



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA.

## IDENTIFICACIÓN DE UNA LACASA DE *Pleurotus ostreatus* PREDOMINANTE EN CONDICIONES DE FERMENTACIÓN LÍQUIDA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN QUE LA CODIFICA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M.C. Maura Téllez Téllez

Director de Tesis: Dr. Francisco Fernández Perrino  
Dr. Gerardo Díaz Godínez

Asesor: Dra. Alba Mónica Montiel González

Enero 2011

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

Maura Téllez Téllez recibió una beca para estudios de Doctorado por CONACYT con el No. de registro 177867.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios, del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa y en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

México D.F. a 14 de Enero del 2011.

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Tesis

Identificación de una lacasa de *Pleurotus ostreatus* predominante en condiciones de  
fermentación líquida y caracterización molecular del gen que la codifica.

Que presentó

Maura Téllez Téllez

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Fernández Perrino  
Dr. Gerardo Díaz Godínez  
Asesor: Dra. Alba Mónica Montiel González

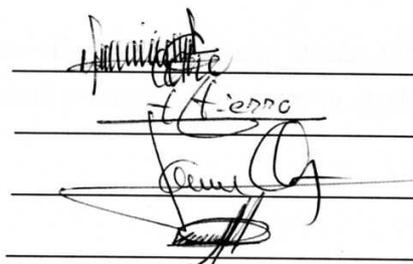
Jurado:

Presidente: Dr. Octavio Loera Corral

Secretario: Dr. Francisco Fierro Fierro

Vocal: Dr. Jaime Ortega López

Vocal: Alba Mónica Montiel González



The image shows four horizontal lines, each with a handwritten signature above it. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized. The first signature is the most legible, appearing to be 'Octavio Loera Corral'. The second signature is less legible but appears to be 'Francisco Fierro Fierro'. The third and fourth signatures are also less legible but appear to be 'Jaime Ortega López' and 'Alba Mónica Montiel González' respectively.

## RESUMEN

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son glicoproteínas clasificadas como oxidasas multicobre que catalizan la oxidación de varios compuestos orgánicos e inorgánicos, acopladas a la reducción del oxígeno molecular en agua. Las lacasas catalizan la remoción de un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de monofenoles metoxilados, orto y para-difenoles. También pueden oxidar otros sustratos como aminas aromáticas, siringaldazina y compuestos no fenólicos, formando radicales libres. Están reguladas por varios factores como son pH, temperatura e iones, entre otros. Las lacasas de *Pleurotus ostreatus* están siendo ampliamente estudiadas, se han reportado hasta ahora seis isoenzimas completamente caracterizadas (propiedades fisicoquímicas y secuencia); sin embargo, existen isoenzimas de las cuales se conoce su secuencia pero no su estructura proteica y aun faltan isoenzimas por describir. En este trabajo se describe una nueva isoenzima de *P. ostreatus*. Se analizaron las isoenzimas de lacasas producidas por fermentación en medio líquido (FML) y fermentación en medio sólido (FMS) sobre espuma de poliuretano (PUF), el medio de cultivo fue suplementado con cobre. Se obtuvo mayor biomasa y actividad de lacasa en la FML comparado con la FMS (5.5 g/L de biomasa con 13000 U/L de lacasa y 5 g/L de biomasa con 2400 U/L, respectivamente). La FML presentó hasta cuatro isoenzimas de lacasas y en la FMS únicamente se presentaron tres. La actividad de proteasas se observó sólo en la FMS y en ambos sistemas de fermentación se agotaron los azúcares. Una isoenzima producida por FML se presentó durante todo el tiempo de fermentación, la cual reportó un peso molecular aparente menor a los ya reportados (54.1 kDa). Se obtuvo la secuencia del amino terminal y a partir de esa secuencia se obtuvo el gen que codifica para la isoenzima de lacasa de interés de *P. ostreatus*. La secuencia del promotor constó de 469 pb, presentó posibles factores transcripcionales como MRE (cuatro), XRE (tres), uno de respuesta de defensa y un elemento de respuesta al estrés. El gen presentó un tamaño de 2636 pb interrumpido por 16 intrones, la secuencia que codifica para la proteína (RNAm) constó de 1527 pb. El gen de lacasa aislado codificó para una proteína de 509 aminoácidos y 22 aminoácidos que corresponden al péptido señal. En el análisis mediante el programa BLAST (NCBI) de la secuencia de la proteína derivada del gen de lacasa presentó alrededor

de un 96-97% de semejanza con las lacasas de *Pleurotus* reportadas en el banco de genes (NCBI), el gen completo presentó semejanzas de entre un 86 y un 94%, al igual que el ARNm. A pesar de que la similitud es alta, presenta características tales como peso molecular (SDS-PAGE), afinidad de sustratos y el promotor diferentes a los ya reportados.

