendo 1 ml del inóculo homogenizado. Posteriormente, los matraces se incubaron a 35 °C con agitación de 150 rpm. Las muestras se tomaron cada 48 horas durante 10 días, se centrifugaron y en el extracto libre de células se determinó la actividad de lacasas, y azúcares reductores. En el micelio se realizó la extracción de RNA total. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### **7.5 Actividad de la lacasa**

La actividad de lacasa se determinó por espectrofotometría usando ABTS (2,2'-azino-bis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) 0.5 mM en buffer acetatos 1 M pH 4.5. Se midió el incremento en la absorbancia a 420 nm y la actividad fue calculada a partir del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de 36,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Una unidad de actividad de lacasa es la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu$ mol de ABTS/ml/min, bajo las condiciones de ensayo (Wolfenden y Willson, 1982).

### **7.6 Cuantificación de azúcares reductores**

Los azúcares reductores se cuantificaron mediante el método de Miller (1959). Se adicionaron 0.1 ml de muestra en 1.4 ml de agua destilada y 3 ml de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Los tubos se hirvieron durante 5 minutos, enfriados a temperatura ambiente y se aforaron a 15 ml. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm y la concentración se determinó extrapolando los valores de absorbancia a una curva estándar de glucosa.

### **7.7 Aislamiento de ARN total y síntesis de cDNA**

El micelio de los cultivos inducidos con toronja, salvado de trigo y el control fue cosechado para la extracción de ARN total. Se utilizó el método de Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen). Se maceró el micelio congelado a -80 °C y se transfirió el polvo a un tubo eppendorf estéril de 2 ml y se añadieron 500  $\mu$ l del reactivo Plant RNA Purification Reagent, se agitó en vórtex por 30 s hasta que el macerado estuvo totalmente resuspendido. Se incubó el homogenizado por 5 minutos en hielo y se centrifugó a 10,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril. Se adicionaron 100  $\mu$ l de NaCl 5M para clarificar el extracto y se mezcló por inversión. Se adicionaron 300  $\mu$ l de cloroformo y agitó vigorosamente

en vórtex hasta lograr una sola fase. Se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm a 4°C y se transfirió el sobrenadante (100 µl) a un tubo eppendorf limpio y estéril. Se añadió isopropanol a temperatura ambiente para precipitar y se incubó por 10 minutos en hielo. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70% frío y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se secaron por 5-10 minutos. El ARN se resuspendió en 50 µl de agua ultrapura libre de nucleasas.

La integridad del mismo fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, teñido con bromuro de etidio.

Para remover el ADN, las muestras fueron tratadas con 1 U de DNase I (Invitrogen) por µg de ARN total. Se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y la concentración se calculó teniendo en cuenta que 40 µg/ml equivalen a una unidad de absorbancia (Sambrook *et al.*, 1989). Se normalizó la concentración de todas las muestras.

La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó utilizando el ARN mensajero como molde y 500 µg/ml de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen) con la enzima SuperScript II RT (Invitrogen) siguiendo la instrucciones del proveedor.

### **7.8 Amplificación del gen lacasa mediante qPCR**

Los ADNc se amplificaron usando los iniciadores degenerados Cu1F (5'- CAT(C) TGG CAT(C) GGN TTT(C) TTT(C) CA-3') y Cu2R (5' -G G(A)CT GTG GTA CCA GAA NGT NCC -3') reportados por (Luis *et al.*, 2004). La amplificación se realizó en un volumen final de reacción de 20 µl que contenía 1X de master mix SsoAdvance™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad), 0.5 µM de cada iniciador y 2 µl de ADNc en un termociclador CFX96 Touch (Bio-Rad). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de

desnaturalización de 10 min. a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 20s. a 94 °C, 20s de alineamiento a 55 °C y 40s. de extensión a 72 °C y una curva de melting con incrementos de 0.5 °C cada 5 s en un gradiente lineal de 65 a 95 °C. Como gen de referencia se utilizó la actina, que se amplificó simultáneamente con los iniciadores Act-512F 5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3' y Act-783R 5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3' reportados por (Carbone y Kohn, 1999). Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y se incluyeron controles sin templado.

### 7.9 Estrategia de cuantificación y normalización de los datos de qPCR

La adquisición de los Cq y el análisis se llevó a cabo usando el software CFXManager 3.0 de Bio-Rad. El nivel de transcripción del gen fue expresado como Cantidades Relativas (CR) en comparación al gen de la  $\beta$ -actina (ecuación 1) y como Expresión Relativa (ER) al medio mínimo que se utilizó como calibrador. Los datos fueron cuantificados con respecto al cultivo control según el método  $\Delta\Delta Cq$  (ecuación 2) (Livak y Schmittgen, 2001).

$$CR = 2^{-\Delta CqE} \quad (1)$$

$$ER = 2^{-\Delta\Delta CqE} \quad (2)$$

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

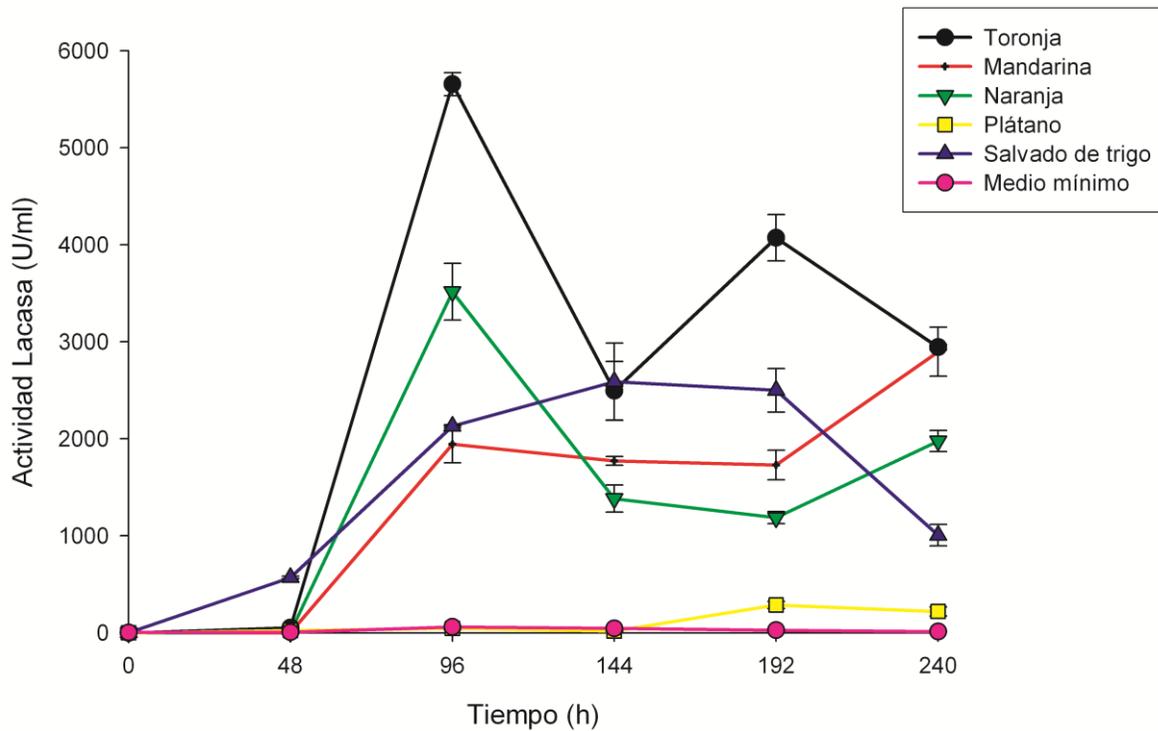
### 8.1 Efecto de los residuos lignocelulósicos en la producción de lacasa de *Trametes hirsuta* (Bm-2)

La producción de lacasa está altamente afectada por las cepas productoras de esta enzima, así como la naturaleza y composición de los residuos lignocelulósicos que se agregan a los cultivos, por lo que la selección del sustrato adecuado es un paso esencial (Birhanli y Yeşilada, 2013). En este trabajo se determinó la cinética de producción de lacasas por *Trametes hirsuta* Bm-2 en un medio enriquecido con cítricos (cáscaras de toronja, naranja y mandarina), cáscara de plátano y salvado de trigo que son sustratos de alta disponibilidad por su abundancia y han demostrado ser buenos sustratos para la producción de lacasas fúngicas (Bertrand *et al.*, 2013).

La figura 8.1 muestra que en todos los sustratos se produjo alta actividad de lacasa extracelular aunque la respuesta fue diferente. En el curso de la producción de lacasas en algunos sustratos se observó un comportamiento variable con incrementos y decrementos en la producción de estas enzimas. De todos los sustratos el mejor fue la cáscara de toronja que mostró la mayor actividad de lacasa. Esta actividad se detectó a partir de las 48 horas de cultivo y hubo un incremento pronunciado a las 96 horas donde se obtuvo 5655.09 U/ml. Posteriormente hubo un decremento de la actividad y a las 192 horas se incrementó nuevamente. La actividad máxima en cáscara de naranja y salvado de trigo fue de 3515 y 2588 U/ml a las 96 y 144 horas respectivamente, mientras que en el medio con cáscara de mandarina y plátano fue de 2895 y 285 U/ml (a las 240 y 192 h) respectivamente. La producción de lacasas en estos residuos se incrementó entre 4-81 veces con respecto al medio mínimo.

En la tabla 8.1 se observa que la toronja presenta la menor cantidad de lignina (6 mg/100 g de residuo) y la mayor actividad de lacasa que representa un incremento de 81 veces con respecto al medio mínimo. Los residuos de naranja, mandarina y

salvado de trigo presentan un elevado contenido de lignina (10, 11 y 15 mg/100g de residuo, respectivamente), sin embargo no se incrementó la actividad de lacasa comparada con la obtenida en los cultivos con toronja. También se observa que aunque los residuos de plátano contienen 14 mg/100 g de residuo el incremento en la actividad con respecto al medio mínimo fue el menor (4 veces).



**Figura 8.1** Cinética de producción de lacasa en cultivos sumergidos de *Trametes hirsuta* Bm-2 inducidos con diferentes residuos lignocelulósicos a 35 °C durante 240 horas.

Es importante señalar que la composición de la lignina puede variar en función de la fuente de la que proviene y ser un factor importante en la producción de lacasas ya que el tipo y contenido de monómeros fenólicos y/o aromáticos influye en la síntesis de estas enzimas. Diversos estudios de la producción de lacasas en hongos del género *Trametes* han mostrado la eficiencia de la adición de residuos agroindustriales en la síntesis de lacasas. Bakkiyaraj *et al.*, 2013 mostraron la

máxima actividad de lacasas (9300 U/L) en un cultivo de *Trametes hirsuta* 141 utilizando salvado de trigo obtenido de la molienda de la industria de trigo como fuente de carbono, 8512 U/L con cáscara de limón, 6543 U/L con bagazo y 6284 U/L con cáscara de naranja. Lorenzo *et al.*, 2002 adicionaron salvado de cebada, tallos de uva y semillas de uva para la producción de lacasas en *Trametes versicolor* (CBS100.29) y la actividad máxima fue de 500-600, 300-400 y 200-250 U/L, entre los días 24-37, 24-37 y 25-37, respectivamente. Asimismo, Osma *et al.* (2007) lograron obtener en cáscara de mandarina 228 U/L al tercer día de cultivo en *Trametes pubescens*. Birhanli y Yesilada (2013) obtuvieron la actividad más alta el segundo día de cultivo de *Trametes versicolor* suplementado con espadaña pulverizada (1157 U/L) seguido de cáscara de semilla de albaricoque (1007 U/L); mientras que los cultivos de *Trametes trogii* alcanzaron actividades de 286 y 175 U/L el quinto día con cáscara de nuez y salvado de trigo pulverizado respectivamente. Durante el cultivo de *Trametes pubescens* en cáscara de mandarina la elevada actividad de lacasas producida fue asociada a la presencia de compuestos aromáticos solubles como flavonas y flavonoides capaces de inducir la síntesis de enzimas. Este incremento en la actividad también fue relacionado al contenido de celulosa en el desecho que favoreció el crecimiento del hongo (Srinivassan *et al.*, 1995).

**Tabla 8.1 Niveles máximos de producción de lacasas de *T. hirsuta* Bm-2 en residuos lignocelulósicos**

| Medio                   | *Lignina<br>(mg/100 g) | Act máxima<br>(U/ml) | Tiempo<br>(h) | Incremento<br>(Veces) |
|-------------------------|------------------------|----------------------|---------------|-----------------------|
| <b>M. mínimo</b>        | 0                      | 60                   | 96            | 0                     |
| <b>Toronja</b>          | 6                      | 5655                 | 96            | 81                    |
| <b>Naranja</b>          | 11                     | 3515                 | 96            | 58                    |
| <b>Mandarina</b>        | 10                     | 2895                 | 240           | 48                    |
| <b>Salvado de trigo</b> | 15                     | 2588                 | 144           | 43                    |
| <b>Plátano</b>          | 14                     | 285                  | 192           | 4                     |

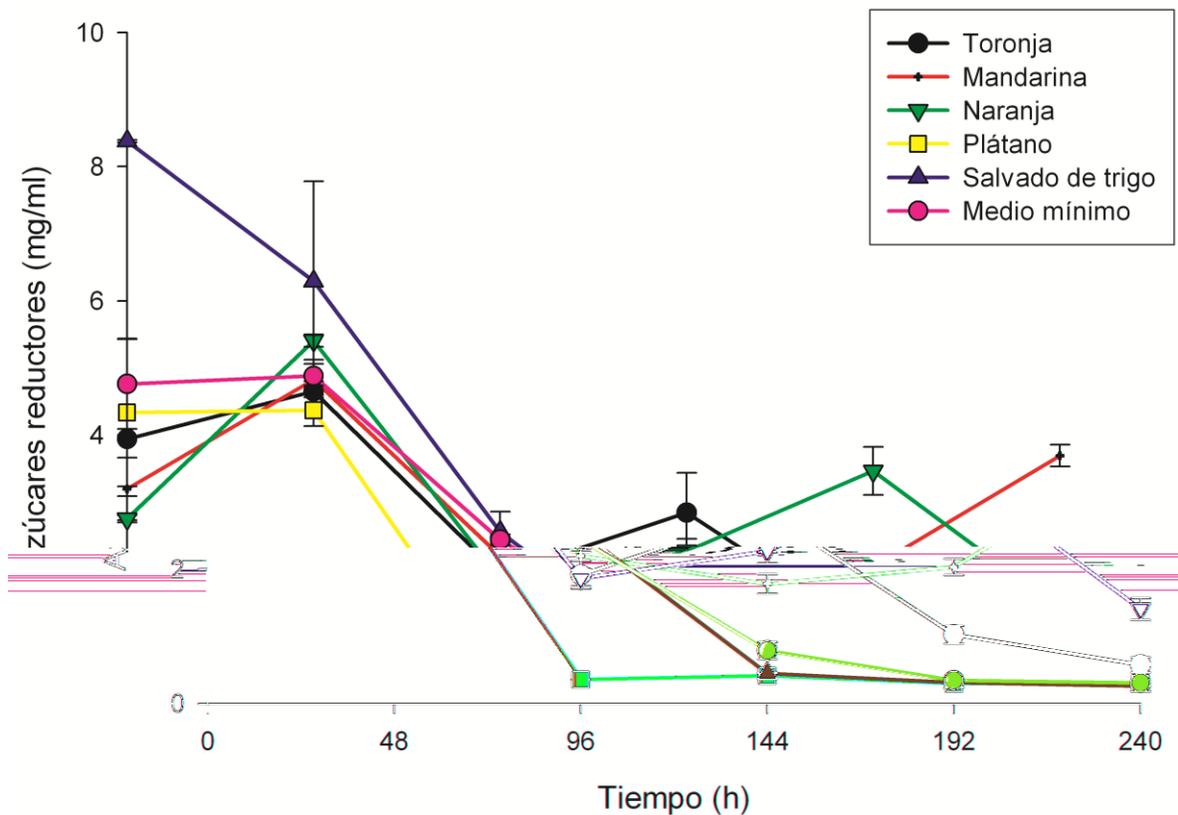
\*Graminha *et al.*, 2008

En hongos del género *Trametes* se ha demostrado que la adición de monómeros de la lignina como el ácido ferúlico, guayacol y ácido cumárico estimulan la síntesis de lacasas a nivel transcripcional (Terrón *et al.*, 2004). El efecto inductor de estos residuos ha sido relacionado a los monómeros fenólicos que forman parte de la estructura de la lignina como la xilidina, ácido ferúlico y ácido verátrico. Se ha evidenciado que cuando estos compuestos son añadidos rutinariamente a los cultivos fúngicos incrementan la producción de lacasa (Bakkiyaraj *et al.*, 2013; Cambria *et al.*, 2011; Elisashvili *et al.*, 2010; Terrón *et al.*, 2004; D'Souza *et al.*, 1999). En *T. hirsuta* Bm-2 se ha demostrado que los compuestos aromáticos guayacol, vainillina y ácido ferúlico aumentan hasta 3-4 veces la producción de lacasas (Burgos-Jiménez, 2010).

También se determinó la concentración de azúcares en los extractos libres de células. La figura 8.2 muestra el consumo de azúcares reductores en los diferentes medios con residuos lignocelulósicos. La cáscara de naranja, mandarina y toronja presentaron un incremento de azúcares a las 48 horas, alcanzando valores de 5.40, 4.82 y 4.65 g/L, y en el curso de los cultivos los azúcares disminuyeron a valores de 1-2 g/L. Aún cuando en salvado de trigo la concentración inicial de azúcares fue casi del doble con respecto a los otros sustratos se presentó una reducción gradual a lo largo del cultivo fueron completamente consumidos a las 144 horas donde el valor azúcares residuales fue de 0.4 g/L.

Estos resultados coinciden con otros datos reportados. Por ejemplo, en *Trametes versicolor* se observó un incremento de azúcares el segundo día de cultivo, alcanzando valores cercanos a 6 g/L en un medio con salvado de cebada y tallos de uva y 7.5 g/L en semillas de uva. Posteriormente la concentración disminuyó drásticamente a 0.5 g/L hacia el final del cultivo (Lorenzo *et al.*, 2002). En cultivos de *Trametes hirsuta* (BT 2566) suplementados con salvado de cebada y semillas

de uva presentaron una concentración cercana a 8 g/L y 14 g/L respectivamente. A lo largo del cultivo la concentración disminuyó alrededor de 2 g/L (Moldes *et al.*, 2003). En cultivos en estado sólido de *Trametes versicolor* suplementado con pulpa de tomate la concentración de azúcares aumentó al segundo día disminuyendo hasta el cuarto día, mientras que el contenido de azúcares observado en cultivos de *Pleurotus ostreatus* disminuyó y no se observó ningún cambio significativo (Iandolo *et al.*, 2011).