## ABSTRACT

Laccases (EC 1.10.3.2) are glycoproteins classified as multi-copper oxidases, which catalyze one electron oxidation of a wide range of inorganic and organic substances, coupled with reduction of oxygen to water. Laccases catalyze the removal of a hydrogen atom from the hydroxyl group of methoxy-substituted monophenols, *ortho*- and *para*-diphenols, and also can oxidize other substrates such as aromatic amines, syringaldazine, and non-phenolic compounds, to form free radicals. Laccases are regulated by several factors such as pH, temperature, ions, etc. Laccases from *Pleurotus ostreatus* have been widely studied; there are reports of characterization of six isoenzymes (protein sequence and gene coding sequence), however, there are some isoenzymes not characterized yet. In this research, I describe a new laccase isoenzyme from *P. ostreatus*. Presence of isoenzymes of laccase in submerged fermentation (SmF) and solid-state fermentation (SSF) using polyurethane foam (PUF) as support was evaluated. The culture media were added of copper. The biomass and de laccase activity were higher in SmF than SSF (5.5 g/L of biomass and 13000 U/L of laccase activity, and 5 g/L and 2400 U/L respectively). Four isoenzymes of laccase were observed in SmF and three in SSF. Proteases activity was only observed in SSF. The carbohydrates consumption was total in both fermentation systems. It was observed a laccase isoenzyme through out the fermentation time in SmF with an apparent molecular weight less than the cues previously reported (54.1 kDa). The amino terminal sequence was obtained based on it was the gene coding sequence (3102 bp). The promoter region sequenced (469 bp upstream of ATG) contained putative binding transcription factors such as MRE (four), XRE (three), defense response element (one) and stress response element (one). The gene contains 2636 bp, interrupted by 16 introns, the protein coding sequence (mRNA) contains 1527 bp. The encoded protein contained 509 amino acids. The protein and gene sequences showed a 96-97% and 86-94 % of similarity with laccases of *Pleurotus* those previously reported (BLAST, NCBI). Although the similarity is high, this laccase isoenzyme has different characteristics such as apparent molecular weight (SDS-PAGE), affinity for substrates and the promoter sequence, from those already reported.

## ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
3 HAA	Ácido 3-hidroxiantranílico
ABTS	2,2.azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
ARE	Elementos de respuesta a antioxidantes
ATP	Adenosín trifosfato
CHEF	Electroforesis de campo eléctrico homogéneo
CLP	Polimorfismo en la longitud de los cromosomas
DMP	2,6-dimetoxifenol
ECE	Extracto crudo enzimático
EPR	Resonancia paramagnética
FML	Fermentación líquida
FMS	Fermentación sólida
HSE	Elementos de choque térmico
LiP	Lignina peroxidasa
MCO	Multicobre azul oxidasas
min	Minuto
mL	Mililitro
Mnp	Manganeso peroxidasa
Mpb	Mega pares de bases
MRE	Elementos de respuesta a metales
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
pb	Pares de bases
PFGE	Electroforesis de campo pulsado
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PUF	Espuma de poliuretano
PVDF	Membrana de difluoruro de polivinilideno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio
Siringaldazina	Azine 4 -Hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehido
spp	Especies
u.f.p.	Unidades formadoras de halos de lisis
VA	Versatil peroxidasa
VP	Veratril alcohol oxidasas
XRE	Elementos de respuesta a xenobióticos

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1 Descripción del género <i>Pleurotus</i> .....	13
1.1.1. Ciclo de vida .....	15
1.1.2. Genoma en Basidiomicetes .....	17
1.1.3. Importancia del género <i>Pleurotus</i> .....	19
1.2. Lacasas .....	22
1.2.1 Distribución y papel fisiológico de las lacasas .....	23
1.2.2 Estructura y mecanismo catalítico de las lacasas .....	26
1.2.3 Secuencia de Lacasas .....	28
1.2.4 Importancia industrial .....	30
1.3 Fermentación .....	31
2. ANTECEDENTES .....	34
3. JUSTIFICACIÓN .....	42
4. HIPÓTESIS .....	42
5. OBJETIVOS .....	43
5.1. General .....	43
5.2. Particulares.....	43
6. METODOLOGÍA.....	44
6.1. Selección y producción de la isoforma de lacasa.....	45
6.1.1. Microorganismos de estudio. ....	45
6.1.2. Fermentación.....	45
6.1.3. Obtención del extracto enzimático y evaluación de la biomasa .....	46
6.1.4 Determinación de la actividad de lacasas .....	46
6.1.5. Zimografía y geles de electroforesis .....	47
6.1.5. Determinación de la actividad de proteasas .....	47
6.1.6. Determinación de la concentración de proteína soluble .....	48
6.1.7. Determinación del contenido de azúcares .....	48
6.2. Purificación de la isoforma de lacasa.....	48
6.2.1. Inmovilización de la lacasa en membranas de difluoruro de polivinilideno ..	49
6.2.2. Secuenciación de la lacasa.....	49
6.3. Obtención de la sonda del gen de lacasa .....	50
6.3.1. Diseño de cebadores .....	50
6.3.2. Obtención de la sonda .....	50
6.4 Hibridación y localización del gen completo de la isoenzima seleccionada.....	51
6.4.1. Obtención del ADN de <i>P. ostreatus</i> .....	51
6.4.2 Construcción de la biblioteca genómica.....	52
6.4.2.1 Digestiones parciales.....	52
6.4.2.2 Fraccionamiento del ADN en gradiente de sacarosa .....	52
6.4.2.3 Ligación y empaquetamiento de ADN de <i>P. ostreatus</i> con los brazos de DASH II.....	55

6.4.2.4	Infección de células de <i>E. coli</i> con el bacteriófago DASH II.....	56
6.4.2.5	Transferencia de ADN de bacteriófago a membranas.....	57
6.4.2.6	Marcaje e hibridación de la sonda.....	58
6.4.2.7	Amplificación del bacteriófago en medio líquido y obtención del ADN...58	
6.4.3	Genome Walker.....	59
6.4.4	Aislamiento de mRNA y síntesis de cDNA.....	60
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
7.1.	Producción y selección de isoformas con actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	62
7.2.	Purificación de la isoforma de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	68
7.3.	Obtención de la sonda del gen de lacasa.....	75
7.3.1.	Obtención del ADN de <i>P. ostreatus</i> .....	75
7.3.2.	Obtención de la sonda mediante PCR.....	76
7.4.	Hibridación y localización del gen completo.....	77
7.4.1.	Obtención de la Biblioteca Genómica de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	77
7.4.2.	Obtención del gen de lacasa mediante Genome Walker.....	81
7.4.3.	Caracterización molecular del gen de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	85
8.	CONCLUSIONES.....	99
9.	PERSPECTIVAS.....	100
10.	REFERENCIAS.....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de los basidiomicetes.....	16
Figura 2. Reacción catalizada por lacasas sobre los compuestos fenólicos .....	23
Figura 3. Estructura del sitio activo de las enzimas lacasas (a) aminoácidos presentes y (b) Dominios 1, 2, y3. ....	27
Figura 4. Ciclo catalítico de lacasas mostrando el mecanismo de reducción y oxidación de los sitios de cobre (adaptado por Shleev y col., 2004). ....	28
Figura 5. Comparación de las secuencias de lacasas (a) y de loops de unión del sustrato (b) de las lacasas con estructura tridimensional disponible (Giardina y col., 2010). ....	29
Figura 6. Secuencia del mapa lineal del Bacteriofago Lambda DASH II.....	55
Figura 7. Esquema de la metodología del Wenome Walker. ....	60
Figura 8. Crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en FML (♦) y FMS (●).....	62
Figura 9. Consumo de azúcares por <i>Pleurotus ostreatus</i> en FML (♦) y FMS (●). ....	63
Figura 10. Contenido de proteína extracelular de <i>Pleurotus ostreatus</i> en FML (♦) y FMS (●).....	63
Figura 11. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> obtenida por FML (♦) y FMS (●). ....	65
Figura 12. Actividad específica de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> en FML (♦) y FMS (●). ....	65
Figura 13. Actividad de proteasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> en FML (♦) y FMS (●). ....	66
Figura 14. Zimogramas de la actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> a) FML, b) FMS.....	66
Figura 15. Morfología de <i>Pleurotus ostreatus</i> hongo en ambos sistemas de crecimiento, a) FML y b) FMS. ....	67
Figura 16. Cromatograma de la separación de proteína por cromatografía de intercambio iónico (Econo-Pac).....	69
Figura 17. Zimografía y tinción con plata de las fracciones con actividad de lacasa obtenidas de cromatografía de intercambio iónico (columna Econo-Pac).....	70
Figura 18. Cromatograma de la segunda separación de proteína por cromatografía de intercambio iónico (Econo-Pac).....	70
Figura 19. Zimografía y tinción con plata de las fracciones con actividad de lacasa obtenidas de cromatografía de intercambio iónico (Econo-Pac). ....	71
Figura 20. Cromatograma de la tercera separación de proteína por cromatografía de intercambio iónico (columna Bio-Q). ....	71
Figura 21. Zimografía y tinción con plata en condiciones semi-desnaturalizantes y desnaturalizantes de las muestras obtenidas en cromatografía de intercambio iónico (columna Bio-Q). ....	72
Figura 22. Membrana de difluoruro de polivinilideno con las proteínas inmovilizadas de <i>P. ostreatus</i> . ....	72

Figura 23. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos obtenida por la secuenciación de la isoforma de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	74
Figura 24. Gel de agarosa con la muestra de ADN total de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	75
Figura 25. Gel de agarosa de la amplificación del ADN de <i>Pleurotus ostreatus</i> con los cebadores diseñados.	76
Figura 26. Gel de agarosa con las digestiones <i>Sau3A1</i> del ADN de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	78
Figura 27. Fracciones obtenidas mediante el gradiente de sacarosa de la digestión parcial del ADN de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	78
Figura 28. Gel de agarosa con el ADN de <i>Pleurotus ostreatus</i> y fago DASH II (a) y ligación (b).	79
Figura 29. Placas de lisis obtenidas de la biblioteca genómica de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	80
Figura 30. Resultado de la exposición de filtros de ADN de bacteriófagos seleccionados como portadores del gen de lacasa de <i>P. ostreatus</i> .	81
Figura 31. Geles de las bandas amplificadas mediante la técnica de Genome Walker.	82
Figura 33. Alineamiento de las secuencias obtenidas mediante la amplificación de los primers de la técnica de PCR-anidado con el ADN purificado a partir del bacteriófago.	84
Figura 34. Estrategia de obtención del gen completo de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	84
Figura 35. Secuencia de nucleótidos de la región del promotor de <i>Pleurotus ostreatus</i> , que se extiende 469 pb antes al codón de inicio (ATG). Mostrando los posibles factores transcripcionales.	86
Figura 36. Secuencia de nucleótidos del gen de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> . Mostrando intrones (GenLAC) y exones (DNAcLac).	92
Figura 37. Alineamiento de las secuencias obtenidas por RT-PCR para obtener el cDNA, mediante el programa Lasergene (Seqman).	92
Figura 38. Secuencia de aminoácidos generada por la secuencia de cDNA del gen de lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	94
Figura 39. Secuencia de aminoácidos del gen de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> con los cuatro posibles dominios de unión del cobre.	97
Figura 40. Alineamiento de los cuatro dominios de unión de cobre de la lacasa (LACCM) con otras lacasas reportadas de <i>P. ostreatus</i> .	97