**Figura 7.2 Consumo de glucosa medido como azúcares reductores en cultivos sumergidos de *Trametes hirsuta* Bm-2 inducidos con diferentes residuos lignocelulósicos a 35 °C durante 240 horas.**

El incremento en la concentración de azúcares a tiempos cortos (48h) pudiera ser relacionado a la acción de enzimas hidrolasas extracelulares o enzimas asociadas

a la pared del hongo que degradan parcialmente los polisacáridos como celulosa y hemicelulosa presentes en el residuo para favorecer el crecimiento del hongo. Es importante señalar que la actividad de lacasas fue muy baja, lo que sugiere que *T. hirsuta* puede usar el contenido de nutrientes de los residuos en las etapas iniciales del cultivo (2 días) porque estos sustratos son ricos en carbohidratos, fibra y minerales. También se sabe que la concentración de azúcares en el medio influye en la síntesis de lacasas. Es así que un elevado nivel de azúcares puede reprimir la síntesis de lacasas y esto difiere entre especies y cepas. El análisis de los resultados sugiere que la elevada concentración de azúcares presente en el medio de cultivo podría actuar como represor de las enzimas en *Trametes hirsuta* Bm-2 y cuando la concentración disminuye, aunado a la liberación de fenoles que pueden actuar como inductores, se favorece la producción de lacasas. Previamente, se ha reportado que algunos hongos como *Trametes pubescens* (Galhaup *et al.*, 2002b) y *Trametes* sp. AH28-2 (Xiao *et al.*, 2006) están sujetos a represión catabólica por la concentración de azúcares en el medio. Recientemente se reportó que *Trametes hirsuta* (Tišma *et al.*, 2012) y *Trametes pubescens* (Gonzalez *et al.*, 2013) incrementaron significativamente la actividad de lacasa cuando la glucosa se consumió. Čilerdžić *et al.*, 2011 encontraron que la actividad de lacasa disminuyó significativamente cuando cultivos de *Trametes hirsuta* BEOFB30 con cáscaras de cítricos se enriquecen con glucosa. En los hongos *Coriolus versicolor* (Collins y Dobson, 1995), *Ganoderma lucidum* (Perumal, 1997), *Lentinula eodes* (Cavallazzi *et al.*, 2005) y *Grifola frondosa* (Arora y Rampal, 2002) la producción de lacasas alcanzó los niveles más altos a 10 g/L de glucosa mientras que *Trametes versicolor* (Minussi *et al.*, 2007) y *Trametes gallica* (Dong, *et al.*, 2005) a 20 y 5 g/L, respectivamente.

Los resultados obtenidos durante el cultivo del hongo en los residuos, muestran el potencial de la cáscara de toronja como alternativa para la producción de lacasa. Sin embargo, las cáscaras de naranja, mandarina y el salvado de trigo también podrían ser considerados como alternativa, especialmente en comparación con medios de cultivos sintéticos, más aún considerando que la producción de lacasas en estos medios no ha sido optimizada. Comúnmente los residuos

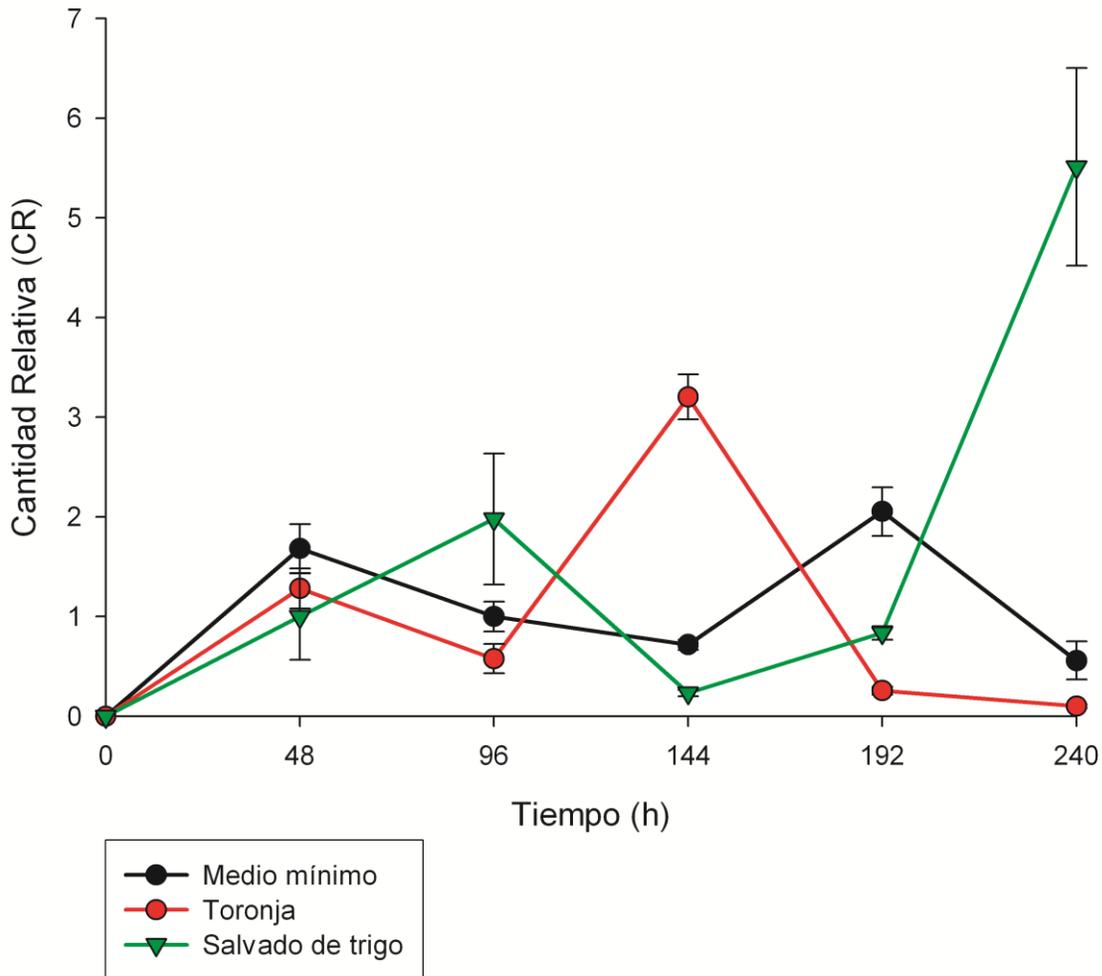
lignocelulósicos, especialmente los de cítricos, se generan en grandes concentraciones y representan problemas de contaminación en Yucatán y en el país. Su reutilización podría contribuir a la solución estos problemas, y asimismo representan una fuente para inducir la síntesis de lacasas disminuyendo los costos de producción y el uso de compuestos tóxicos (Revankar y Lele, 2006).

## 8.2 Dinámica transcripcional de lacasas en sustratos lignocelulósicos y medio mínimo

Para validar y diferenciar los efectos de los cultivos en los niveles de transcripción de RNAm, se realizaron análisis RTqPCR. Para medir adecuadamente la expresión del gen se requiere un control interno que es procesado en paralelo con el gen lacasa. Los genes de referencia endógenos ideales deben tener niveles equivalentes de transcritos que no se modifiquen en función de las condiciones experimentales (Vandesompele, 2002). Es importante señalar que la eficiencia de la amplificación de la PCR es influenciada significativamente por los iniciadores usados (Bustin, 2004), componentes de la PCR y procesamiento de la muestra (Suslov y Staindler, 2005).

Se obtuvo el RNA total del micelio producido en todos medios lignocelulósicos y el medio mínimo como control de normalización. Se utilizó la  $\beta$ -actina como gen endógeno el cual ha sido reportado en estudios de expresión génica de la lacasa en esta cepa (Tapia-Tussell, 2011). Cabe mencionar que la concentración de fenoles provenientes de las cáscaras de naranja, mandarina y plátano interfirieron en la amplificación del gen endógeno, por lo tanto, afecta también la amplificación del gen de la lacasa lo que no permitió analizar la expresión de lacasas en estos sustratos. A diferencia, en salvado de trigo y toronja y medio mínimo los niveles de transcritos del gen endógeno no se modificaron, por lo que el análisis transcripcional fue evaluado en los cultivos provenientes de estos sustratos.

En la figura 8.3 se muestra la cinética de los niveles de transcritos producidos por la cepa Bm-2 en los tres medios de cultivo. En el medio mínimo se alcanzaron los máximos valores de transcritos a las 192 y 48 horas (2.05 y 1.68 de Cantidad Relativa [CR], respectivamente) y los menores transcritos fueron a las 240 h con un valor de 0.55 CR. Los dos medios enriquecidos con residuos lignocelulósicos aumentaron los niveles de transcripción del gen *lcc* a diferentes tiempos del cultivo, mostrando diferentes perfiles entre si.



**Figura 8.3** Cinética de transcritos del gen *lacasa* en *Trametes hirsuta* Bm-2 crecido en medio mínimo y medios inducidos. Las barras de error representan el error estándar.

En el medio enriquecido con toronja se detectaron los mayores valores de transcripción a las 144 y 48 horas con valores de expresión relativa de 3.20 y 1.28 y el mínimo nivel de transcripción a las 240 h con valores de 0.10.

En el tratamiento con salvado de trigo la expresión del gen *lcc* alcanzó su máximo valor (5.50 CR) a las 240 horas y el nivel más bajo fue a las 144 horas con 0.23 CR. Cabe señalar que para este tratamiento el valor alcanzado a las 96 horas

(1.97 CR) fue muy cercano a los máximos obtenidos en el medio enriquecido con toronja.

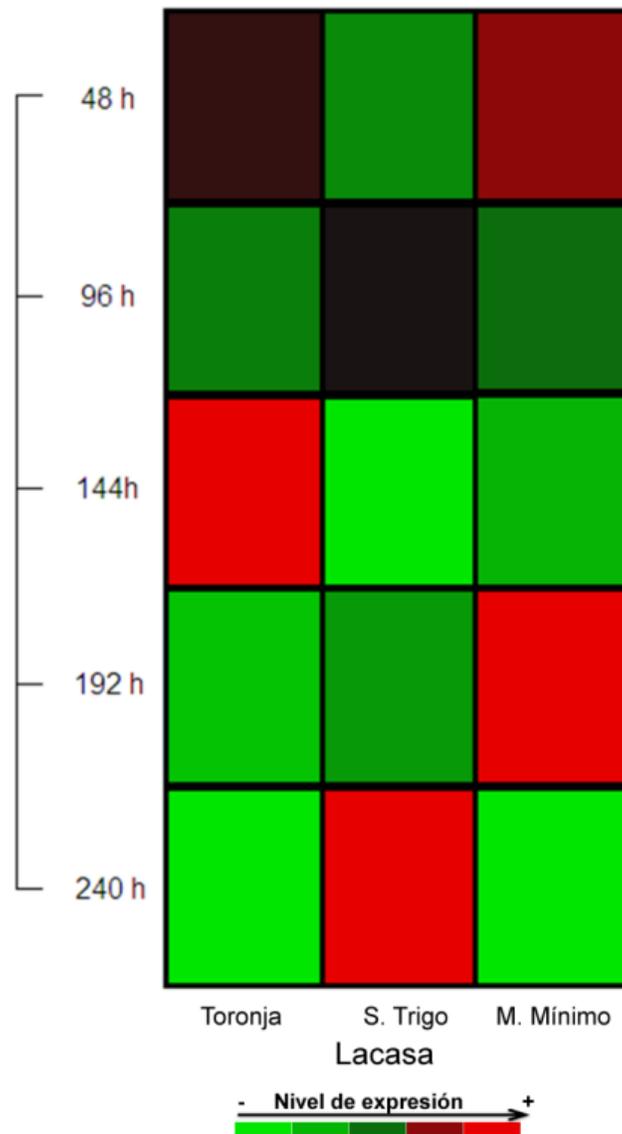
Para analizar la expresión de lacasas es importante tomar en consideración las variaciones que ocurren en el matraz durante el cultivo del hongo. Esto significa que a diferentes tiempos de cultivo ocurren cambios en la composición del medio como el pH, la concentración de azúcares y fenoles. Estos factores inducen o reprimen la síntesis de las enzimas y pueden regular diferencialmente la expresión de los genes.