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del cariotipo de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	18
Tabla 2. Características de los dos grupos principales de enzimas ligninolíticas de hongos de pudrición blanca.....	21
Tabla 3. Características de los tipos de cobre de las lacasas de hongos. ....	27
Tabla 4: Características de FML y FMS. ....	33
Tabla 5. Proteínas y Genes reportados para lacasas. ....	39
Tabla 6. Composición del medio para la fermentación.....	45
Tabla 7. Mezcla y condiciones de reacción de PCR. ....	51
Tabla 8. Composición del medio de crecimiento para extracción del ADN. ....	51
Tabla 9. Dilución de las fracciones obtenidas por el gradiente de sacarosa. ....	54
Tabla 10. Mezcla de reacción de la ligación de ADN de <i>P. ostreatus</i> y DASH II.....	55
Tabla 11. Mezcla de reacción y programa de termociclador para llevar a cabo la amplificación de cDNA por RT-PCR.....	61
Tabla 12. Resultado del análisis de tipo Blast para la secuencia de nucleótidos obtenida por PCR. ....	77
Tabla 13. Secuencia de primers diseñados para Genome Walker.....	82
Tabla. 14. Comparación del gen, RNAm y aminoácidos de la lacasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> con secuencias NCBI (GenBank).....	98

## 1. INTRODUCCIÓN

Inicialmente se obtuvieron de un árbol (*Rhus vernicifera*) y fueron descritas por Yoshida en 1883. Posteriormente, Bertrand en 1896 y Laborde en 1896 demostraron por primera vez la actividad de lacasas en hongos, principalmente en hongos de pudrición blanca. Estos hongos reciben este nombre debido a la apariencia blanquecina que se aprecia en la madera al degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa (Schwarze y col., 2000). La degradación de la madera es ocasionada principalmente por basidiomicetos, grupo en el que se incluye *Pleurotus ostreatus*.

Las lacasas requieren cobre y oxígeno para oxidar compuestos tales como fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos mediante la transferencia de un electrón, ocasionando la formación de radicales libres (Claus, 2003). Por tal motivo, dichas enzimas tiene gran importancia en procesos de biorremediación (por ejemplo, en la degradación de colorantes procedentes de industrias textiles o residuos de herbicidas). El uso de enzimas para el tratamiento o degradación de contaminantes ambientales e industriales se ha incrementado en los últimos tiempos, debido a que sus reacciones son eficientes y selectivas.

### 1.1 Descripción del género *Pleurotus*

La palabra *Pleurotus* deriva del griego “pleuro” que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al píleo. Por su parte, *ostreatus* en latín *significa* en forma de ostra, y se refiere a la apariencia y al color del cuerpo fructífero (Stamets y Chilton, 1983). *Pleurotus* es un hongo saprofito o parásito débil, que degrada la madera y crece abundantemente sobre árboles de los géneros *Alnus*, *Ochroma* y *Acer*. La conexión evolutiva de las especies de este género no está del todo clara y ha generado controversia con respecto a su taxonomía. Sin embargo varias especies de *Pleurotus* se han identificado erróneamente, a pesar de su importancia económica. El principal problema en la identificación se ha atribuido a la gran variación y su amplia distribución del género. Actualmente se ha encontrado que varias cepas comerciales de *Pleurotus* reportadas como *P. ostreatus* se habían

confundido con otras especies, tales como *P. columbinus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. ostreatus* var. *florida*, *P. floridanus*, *P. flabellatus* y *P. djamor* (Mata y Salmones, 2003). Así como que hay una gran controversia respecto a la cepa *Pfl*, la cual no se considera como especie. Sin embargo aun no se ha aclarado completamente dicha controversia.

*Pleurotus* es uno de los grupos de hongos comestibles cultivables más diversos (Chang, 1999). Comprende hongos ligninolíticos con propiedades medicinales y aplicaciones biotecnológicas y ambientales. El cultivo de *Pleurotus* es de gran importancia económica en la industria de alimentos, la cual se ha expandido en pocos años y lo ha convertido en el tercer hongo cultivable más importante. El sustrato del cultivo de *Pleurotus* contiene lignina y celulosa, y en algún caso puede ser reciclado como alimento para animales o en la preparación de otros productos (la degradación selectiva del hongo sobre la lignina provoca la disponibilidad de celulosa y hemicelulosas, que pueden ser aprovechadas como alimento de los rumiantes).