Las variaciones en el nivel de transcripción a diferentes tiempos en un mismo cultivo, podría estar asociada a la expresión diferencial de los genes de lacasa (*lcc1* y *lcc2*) que han sido previamente identificados en esta cepa. Tapia-Tussell *et al.*, 2015 demostró la diferencia transcripcional de los genes *lcc1* y *lcc2* al utilizar como inductores compuestos fenólicos derivados de la lignina con estructura química diferente (ácido ferúlico, vainillina y guayacol). Paralelamente, Burgos-Jiménez (2010) identificó dos isoformas lacasas Lac1 y Lac2 de 125 y 65 kDa, respectivamente, en los extractos enzimáticos producidos en los mismos cultivos y Zapata-Castillo *et al.*, 2015 purificaron parcialmente tres isoenzimas Lac1, Lac2 y Lac3 que mostraron algunas diferencias en sus propiedades.

Las variaciones transcripcionales observadas en este estudio coinciden con lo reportado por Park *et al.* (2014). En dicho estudio evaluaron la dinámica transcripcional de genes de lacasa del hongo *Pleurotus ostreatus* en un medio enriquecido con pulpa de manzana obteniendo diferentes niveles de transcriptos entre los genes en el tiempo.

Otra manera de analizar la expresión de genes es mediante la técnica del bioclustering. El mapa de calor es la representación 2D de una matriz donde las filas representan tiempo de cultivo y las columnas condiciones. Los valores de expresión están dados para un gen de referencia ( $\Delta C_q$ ) o para un gen de referencia y muestra. ( $\Delta\Delta C_q$ ). El color e intensidad depende del nivel de expresión. En la Figura 8.4 se observa que existen dos regiones de incremento

transcripcional en cada tratamiento, una a las 48 h para toronja y 96 h para salvado de trigo que puede estar asociadas a la inducción por algún componente del medio. En la segunda región se alcanzan los mayores niveles de transcritos a las 144 h en el medio con toronja con un incremento de 2.5 veces mayor que el medio mínimo. En el caso del medio con salvado de trigo el mayor valor de transcritos se obtuvo a las 240 h siendo 4.9 veces mayor que en medio mínimo y 5.3 con respecto al medio enriquecido con toronja.



**Figura 8.48** Mapa de calor de los transcritos del gen lacasa en *Trametes hirsuta* Bm-2 crecido en medio mínimo y medios inducidos.

Este aumento considerable en los niveles de transcritos pudiera estar asociado a la degradación de los residuos lignocelulósicos que generan moléculas que pueden servir como inductores del gen de la lacasa o mediadores del mismo (Martins *et al.*, 2010). Los residuos lignocelulósicos evaluados en este trabajo poseen una amplia gama de compuestos fenólicos en su estructura. En el salvado de trigo están presentes el ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido vainillico, ácido sinápico y en algunas ocasiones ácido cafeíco (Vaher *et al.*, 2010) los cuales han mostrado tener un efecto inductor en los genes de lacasa de *Clavariopsis aquatica* (Solé *et al.*, 2012), *Trametes velutina* 5930 (Yang *et al.*, 2013), *Pleurotus ostreatus* (Pezzella *et al.*, 2013), *Coriolopsis rigida* (Saparrat *et al.*, 2010), *Trametes* sp. I-62 (Terrón *et al.*, 2004), entre otros. Escobar-Blanco, 2010 identificó la composición de fenoles en residuos de toronja flavonoides como la eriocitrina, luteolin-7-glucósido, nobiletina, rutina, naringina y quercetina. Estos compuestos se han logrado producir en fermentaciones en estado sólido de hongos de la podredumbre (Martins *et al.*, 2011) demostrando que son liberados durante el tiempo de cultivo.

Cabe mencionar que la regulación de la síntesis de lacasas en residuos agroindustriales ha sido analizada comunmente monitoreando el incremento en la actividad de lacasas durante el cultivo en comparación con la actividad producida en medio mínimo (Ćilerdžić *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2013; landolo *et al.*, 2011). Sin embargo, estos estudios carecen del análisis del efecto inductor a nivel transcripcional de los genes de la lacasa.

### **8.3 Análisis de la expresión génica con el método $\Delta\Delta^{Cq}$**

El cálculo la expresión relativa, se basa en la comparación de los valores Ct obtenidos en cada condición del estudio, normalizados con los controles internos. Uno de los métodos más utilizados es el  $2^{-\Delta\Delta^{Cq}}$ , que asume una eficiencia del 100% en todas las reacciones. En este trabajo se analizaron los niveles de expresión relativa con respecto al medio mínimo el cual se consideró como valor

unitario y las comparaciones se hicieron con los cultivos que contenían los residuos de toronja y salvado de trigo. En la figura 8.5 A se puede observar las variaciones en el nivel de expresión durante las 240 horas del cultivo. Ambos residuos lignocelulósicos mostraron un efecto regulador en cuanto a la expresión de los genes de la lacasa. Los mayor sobreexpresión se detectó en salvado de trigo a las 240, 96 y 48 h con un incremento de 12.8, 10.49 y 5.81 veces respectivamente, con respecto al medio mínimo, mientras que a las 144 h el efecto fue negativo obteniéndose valores inferiores al medio mínimo.

En el tratamiento con toronja el máximo valor de expresión se alcanza a las 144h con un incremento de 6.7 veces con respecto al medio mínimo siendo muy inferior a los obtenidos con salvado de trigo. Se puede apreciar que a partir de las 144h el medio enriquecido con toronja tiene un efecto negativo en los niveles de expresión del gen de la lacasa para esta cepa.

El mapa de calor (figura 8.5 B) muestra los patrones de expresión de lacasas en los cultivos donde se observa que el mejor tratamiento para la inducción del gen de la lacasa es el salvado de trigo, únicamente a las 144 h se observó un efecto negativo en la regulación de la expresión génica. Mientras que para el tratamiento con toronja solo se alcanzó un efecto considerable de sobre expresión a las 144 h de cultivo.

Estos cambios en los niveles transcripcionales pueden estar asociadas a la biotransformación de los residuos lignocelulósicos durante el cultivo en medio líquido. Se ha evidenciado que los compuestos aromáticos relacionados a la lignina poseen la capacidad de inducir diferencialmente los genes lacasas y que estas diferencias se deben a la estructura química de los fenoles. En *Trametes* sp. I-62 el guayacol y ácido p-cumárico inducen la transcripción de los genes *lcc1* y *lcc2*, el ácido ferúlico induce la transcripción de *lcc1*, *lcc2* y *lcc3* mientras que el ácido 3,5-dihidroxibenzóico parece tener poco o ningún efecto en la cepa (Terrón *et al.*, 2004). En *Trametes velutina* 5930 el guayacol mostró los niveles de transcripción mas bajos del gen *lac5930-1* seguido del ácido gálico y ácido tánico (2.2, 3.1 y 3.5 veces, respectivamente). El ácido siríngico y ácido cinámico

mostraron los mayores niveles de transcripción para esta cepa con 7.2 y 6.3 veces, respectivamente (Yang *et al.*, 2013).

Las diferencias en las respuestas transcripcionales en los diferentes residuos lignocelulósicos muestran un mecanismo complejo de regulación que podría estar relacionado a la sensibilidad de los genes de lacasa a los diversos compuestos fenólicos liberados en los medios de cultivo. Esta sensibilidad puede deberse a la presencia en el promotor de motivos que son sensibles a los componentes del salvado de trigo y toronja, tales como XRE (elementos de Respuesta a Xenobioticos) (Galhaup *et al.*, 2002a; Xiao *et al.*, 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos el mayor efecto inductor medido por la expresión relativa del gen lacasa de *Trametes hirsuta* Bm-2 ocurre en el salvado de trigo.