El género *Pleurotus* comprende especies generalmente de color blanco, crema, rosado, gris claro y hasta pardo, adquiriendo una coloración amarillenta con el tiempo. En general presentan forma de sombrilla o sombrero circular (píleo) y un eje o pie (estípite) que lo sostiene. En la cara inferior de la sombrilla abierta hay laminillas (himenio) que van desde el centro hasta el borde del sombrero; las laminillas son blancas, decurrentes y espaciadas ampliamente. El píleo, donde se encuentran las laminillas, es excéntrico cuando crece en superficies verticales y es central cuando crece en camas; la superficie del píleo es lisa y brillante, un poco viscosa en tiempo húmedo. El estípite es corto y excéntrico. Las esporas que se encuentran en el basidiocarpo son de color blanco, crema o lila pálido, presentan una forma cilíndrica (raramente elipsoides) y son lisas. Los basidiocarpos pueden ser de 4-13 cm de diámetro, aunque pueden presentar tamaño mayor de acuerdo a las condiciones de fructificación. El género es cosmopolita, está distribuido en Europa, Asia, África, Australia, Estados Unidos, Canadá y América Latina (Guinberteau, 1990). La

temperatura óptima de desarrollo de las especies de este género es variable: *P. ostreatus* crece a una temperatura óptima de 25 °C, mientras que *P. pulmonarius* se desarrolla a 15-28 °C.

El cuerpo fructífero de los basidiomicetos se forma como consecuencia de la diferenciación del micelio (un conjunto de filamentos denominadas hifas) (Herrera y Ulloa, 1998). El crecimiento de éste se realiza sólo en las puntas y se atribuye a un fenómeno complejo en el que participan vesículas (las cuales son agregados de enzimas hidrolíticas y sintéticas) que degradan y restauran fragmentos de la pared celular. Las vesículas se producen a lo largo del segmento subapical y se transportan por medio de un mecanismo hasta llegar al centro distribuidor de vesículas, conocido como *spitzenkörper*. Desde ahí son distribuidas en forma radial y aleatoria hacia la pared apical, dando lugar al crecimiento de las hifas. El micelio desempeña la función de adquirir y distribuir los nutrientes, así como de formar la estructura de soporte para el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Klein, 1996).

### **1.1.2. Ciclo de vida**

En los basidiomicetos existen dos modelos sexuales: 1) el heterotalismo, en el que son necesarios dos micelios para llevar a cabo la reproducción, con lo que se asegura que las células diploides (basidios) que son formadas en el cuerpo fructífero produzcan progenie meiótica recombinante (basidiosporas), y 2) el homotalismo, en el que los hongos son autocompatibles (es decir, la unión sexual puede efectuarse entre elementos de un mismo micelio). Aproximadamente un 10 % de los basidiomicetos pertenecen a este último modelo. *P. ostreatus* es heterotálico, y alterna entre una fase monocariótica (haploide) y una dicariótica (diploide). Dos hifas monocarióticas compatibles pueden fusionarse y dar origen a un micelio dicariótico (plasmogamia), en el cual permanecen dos núcleos parentales independientes (dicarion, heterocarion) durante todo el crecimiento vegetativo. Este estado puede fructificar bajo condiciones ambientales apropiadas. El estado diploide se da en el basidio, donde la cariogamia

(fusión binaria) se lleva a cabo antes de la meiosis, originando cuatro basidiosporas uninucleadas. Las basidiosporas pueden germinar y producir micelio monocariótico, reiniciando el ciclo de vida del hongo (Figura 1). La condición monocariótica y dicariótica del micelio puede ser distinguida por la presencia de fíbulas (estructuras especializadas que permiten la distribución de los núcleos en las células hijas) en el dicarion y su ausencia en el monocarion.

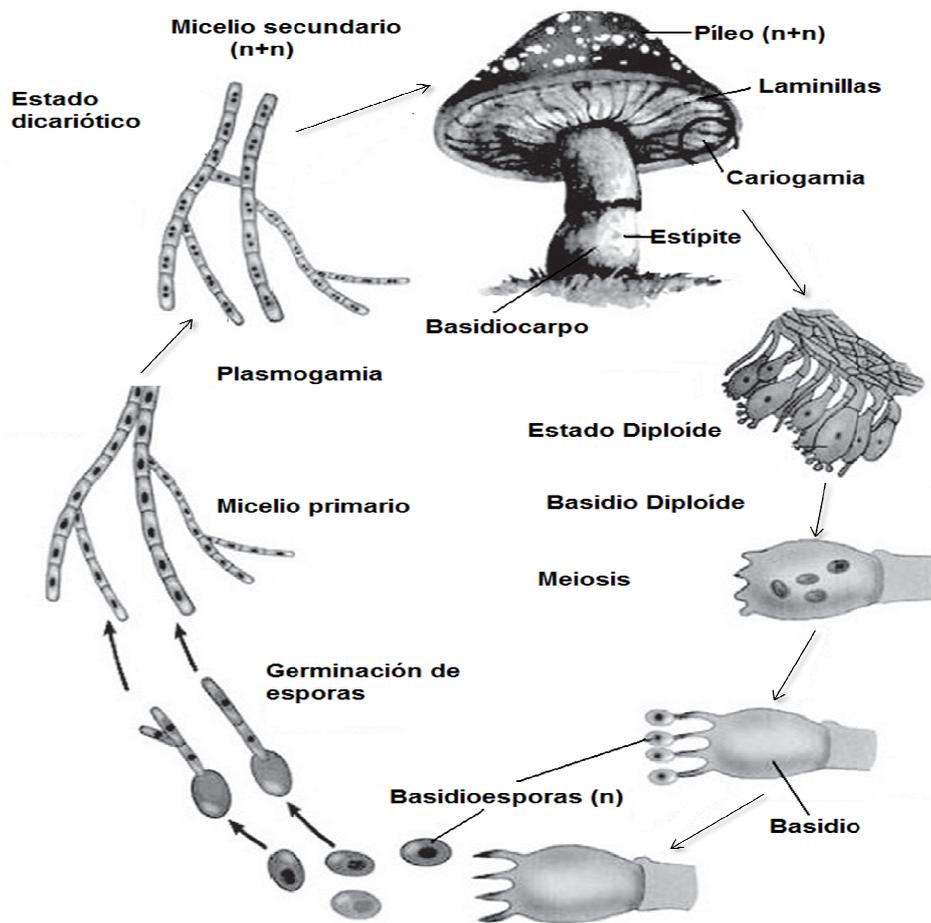


Figura 1. Ciclo de vida de los basidiomicetes.

Las hifas o ramificaciones forman gradualmente una asociación esférica de micelio de unos 1-2 mm (nódulos iniciales o secundarios), formando pequeños cuerpos que dan

origen a los primordios (Kües y Liu, 2000). El píleo del hongo joven se desarrolla de tejido de la región inicial apical (pre-píleo), la parte superior de esta región es el origen de la trama del píleo y la parte baja forma un anillo de células ricas en glucógeno que definen el límite del himenio y el estípite (Moore, 1998). El tejido joven del himenio diferenciado en forma de cúpula rudimentaria se convierte en las laminillas primarias, que forman la capa de células himeniales sobre la superficie. Este proceso está acompañado por un proceso de muerte celular programada que ayuda a estabilizar la cámara himenial con el primordio (Umar y Van Griensven, 1998). Con el incremento del tamaño del primordio, debido al crecimiento del tejido meristemoide en el borde exterior del píleo, las laminillas secundarias se pueden generar por la división de la trama de las laminillas primarias, en forma radial y hacia el exterior. En contraste con las laminillas primarias, las secundarias no están conectadas al estípite (Moore, 1998). El crecimiento de los hongos provocará un cambio desde la extensión micelial a la producción de primordios. Las células pueden alargarse rápidamente en todas las direcciones, a menudo varias veces su longitud original, aunque durante los pasos consecutivos de fructificación lo primero que se incrementa es el volumen. El inicio y el procedimiento de fructificación están correlacionado con la cariogamia y la meiosis; y las basidiosporas se desprenden en cuanto el cuerpo fructífero madura (Kües y Liu, 2000).

### **1.1.3. Genoma en *Basidiomicetes***

El uso industrial de los hongos requiere una selección inicial de las cepas de interés, y la subsecuente propagación de las cepas seleccionadas para mejorar la producción de metabolitos secundarios o para la producción de biomasa. El estudio citogenético en los basidiomicetos superiores ha sido difícil, a causa de la mitosis intranuclear y el pequeño tamaño de los cromosomas de los hongos. En el caso de *Pleurotus*, el número de cromosomas y el tamaño del genoma han estado bajo discusión durante muchos años (Sagawa y Nagata, 1992; Chiu, 1996). El estudio de la genética de hongos se revolucionó por el desarrollo de la técnica de electroforesis de campo

pulsado (PFGE) y su aplicación en cuestiones relacionadas con el tamaño, organización y estabilidad de los genomas de hongos. La separación de cromosomas mediante la electroforesis de campo eléctrico homogéneo (CHEF) es el método más utilizado para el estudio molecular del cariotipo de los hongos y su evolución (Sonnenberg y col., 1996; Zolan, 1995). Sagawa y Nagata (1992) utilizaron PFGE para el estudio del cariotipo de *P. ostreatus*, reportando un tamaño de 20.8 Mpb. Peberdy y col. (1993), identificaron nueve cromosomas y un tamaño del genoma de 31.3 Mpb y Larraya y col. (1999) reportaron un tamaño de 35.1 Mpb. Todos los estudios del genoma de *P. ostreatus* reportaron diferentes número de cromosomas (Tabla 1).

**Tabla 1. Características del cariotipo de *Pleurotus ostreatus*.**

Cromosoma	Tamaño (Mpb) Larraya y col., 1999	Tamaño (Mpb) Sagawa y Nagata, 1992	Tamaño (Mpb) Peberdy y col., 1993
I	4.70	5.2	5.7
II	4.35	4.4	
III	4.55	3.7	
IV	3.55	2.9	
V	3.45	2.5	
VI	3.10	2.1	
VII	3.15		
VIII	2.95		
IX	2.10		1.1
X	1.75		
XI	1.45		
Total	35.1	20.8	31.3