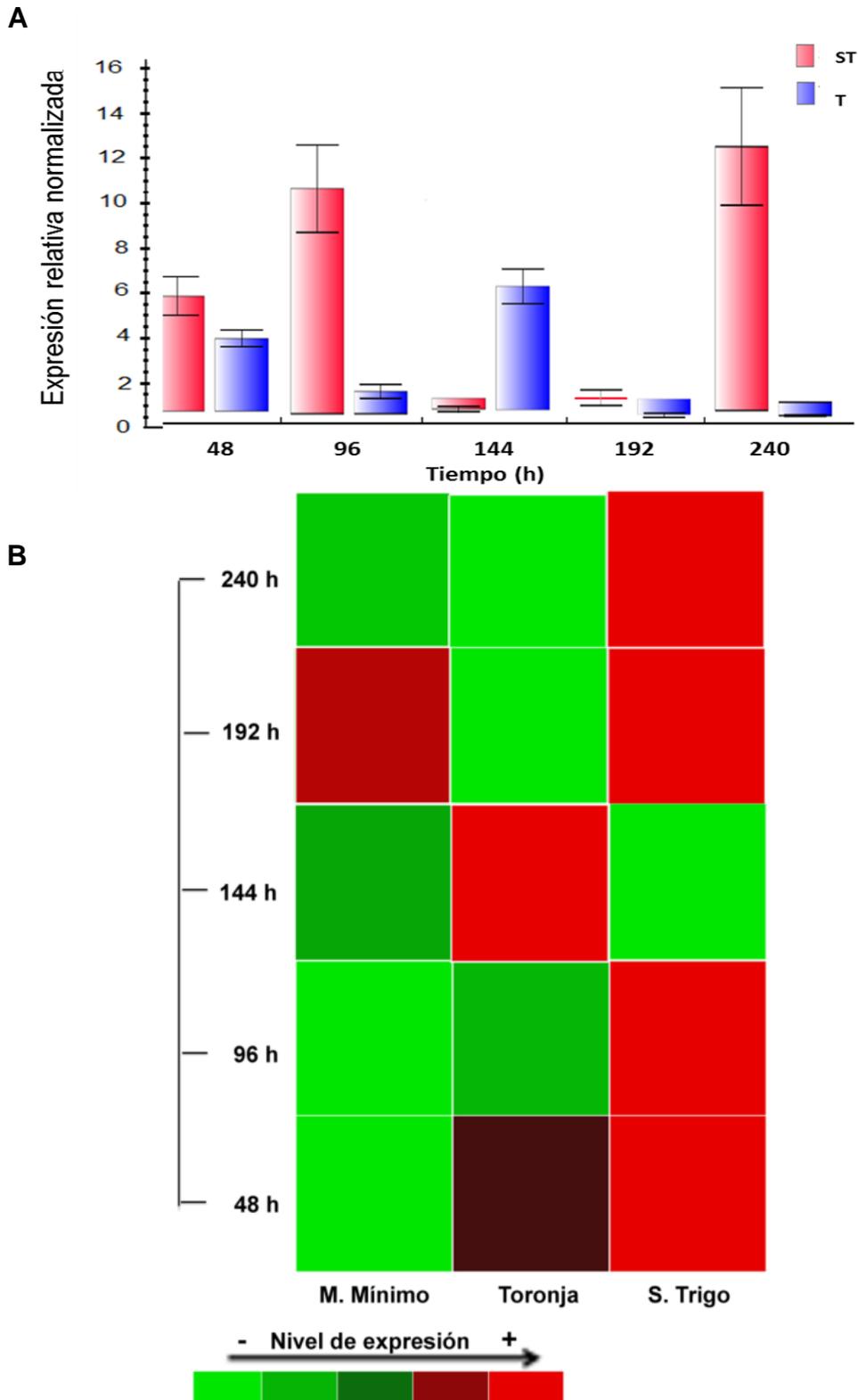


Figura 8.5 A) Expresión relativa del gen *lcc* de *Trametes hirsuta* Bm-2 comparada con la expresión del cultivo sin inducción de acuerdo al método  $\Delta\Delta CT$ . Las barras representan el error estándar (ST= Salvado de trigo; T= Toronja). B) Mapa de calor de expresión relativa.

#### 8.4 Análisis de los niveles de expresión y actividad enzimática

El análisis entre la actividad de lacasa y los niveles de expresión del gen lacasa (*lcc*) mostraron diferencias en base al residuo lignocelulósico utilizado y el tiempo de fermentación.

En la figura 8.6 A se observa que en el cultivo inducido con residuos de toronja a las 48 horas hubo un incremento en los niveles de expresión, mientras que la actividad enzimática fue prácticamente nula. A diferencia, a las 96 h se alcanzó la máxima actividad enzimática y los niveles de expresión decrecieron y posteriormente, a las 144 alcanzaron su máximo nivel. Estas variaciones hacia arriba y hacia abajo muestran que en este sustrato no hubo correlación directa entre la expresión del gen y la actividad de lacasas extracelulares.

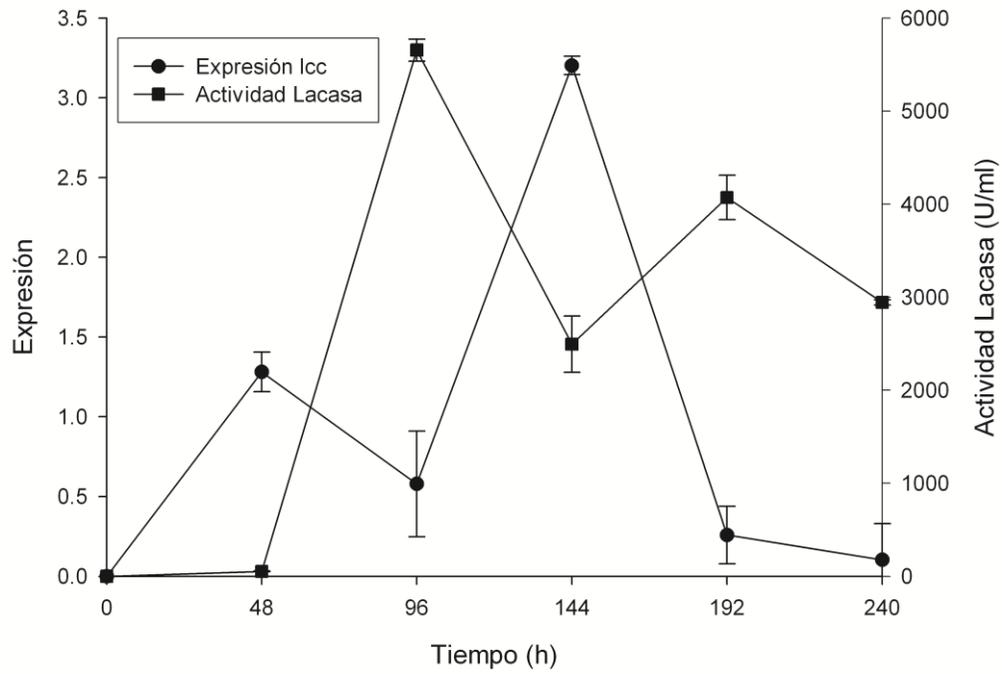
Durante el tratamiento con salvado de trigo se identificó durante 96 h una correlación directa entre el aumento en los niveles de transcritos y la actividad enzimática (figura 8.6 B). A partir de las 144 h se observó que los transcritos disminuyeron pero la actividad de lacasa se mantuvo constante. Este comportamiento es similar al observado por Yang *et al.* (2013) quienes sugirieron que durante la biodegradación del salvado de trigo los compuestos aromáticos que se liberan podrían inhibir la actividad proteolítica extracelular favoreciendo la estabilidad de la enzima lacasa.

Como se mencionó anteriormente la expresión de genes lacasas en residuos agroindustriales ha sido escasamente estudiada probablemente debido a la complejidad de estos compuestos. La heterogeneidad del sustrato, aunado a la dinámica del cultivo en donde ocurren cambios que afectan la síntesis de isoenzimas lacasas hace difícil el análisis de los resultados. Los resultados de este trabajo coinciden con los reportados por Park, *et al.*, 2014, quienes identificaron diferencias en los niveles de expresión y la actividad de lacasas durante el cultivo en cáscaras de manzana que fue atribuido al estrés oxidativo provocado por una alta concentración del residuo de toronja que retrasa el proceso de transcripción

(Park *et al.*, 2014) o debido a una regulación postranscripcional. Estas diferencias también han sido reportadas en medios simples suplementados con fenoles. Terrón *et al.*, (2004) observaron que el incremento de actividad de lacasa en *Trametes* sp I-62 y el nivel total de transcritos en cultivos inducidos con guayacol fue directamente proporcional a la actividad, mientras que en los cultivos inducidos con ácido ferúlico y ácido p-coumárico no se observó una relación directa entre los niveles transcripcionales y actividad enzimática. Xiao *et al.*, 2006 reportaron que la acumulación de transcritos estuvo acompañada por el incremento en la actividad enzimática detectada en los cultivos de *Trametes* sp.

Para esclarecer las diferencias en la actividad y la expresión relativa del gen lacasa se requiere realizar más estudios. Los resultados obtenidos sugieren que durante el curso del cultivo se producen diferentes isoenzimas que difieren en su afinidad por el sustrato ABTS, lo que se refleja en variaciones los niveles de la actividad de lacasas. Otra variable que podría estar asociada a las variaciones encontradas es el recambio de proteínas (síntesis y degradación) Price y Stevens (1989) mencionaron que el tiempo de recambio de una enzima puede variar en un organismo y ser modificado por la velocidad de síntesis y degradación. El recambio también se ve favorecido cuando la fuente de nutrimentos empieza a ser limitante En los últimos años se han determinado variaciones en la composición de fenoles presentes en los extractos enzimáticos a diferentes tiempos de cultivo, por lo que éstos pueden diferir en su acción como mediadores redox (Camarero *et al.*, 2005). Este hecho puede favorecer o no la oxidación del ABTS por las lacasas.