En muchos estudios, el análisis electroforético de los cromosomas ha revelado la existencia de polimorfismo en la longitud de los cromosomas (CLPs) y entre los cromosomas homólogos de cada uno de los dos núcleos presentes en el dicarion. Los CLPs son comunes en los genomas de los hongos y pueden ser debidos a mecanismos de translocación (Sonnenberg y col., 1996), repeticiones subteloméricas (Farman y Leong, 1995), el resultado de la mitosis y el proceso de recombinación meiótica (Zolan, 1995). El mapeo de *loci* de caracteres cuantitativos ayudaría en la

selección asistida mediante marcadores de los aspectos de importancia económica (por ejemplo, tasa de crecimiento u otros componentes del rendimiento, como el número de brotes, peso promedio de las setas y la tolerancia a agentes patógenos, entre otros). El tamaño relativamente pequeño del genoma de *P. ostreatus* y las posibilidades de manipulación de genética clásica de este hongo lo convierten en un organismo modelo interesante para estudios de basidiomicetos comestibles (Larraya y col., 1999).

#### **1.1.4. Importancia del género *Pleurotus***

Los hongos se han considerado como el alimento ideal, debido a su contenido de nutrientes para humanos y animales. *Pleurotus spp.* es un hongo comestible de gran importancia y el cultivo de este hongos presenta grandes ventajas, como son el rápido crecimiento micelial, gran capacidad de colonización saprófita, técnica de cultivo sencillo y económico, pudiendo crecer en diferentes condiciones climáticas. Se desarrolla sobre desechos agroindustriales por lo que es una alternativa de conservación del ambiente (mediante el cultivo de hongos se reciclan desechos de tipo lignocelulósico). Este hongo es apreciado por sus características organolépticas y por su calidad nutrimental; el porcentaje de proteína en peso seco se ha reportado entre 10-30%, el de carbohidratos entre 14-57%, el contenido de lípidos, principalmente insaturados, es del 3-5%. También se ha reportado que contienen zinc, cobre, magnesio y fósforo, y se ha encontrado hierro, manganeso, potasio, calcio, aluminio y sodio, en pequeñas cantidades (Breene, 1990).

Se han aislado una amplia variedad de compuestos bioactivos de muchas especies de hongos comestibles, como terpenoides, esteroides, ácidos grasos, proteínas, lectinas, proteoglucanos y polisacáridos. También se han reportado propiedades medicinales, o se han obtenido determinados compuestos antivirales, antitumorales, antibióticos, hipocolesterolémico e inmunomoduladores. Las principales moléculas aisladas de diferentes cepas del género *Pleurotus* han sido, sin embargo, polisacáridos (Cohen y

col., 2002). La pared celular de *Pleurotus* contiene quitina, hemicelulosa, glucanos, mananos y, especialmente,  $\beta$ -glucanos ramificados no celulósicos, los cuales tienen propiedades benéficas para la salud. La actividad biológica de tales polisacáridos depende específicamente del enlace químico y la estructura de los grupos que forman la cadena y del grado de ramificación (Chen y Seviour, 2007). Los  $\beta$ -glucanos de hongos parece que son efectivos inmunomoduladores, y tienen un efecto positivo sobre el cáncer y varias bacterias infecciosas (Vetvicka e Yvin, 2004).

*Pleurotus ostreatus* pertenece a los organismos degradadores de lignina. Se ha reportado que su sistema ligninolítico está compuesto por: Manganese peroxidases (MnP), Veratril alcohol oxidases (VA) y lacasas (Tabla 2). Este hongo no produce lignina peroxidases. Las enzimas oxidativas (lacasas y MnP) pueden catalizar la formación de radicales intermediarios de lignina de alto peso molecular, pero estos intermediarios pueden re-condensarse, cambiando el curso de la reacción. Se ha visto que la prevención de la re-polimerización se logra por la reducción de la formación de radicales libres. Este proceso de reducción se lleva a cabo, en oxidases tales como VA, por algunos nucleótidos dependientes de adenina y flavina (Marzullo y col., 1995). Las lacasas y MnP oxidan residuos fenólicos de lignina, mientras que la lignina peroxidase (LiP) oxida residuos no fenólicos, compuestos aromáticos de alto potencial redox que incluyen al alcohol veratrílico. Sin embargo, *Pleurotus* es capaz de oxidar este tipo de sustratos mediante la actividad de las lacasas y la presencia de compuestos que funcionan como mediadores. Ruiz-Deñás y col. (2001), reportaron una enzima llamada peroxidase versátil (VP) en *Pleurotus*, la cual combina las propiedades catalíticas de las dos peroxidases (MnP y LiP) y puede oxidar los sustratos típicos de ambas enzimas. Se ha reportado que la VA incrementa la capacidad de la LiP (Tabla 2) para oxidar sustratos de alto potencial redox y fenoles (tendría por lo tanto el papel de un mediador redox o enzima estabilizadora, aunque su contribución sigue siendo controversial); la VA no incrementa sin embargo la oxidación de los sustratos de la VP, la cual es capaz de oxidar compuestos que no son oxidados por la LiP en ausencia de la VA.