A)



B)

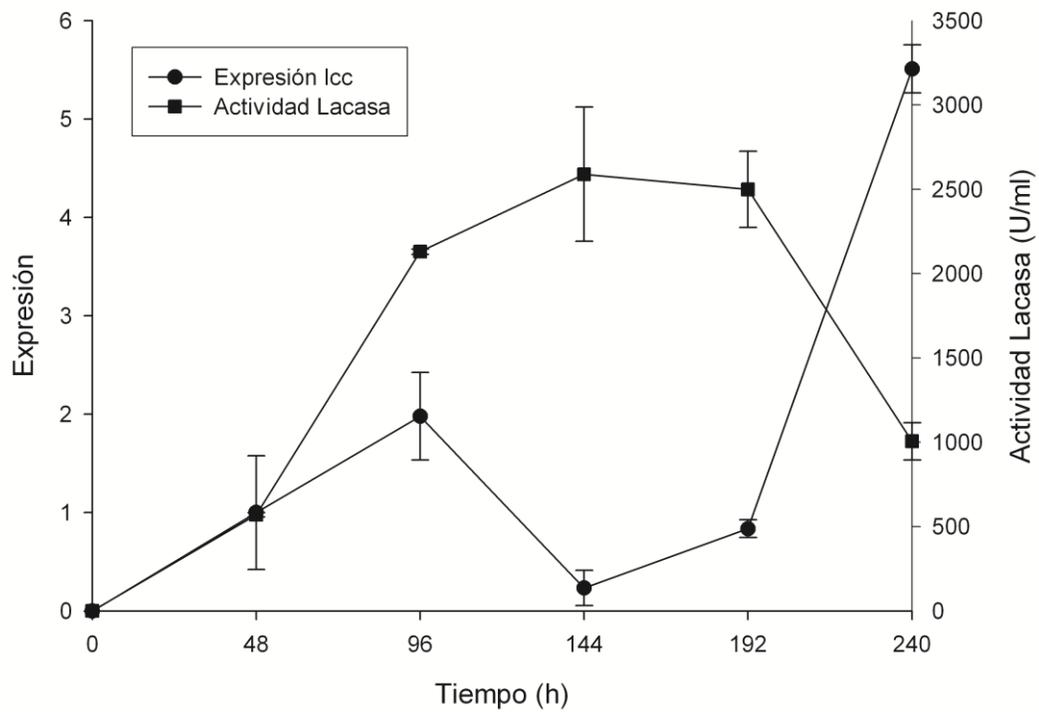


Figura 8.6 Producción de lacasa y expresión del gen *lcc* en residuos de toronja (A) y salvado de trigo (B).

## 9. CONCLUSIONES

- La adición de sustratos lignocelulósicos al medio de cultivo de *Trametes hirsuta* Bm-2, estimulan la actividad de lacasas y la magnitud de este efecto depende del tipo de sustrato y tiempo de cultivo.
- Las cáscaras de toronja y naranja y fueron los mejores sustratos para la producción de lacasas, cuya actividad máxima fue 81 y 58 veces mayor que el control.
- La cáscara de toronja y salvado de trigo tienen un claro efecto en la inducción transcripcional del gen de las lacasas.
- Los niveles de expresión se incrementan durante los cultivos de *Trametes hirsuta* Bm-2 con cáscara de toronja y particularmente con salvado de trigo.
- Los patrones de actividad enzimática de lacasas y los perfiles de transcripción relativa difirieron marcadamente durante el curso del cultivo.
- El gen de la  $\beta$ -actina no es un buen control interno para medir la expresión en cultivos suplementados con cáscaras de naranja, mandarina y plátano.

## 10. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Es importante **investigar la expresión** espacio-temporal de las isoenzimas lacasas ya que este conocimiento puede ser útil para el entendimiento de los papeles fisiológicos de las lacasas producidas por *Trametes hirsuta* Bm-2. También será importante aclarar las diferencias entre los niveles de expresión y actividad de lacasas. A este respecto, la obtención de anticuerpos específicos de lacasas permitiría establecer los niveles reales de actividad de lacasas producidos por el hongo. Asimismo, será importante la identificación de la función de los fenoles liberados durante el cultivo en su acción como mediadores de la actividad de lacasas.

Se requiere de una selección cuidadosa y validación del gen de referencia que se procese paralelamente con el gen blanco. Se recomienda probar otros genes de diferentes clases funcionales para encontrar el más adecuado en base a su estabilidad de expresión en *Trametes hirsuta* Bm-2. También es necesario determinar el número óptimo de genes de referencia para la normalización.

---

## 11. REFERENCIAS

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A. y Gübitz, G. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3357-3362.
- Adebayo, G. B., Otunola, G. A. y Ajao, T. A. (2010). Assessment and biological treatment of effluent from textile industry. *African Journal of Biotechnology*, 9(49): 8365–8368.
- Álvarez, J. M., Canessa, P., Mancilla, R. A., Polanco, R., Santibáñez, P. A. y Vicuña, R. (2009). Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispota* is mediated by an ACE1-like copper-fist transcription factor. *Fungal Genetics and Biology*, 46: 104–111.
- Arora, D. S. y Rampal, P. (2002). Laccase production by some *Phlebia* species. *Journal of Basic Microbiology*, 42(5): 295–301.
- Ashger, M., Bhatti, H. N., Ashraf, M. y Legge, R. L. (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, 19: 771–783.
- Bakkiyaraj, S., Aravindan, R., Arrivukkarasan, S. y Viruthagiri, T. (2013). Enhanced laccase production by *Trametes hirsuta* using wheat bran under submerged fermentation. *International Journal of ChemTech Research*, 5(3): 1224–1238.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2): 215–242.
- Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D. y Marchant, R. (1996). Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: A review. *Bioresource Technology*, 58: 217-227.
- Baughman, G. L. y Perenich, T. A. (1988). Fate of dyes in aquatic systems: I solubility and partitioning of some hydrophobic dyes and related compounds. *Environmental Toxicology Chemistry*, 7: 183-199.
- Bertrand, B., Martínez-Morales F. y Trejo-Hernández. (2013). Fungal Laccases: induction and production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12(3): 473-488.
- Birhanli, E. y Yeşilada, Ö. (2013). The utilization of lignocellulosic wastes for laccase production under semisolid-state and submerged fermentation conditions. *Turkish Journal of Biology*, 37: 450–456.
- Blánquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, M., Sarrá, M., Caminal, G. y Vincent, T. (2004). Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*, 38: 2166–2172.

- Bollag, J. M. y Leonowicz, A. (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 849–854.
- Bollag, J. M., Chu, H. L., Rao, M. A. y Gianfreda, L. (2003). Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. *Journal of Environmental Quality*, 32; 63-69.
- Bourbonnais, R., Paice, M., Reid, I., Lanthier, P. y Yaguchi, M. (1995). Lignin oxidation by laccase isoenzymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1876–1880.
- Burgos-Jiménez, M. N. (2010). *Regulación de la expresión de lacasas por metales y fenoles simples en Trametes hirsuta Bm-2*. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Mérida.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169–193.
- Cabrita, J. F., Abrantes, L. M. y Viana, A. S.(2005). N-Hydroxysuccinimide-terminated self-assembled monolayers on gold for biomolecules immobilisation. *Electrochimica Acta*, 50: 2117-2124.
- Calabrese, B. S., Pickard, M., Vázquez-Duhalt, R. y Heller, A. (2002). Electroreduction of O<sub>2</sub> to water at 0.6 V (NHE) at pH 7 on the “wired” *Pleurotus ostreatus* Laccase Cathode. *Biosensors Bioelectronics*, 17: 1071-1074.
- Call, H. P. y Mücke, I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems. (Ligno-zymR process). *Journal of Biotechnology*, 53: 163-202.
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Río, J. C., Gutierrez, A., Gras, J. M., Monje, R., Martínez, M. J. y Martínez, Á. T. (2004). Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 113-120.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez M. J. y Martínez, A. (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators fro decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4): 1775-1784.
- Cambria, M. T., Ragusa, S., Calabrese, V. y Cambria, A. (2011). Enhanced laccase production in white-rot fungus *Rigidoporus lignosus* by the addition of selected phenolic and aromatic compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163: 415–422.
- Cambria, M., Cambria, A., Ragusa, S. y Rizzarelli, E. (2000). Production, purification and properties of an extracellular lacasse from *Rigidoporus lignosus*. *Protein Expression and Purification*, 18: 141–147.

- Carbone, I. y Kohn, L. (1999). A method for designing primers sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3): 553–556.
- Castillo-Zapata, P. Y. (2012). *Lacasas de Trametes hirsuta Bm-2: Purificación, caracterización y aplicación en la remoción de tintes*. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Mérida.
- Cavallazzi, J. R. P., Kasuya, C. M. y Soares, M. A. (2005). Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 383–387.
- Chandra, R. P. y Ragauskas, A. J. (2002). Evaluating laccase- facilitated coupling of phenolics acids to high-yield kraft pulps. *Enzyme and Microbial Biotechnology*, 30: 855-861.
- Chen, S., Ge, W. y Buswell, J. A. (2004). Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS Microbiology Letters*, 30: 171-176.
- Chen, T., Barton, S. C., Binyamin, G., Gao, Z., Zhang, Y., Kim, H. H. y Heller, A. (2001). A miniature biofuel cell. *Journal of the American Chemical Society*, 123: 8630-8631.
- Cho, S-J., Park, S. J., Lim, J. S., Rhee, Y. H. y Shin, K. S. (2002). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase of *Coriolus hirsutus*. *Biotechnology Letters*, 24: 1337-1340.
- Ćilerdžić, J., Stajić, M., Vukojević, J., Duletić-Laušević, S. y Knežević, A. (2011). Potential of *Trametes hirsuta* to produce ligninolytic enzymes during degradation of agricultural residues. *BioResource*, 6(3): 2885–2895.
- Collins, P. J. y Dobson, A. D. W. (1995). Extracellular lignin and manganese peroxidase production by the white-rot fungus *Coriolus versicolor* 290. *Biotechnology Letters*, 17: 989–992.
- Collins, P. J. y Dobson, A. D. W. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9): 3444–3450.
- Cooper, P. (1995). Removing colour from dye house wastewater. *Asian Textile Journal*, 3: 52-56.
- Cordoba-Cañero, D. y Roncero, M. I. G. (2008). Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 98(5): 509–518.
- Crowe, J. D. y Olsson, S. (2001). Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5): 2088–2094.

- Cullen, D. (1997). Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology*, 53: 273–289.
- D'Souza, T. M., Merritt, C. S. y Reddy, C. A. (1999). Lignin modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12): 5307-5313.
- D'Souza, T., Boominathan, K. y Reddy, C. (1996). Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10): 3739–3744.
- De la Rubia, T., Ruiz, E., Pérez, J. y Martínez, J. (2002). Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavidio-alba* induced by vanillin. *Archives of Microbiology*, 179: 70-73.
- Dekker, R. F., Barbosa, A. M., Giese, E. C., Godoy, S. D. y Covizzi, L. G. (2007). Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Microbiology*, 10: 177-185.
- Díaz, R., Alonso, S., Sánchez, C., Tomasini, A., Bibbins-Martínez, M. y Díaz-Godínez, G. (2011). Characterization of growth and laccases activity of several strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *BioResources*, 6: 282-290.
- Díaz, R., Saparrat, M. C. N., Jurado, M., García-Romera, I., Ocampo, J. A. y Martínez, M. J. (2010). Biochemical and molecular characterization of *Corioloropsis rigida* laccases involved in transformation of the solid waste from olive oil production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(1): 133–142.
- Dong, J. L., Zhang, Y. W., Zhang, R. H., Huang, W. Z. y Zhang, Y. Z. (2005). Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. *Journal of Basic Microbiology*, 45(3): 190–198.
- Durán, N. y Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28: 83-99.
- Edwards, K. J. (2004). Real-Time PCR; An Essential Guide.
- Eggert, C., Temp, U., y Eriksson, K. E. L. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1151-1158.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Khardziani, T. y Agathos, S. N. (2010). Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(10), 1091–1096.
- El-Shora, H. M., Youssef, M. M. y Khalaf, S. A. (2008). Inducers and inhibitors of laccase from *Penicillium*. *Biotechnology*, 7 (1), 35-42.

- Escobar-Blanco, M. (2010). *Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional.
- Fan, F., Zhuo, R., Sun, S., Wan, X., Jiang, M., Zhang, X. y Yang, Y. (2010). Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 which had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes. *Bioresource Technology*, 102: 3126–3137.
- Faraco, V., Giardina, P. y Sannia, G. (2003). Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology*, 149: 2155–2162.
- Farnet, A. M., Criquet, S., Tagger, S., Gil, G. y Le Petit, J. (2000). Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 189–194.
- Ferry, Y. y Leech, D. (2005). Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode. *Electroanalysis*, 17: 113-119.
- Galhaup, C. y Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 225–232.
- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J. y Haltrich, D. (2002a). Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, 148: 2159–2169.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B. y Haltrich, D. (2002b). Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 529–536.
- Giardina, P., Autore, F., Faraco, V., Festa, G., Palmieri, G., Piscitelli, A. y Sannia, G. (2007). Structural characterization of heterodimeric laccases from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75: 1293–1300.
- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G. y Sannia, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*, 341: 655–663.
- Gómez, J., Pasos, M., Rodríguez-Couto, S. y San Roman, M. A. (2005). Chestnut Shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid state conditions. *Journal of Food Engineering*, 68: 315-319.
- González, J. C., Medina, S. C., Rodríguez, A., Osma, J. F., Alméciga-Díaz, C. J. y Sánchez, O. F. (2013). Production of *Trametes pubescens* laccase under submerged and semi-solid culture conditions on agro-industrial wastes. *PloS One*, 8(9): e73721.

- González, T., Terrón, M. C., Zapico, E. J., Téllez, A., Yagüe, S., Carbajo, J. M. y Yagu, S. (2003). Use of multiplex Reverse Transcription-PCR to study the expression of a laccase gene family in a basidiomycetous fungus.
- Graminha E. B. N., Goncalves, A., Pirota, R., Basalobre M, Da Silva, R., Gomes, E. (2008). Enzyme production by solid state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science Technology*, 144(1-2): 1-22.
- Guillén, F., Muñoz, C., Gómez-Toribio, V., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (2000). Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1): 170–175.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. y Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986–994.
- Hernandez, A., Martin Vasallo, P., Torres Ramirez, A. y Salido, E. (1994). RNA analysis: The study of genic expression. *Nefrología*, 14: 145–162.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *BioTechnology*, 11: 1026–1030.
- Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C. y Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*, 39: 1415-1419.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. y Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6: 279–284.
- Iandolo, D., Piscitelli, A., Sannia, G. y Faraco, V. (2011). Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163: 40–51.
- Juang, R. S., Tseng, R. L., Wu, F. C. y Lin, S. J. (1996). Use of chitin and chitosan in lobster shell wastes for colour removal from aqueous solutions. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Environmental Engineering*, 31: 325-338.
- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, Á., Martínez, Á. T. y Martínez, M. J. (2009). Laccase detoxification of steam exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresource Technology*, 100: 6378–6384.
- Kilaru, S., Hoegger, P. J., Majcherczyk, A., Burns, C., Shishido, K., Bailey, A. y Kües, U. (2006). Expression of laccase gene *lcc1* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 200–210.
- Klonowska, A., Gaudin, C., Asso, M., Fournel, A., Reglier, M. y Tron, T. (2005). LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 34–41.

- Klonowska, A., Gaudin, C., Fournel, A., Asso, M., LePetit, J., Giorgi, M. y Tron, T. (2002). Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. *European Journal of Biochemistry*, 269: 6119–6125.
- Ko, E. M., Leem, Y. E. y Choi, H. T. (2001). Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2): 98–102.
- Kuhad, R. C., Singh, A., Eriksson, K. E. L. 1997. Microorganisms and enzymes involved in the biodegradation of plant fiber cell wall. In: Eriksson K. E. L. (Ed.), *Biotechnology in the pulp and paper industry. Advances in biochemical engineering biotechnology*. Berlin: Springer Verlag
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros A. y Alcalde, M. (2008). Laccases and their applications: A patent review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2: 10-24.
- Kurisawa, M., Chung, J. E., Uyama, H. y Kobayashi, S. (2003). Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules*, 4: 1394-1399.
- Le Bris, C., Lepretre, M., Paillard, C. y Guérard, F. (2014). Characterization of a laccase-like activity in the hemolymph of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Aquaculture*, 424-425: 194–200.
- Le Bris, C., Paillard, C., Stiger-Pouvreau, V. y Guérard, F. (2013). Immunology Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: Characterization and kinetic properties. *Fish & Shellfish Immunology*, 35: 1804–1812.

- Luna-acosta, A., Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P. y Thomas-Guyon, H. (2010). First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28: 719–726.
- Lund, M., y Ragauskas, A. J. (2001). Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 699-703.
- Madhavi, V. y Lele, S. S. (2009). Laccase: properties and applications. *BioResources*, 4(4): 1694–1717.
- Mager, W. H. y De Kruijff, A. J. (1995). Stress-induced transcriptional activation. *Microbiological Reviews*, 59(3): 506–531.
- Mai, C., Majcherczyk, A. y Hüterman, A. (2000). Chemo-enzymatic synthesis and characterization of graft copolymers from lignin and acrylic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 167-175.
- Mansur, M., Suárez, T. y González, A. E. (1998). Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2): 771–774.
- Manubens, A., Canessa, P., Folch, C., Ávila, M., Salas, L. y Vicuña, R. (2007). Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *FEMS Microbiology Letters*, 275: 139–145.
- Marques de Souza, C. G., Kirst-Tychanowicz, G., Farani de Souza, D. y Peralta, R. M. (2004). Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology*, 2: 129–136.
- Marques de Souza, C. G., Tychanowicz, G. K., de Souza, D. F. y Peralta, R. M. (2004). Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology*, 44(2): 129–136.
- Martin, C., Pecyna, M., Kellner, H., Jehmlich, N., Junghanns, C., Benndorf, D. y Schlosser, D. (2007). Purification and biochemical characterization of a laccase from the aquatic fungus *Myrioconium* sp. UHH 1-13-18-4 and molecular analysis of the laccase-encoding gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77: 613–624.
- Martins, S., Aguilar, C. N., de la Garza-Rodríguez, I. Mussatto, S. I. y Teixeira, J. A. (2010). Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from *Larrea tridentata* by microwave-assisted extraction. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85: 1142–1147.
- Martins, S., Mussatto, Solange, I., Martínez-Ávila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N. y Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation . A review. *Biotechnology Advances*, 29: 365–373.

- Maulin, P. S., Reddy, G., Banerjee, R., Ravindra Babu, P. y Kothari, I. (2004). Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta* spp. MPS-001 and *Aspergillus* spp. MPS-002). *Process Biochemistry*, 40 (1): 445-451.
- Mayer, A. M. y Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60: 551–565.
- McKay, G. (1979). Waste colour removal from textile effluents. *American Dyest Report*, 68: 29-36.
- McPherson, M. J., Hames, B. D. y Taylor, G. R. (2008). PCR: A practical approach.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M. y Duran, N. (2007). Laccase induction in fungi and laccase/ N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresource Technology*, 98: 158–164.
- Mishra, G. y Tripathy, M. (1993). A critical review of the treatments for decolourization of textile effluent. *Colourage*, 40: 35-38.
- Missall, T. A., Moran, J. M., Corbett, J. A. y Lodge, J. K. (2005). Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsa1. *Eukaryotic Cell*, 4(1): 202–208.
- Moldes, D., Gallego, P., Rodríguez Couto, S. y Sanromán, A. (2003). Grape seeds: the best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters*, 25: 491-495.
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V. y Yaropolov, A. I. (2007). “Blue” laccases. *Biochemistry*, 72(10): 1136–1150.
- Mouso, N., Papunutti, L. y Forchiassin, F. (2003). Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum*. *Micología*, 20: 176–178.
- Mustafa, R., Muniglia, L., Rovet, B. y Girardin, M. (2005). Phenolics colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Research International*, 38: 995-1000.
- Neifar, M., Kamoun, A., Jaouani, A., Ellouze-Ghorbel, R. y Ellouze-Chaabouni, S. (2011). Application of asymmetrical and Hoke designs for optimization of laccase production by the white rot fungus *Fomes fomentarius* in solid-state fermentation. *Enzyme Research*,
- Nicotra, S., Cramarossa, M. R., Mucci, A., Pagnoni, U. M., Riva, S. y Forti, L. (2004). Biotransformation of resveratrol: synthesis of *trans*-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes*

---

*pubescens*. *Tetrahedron*, 60: 595-600.

Nityanand, C. y Desai, S. S. (2006). Microbial laccases and their applications. A Review. *Asian Journal of Biotechnology*, 3: 98-124.

Nyanhongo, G. S., Gomes, J., Gübitz, G., Zvauya, R., Read, J. S. y Steiner, W. (2002). Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Technology*, 84: 259-263.

Osma, J. F., Saravia, V., Toca Herrera, J. L. y Rodríguez Couto, S. (2007). Mandarin peelings: The best carbon source to produce laccase by static cultures of *Trametes pubescens*. *Chemosphere*, 67: 1677–1680.

Osma, J. F., Toca Herrera, J. L. y Rodríguez Couto, S. (2007). Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. *Dyes and Pigments*, 75: 32-37.

Otterbein, L., Record, E., Longhi, S., Asther, M. y Moukha, S. (2000). Molecular cloning of the cADN encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *European Journal of Biochemistry*, 267: 1619–1625.

Palmieri, G., Bianco, C., Cennamo, G., Giardina, P., Marino, G., Monti, M. y Sannia, G. (2001). Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2754–2759.

Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G. y Giardina, P. (2003). Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 220–230.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. y Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3): 920–924.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. y Sannia, G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50): 31301–31307.

Palmieri, G., Giardina, P., Marzullo, I., Desiderio, B., Nitti, G., Cannio, R. y Sannia, G. (1993). Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 632-636.

Park, Y., Yoon, D., Kim, H., Kwon, O., Yoo, Y., Kong, W. y Lee, C.-S. (2014). Overproduction of Laccase by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* using apple pomace as inducer. *Mycobiology*, 42(2): 193–197.

Pezzella, C., Lettera, V., Piscitelli, A., Giardina, P. y Sannia, G. (2013). Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2): 705–717.

- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29.
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In S. A. Bustin (Ed.), *A-Z of quantitative PCR* (pp. 87–112). La Jolla, CA, USA: International University Line (IUL).
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G. y Faraco, V. (2011). Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics*, 12: 104–112.
- Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 20-33.
- Ponitek, K., Antorini, M. y Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 37663-37669.
- Poots, V. J. P., McKay, G. y Healy, J. J. (1976). The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents-I Peat. *Water Research*, 10: 1061-1066.
- Price, N. C. y Stevens, L. (1989) Enzymes in the cell. In: *Fundamentals of Enzymology*. Oxford University press; New York.
- Qin, L.-X., Beyer, R. P., Hudson, F. N., Linford, N. J., Morris, D. E. y Kerr, K. F. (2006). Evaluation of methods for oligonucleotide array data via quantitative real-time PCR. *BMC Bioinformatics*, 17: 7- 23.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. y Wittwer, C. T. (1997a). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245: 154–160.
- Risdianto, H., Setiadi, T. y Kokugan, T. (2010). The influence of temperature on laccase production in solid state fermentation by using the white rot fungus *Marasmius* sp. *The 1<sup>st</sup> International Seminar on Fundamental and Application of Chemical Engineering*
- Riu, J., Schönsee, I. y Barcelo, D. (1998). Determination of sulfonated azo dyes in groundwater and industrial effluents by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 33: 653-663.
- Rodríguez Couto, S., Rodríguez, A., Paterson, R., Lima, N. y Teixeira, J. (2006). High laccase activity in a 6 l airlift bioreactor by free cells of *Trametes hirsuta*. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 612–616.
- Rodríguez Couto, S., y Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5): 500–513.

- Rodríguez-Couto, S. R. y Toca-Herrera, J. L. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 25(6): 558–569.
- Rodríguez-Couto, S. y Sanromán, M. A. (2005). Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions. Application to Lissamine Green B decolourization. *Journal of Food Engineering*, 71: 208-213.
- Rodríguez-Couto, S., Hofer, D., Sanromán, M. A. y Gübitz, G. M. (2004a). Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor. Application to decolourisation of dyes from a leather factory. *Engineering in Life Sciences*, 4: 233-238.
- Rodríguez-Couto, S., Sanromán, M. A. y Gübitz, G. M. (2005). Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere*, 58: 417-422
- Roy, J. J., Abraham, T. E., Abhijith, K. S., Sujith Kumar, P. V. y Thakur, M. S. (2005). Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 206-211.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (vol. 3.). Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saparrat, M. C. N., Guillén, F., Arambarri, A. M., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (2002). Induction, isolation and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Corioloropsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1534–1540.
- Saparrat, M., Balatti, P. A., Martínez, M. J. y Jurado, M. (2010). Differential regulation of laccase gene expression in *Corioloropsis rigida* LPSC No. 232. *Fungal Biology*, 114: 999-1006.
- Scheel, T., Höfer, M., Ludwig, S. y Hölker, U. (2000). Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 686–691.
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A., Autio, K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 43: 152-159.
- Setti, L., Giuliani, S., Spinozzi, G. y Pifferi, P. G. (1999). Laccase catalyzed-oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 285-289.
- Soden, D. M. y Dobson, A. D. W. (2001). Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*, 147: 1755–1763.

- Soden, D. M. y Dobson, A. D. W. (2003). The use of amplified flanking region-PCR in the isolation of laccase promoter sequences from the edible fungus *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3): 553–562.
- Solé, M., Müller, I., Pecyna, M. J., Fetzer, I., Harms, H. y Schlosser, D. (2012). Differential regulation by organic compounds and heavy metals of multiple laccase genes in the aquatic hyphomycete *Clavariopsis aquatica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13): 4732–4739.
- Srinivasan, C., D'Souza, T., Boominathan, K. y Reddy, C. (1995). Demonstration of laccase in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4274–4277.
- Stephen, J. A. Electrooxidation of dyestuffs in waste waters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 62: 111-117.
- Susslov, O. y Steindelr, D. A. (2005). PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acid Research*, 33: e181.
- Tapia Tussell, R. (2011). *Caracterización molecular del gen de la lacasa en un hongo lininolítico con potencial biotecnológico*. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Mérida.
- Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Rojas-Herrera, R., Cortes-Velazquez, A., Rivera-Muñoz, G. y Solís-Pereira, S. (2011). New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. *African Journal of Biotechnology*, 10(50): 10134–10142.
- Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Torres-Calzada, C., Cortés-Velázquez, A., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacís, R. y Solís-Pereira, S. (2015). Laccase gene expression and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* Bm-2. *Molecules*, 20: 15147–15157.
- Terrón, M. C., González, T., Carbajo, J. M., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A. y González, A. E. (2004). 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: FG & B*, 41: 954–962.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140: 19-26.
- Tinoco, R., Pickard, M. y Vázquez-Duhalt, R. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 32: 331–335.
- Tišma, M., Znidaršič-Plazl, P., Vasić-Rački, D. y Zelić, B. (2012). Optimization of laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166: 36–46.

- Torres-Duarte, C., Bernal, B., Román, R. y Vázquez-Duhalt, R. (2003). Degradación de plaguicidas por el sistema lacasa-mediador de *Corioloopsis gallica*.
- Uyama, H. y Kobayashi, S. (2002). Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20: 117127.
- Vaher, M., Matso, K., Levandi, T., Helmja, K. y Kaljurand, M. (2010). Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. *Procedia Chemistry*, 2: 76–82.
- Valderrama, B., Oliver, P., Medrano-Soto, A. y Vazquez-Duhalt, R. (2003). Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84: 289–299.
- Vandesompele, J., Kubista, M. y Pfaffl, M. W. (2009). Reference gene validation software for improved normalization. In J. Logan, K. Edwards, & N. Saunders (Eds.), *Real-Time PCR: Current Technology and Applications* (pp. 47–64). London: Caister Academic Press.
- Vanhulle, S., Enaud, E., Trovaslet, M., Nouaimeh, N., Bols, C. M., Keshavarz, T., Tron, T., Sannia, G. y Corbisier, A. M. (2007). Overlap of laccase/cellobiose dehydrogenase activities during the decolourisation of anthraquinonic dyes with close chemical structures by *Pycnoporus* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1723-1731.
- Viswanath, B., Chandra, M. S., Kumar, K. P., Pallavi, H. y Reddy, B. R. (2008). Fungal laccases and their biotechnological applications with special reference to bioremediation. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 2(1): 1–13.
- Wahleithner, J. A., Xu, F., Brown, K. M., Brown, S. H., Golightly, E. J., Halkier, T. y Schneider, P. (1996). The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 29: 395–403.
- Wang, A. M., Doyle, M. V. y Mark, D. F. (1989). Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 9717–9721.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. y Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22: 161-187.
- Wolfenden, B. S. y Willson, R. L. (1982). Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 7: 805–812.
- Xiao, Y. Z., Chen, Q., Hang, J., Shi, Y. Y., Wu, J., Hong, Y. Z. y Wang, Y. P. (2004). Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia*, 96(1): 26–35.

- Xiao, Y. Z., Hong, Y. Z., Li, J. F., Hang, J., Tong, P. G., Fang, W. y Zhou, C. Z. (2006). Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 493–501.
- Xiao, Y. Z., Tu, X. M., Wang, J., Zhang, M., Cheng, Q., Zeng, W. Y. y Shi, Y. Y. (2003). Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. Strain AH28-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 700-707.
- Xu, F. (1999). Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production, and applications. In M. C. Flickinger & S. W. Drew (Eds.), *Encyclopedia of Bioprocessing Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. (pp. 1545–1554). New York, USA: John Wiley and Sons.
- Xu, F. (2005). Applications of oxidoreductases: recent progress. *Industrial Biotechnology*, 1: 38-50.
- Yang, Y., Wei, F., Zhuo, R., Fan, F., Liu, H., Zhang, C. y Zhang, X. (2013). Enhancing the laccase production and laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological applications by different metal ions and aromatic compounds. *PLoS One*, 8(11): e79307.
- Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, K. M., Brown, S. H., Rey, M. W. y Dalboge, H. (1996). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3): 834–841.
- Zapata-Castillo, P., Villalonga-Santana, M. de L., Tamayo-Cortés, J., Rivera-Muñoz, G. y Solís-Pereira, S. (2012). Purification and characterization of laccase from *Trametes hirsuta* Bm-2 and its contribution to dye and effluent decolorization. *African Journal of Biotechnology*, 11(15): 3603–3611.
- Zapata-Castillo, P., Villalonga-Santana, M., Islas-Flores, I., Rivera-Muñoz, G., Ancona-Escalante, W. y Solís-Pereira, S. (2015). Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolourization of indigo carmine. *Letters in Applied Microbiology*, 61: 252-258.