**Tabla 2. Características de los dos grupos principales de enzimas ligninolíticas de hongos de pudrición blanca.**

Tipo de enzima	Reacción	Cofactor <sup>1</sup>	Metales o iones <sup>2</sup>	Mediadores	Subunidad y PM (kDa)	T opt (°C)	pH opt	Localización <sup>3</sup>	Glicosilación <sup>4</sup>	Referencia
Fenol oxidasas (lacasas)	4benzenodiol+O <sub>2</sub> = 4benzo-semiquinonas+2 H <sub>2</sub> O	N/A	Ca <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Imidazol, K <sup>+</sup> , K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Mn <sup>2+</sup> , Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fenol, anilinas, 3-HAA, siringaldazina hidroxibenzotriazol y ABTS	Monomérica (43-100), dimérica, triméricas u oligoméricas	20-80	2-10	Intracelular y extracelular	Si	Wesenberg y col., 2003; Claus, 2004; Baldrian, 2006 y Hilden y col., 2009
Peroxidasas										
a) LiP	1,2-bis(3,4-dimetoxifenil)propano-1,3-diol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 3,4-dimetoxibenzaldehído + 1-(3,4-dimetoxifenil)etano-1,2-diol + H <sub>2</sub> O	Hemo	Hierro	Alcohol veratrílico	Monomérica (37-50)	35-55	1-5	Extracelular	Si	Wesenberg y col., 2003; Asgher y col., 2008 y Anderson y col., 2008
b) MnP	2Mn(II) + 2H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 2Mn(III) + 2H <sub>2</sub> O	Hemo	Ca <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Sm <sup>3+</sup>	Ácidos orgánicos como quelatos, tioles, ácidos grasos insaturados	Monomérica (32-62.5)	30-60	2.5-6.8	Extracelular	Si	Wesenberg y col., 2003; Mai y col., 2004; Johansson y col., 1993 y Baborova y col., 2006
c) VP	donador + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = donador oxidado + 2H <sub>2</sub> O	Hemo	Mn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , hierro	Alcohol veratrílico, compuestos mediadores similares de LiP y MnP	Monomérica	N/D	3-5	Extracelular	Si	Champagne, 2007; Wei y col., 2009 y Camarero y col., 1999

<sup>1</sup>Reacción General. <sup>2</sup>Las enzimas de las diferentes especies pueden variar en su necesidad de metales o iones. <sup>3</sup>Las lacasas de hongos son principalmente extracelulares pero se han encontrado en el citoplasma o intracelulares principalmente en plantas y bacterias. <sup>4</sup>La glucosilación varía entre las diferentes enzimas ligninolíticas de hongos. N/A: No aplicable. N/D: No determinado

## 1.2. Lacasas

Las lacasas (benzenodiol: oxígeno oxido-reductasas, E.C. 1.10.3.2) pertenecen al subgrupo más numeroso de las multicobre azul oxidasas (MCO), las cuales utilizan la capacidad redox de los iones de cobre para catalizar la oxidación de un amplio rango de sustratos aromáticos junto con la reducción de oxígeno molecular a agua (Solomon y col., 1996). Se han reportado aproximadamente 200 tipos de oxidasas, aunque sólo seis de ellas son capaces de catalizar este tipo de reacción con el oxígeno: citocromo C oxidasa, lacasas, L-ascobato-oxidasas, ceruloplasminas, bilirrubina-oxidasa y fenoxazinona sintetasa (Giardina y col., 2010). Las lacasas de hongos son principalmente inducibles y extracelulares. Son glicoproteínas con un contenido de carbohidratos del 10-30%; el papel del componente glucídico comprende la estabilización de los sitios de unión del cobre, dirigir la secreción de las proteínas, protección contra la proteólisis y mejorar la termoestabilidad (Rodger y col., 2009). En forma activa son holoenzimas y utilizan al cobre como cofactor, el intervalo de la masa molecular está aproximadamente entre 50 y 100 kDa y su punto isoeléctrico (pI) está entre 3-6. El pH óptimo de actividad varía de 3-6, dependiendo del sustrato, y son estables a temperaturas de entre 50-60 °C (Record y col., 2002). Estas enzimas son generalmente monoméricas o raramente homo- y heterodiméricas o homotetraméricas (Hoegger y col., 2006). El sitio catalítico está bastante conservado en muchas especies, aunque en algunos casos el resto de la estructura de la enzima muestra una amplia diversidad.

Catalizan la eliminación de un átomo de hidrógeno en los grupo hidroxilo de las posiciones *ortho* y *para*, sustituyendo sustratos monofenólicos, polifenólicos y aminas aromáticas por eliminación de un electrón para formar radicales libres capaces de despolimerizarse, repolimerizarse, metilarse o formar quinonas (Figura 2) (Abadulla y col., 2000). El producto inicial típicamente es inestable y puede sufrir una segunda oxidación catalizada enzimáticamente (conversión de fenol a quinonas) o una reacción no enzimática (como la hidratación o desprotonización) y/o puede participar en una reacción de polimerización, originando un producto amorfo insoluble como la

melanina. Las lacasas catalizan, pues, reacciones de polimerización y de depolimerización. Estas últimas se originan porque la oxidación de algunos compuestos fenólicos puede resultar en el rompimiento de un alquil areno, aunque depende mucho de la naturaleza del fenol y de las condiciones de la reacción (Schoemaker, 1990). Las lacasas pueden operar como una batería de almacenamiento de electrones a partir de las reacciones individuales de oxidación, con el propósito de reducir oxígeno molecular (Thurston, 1994).

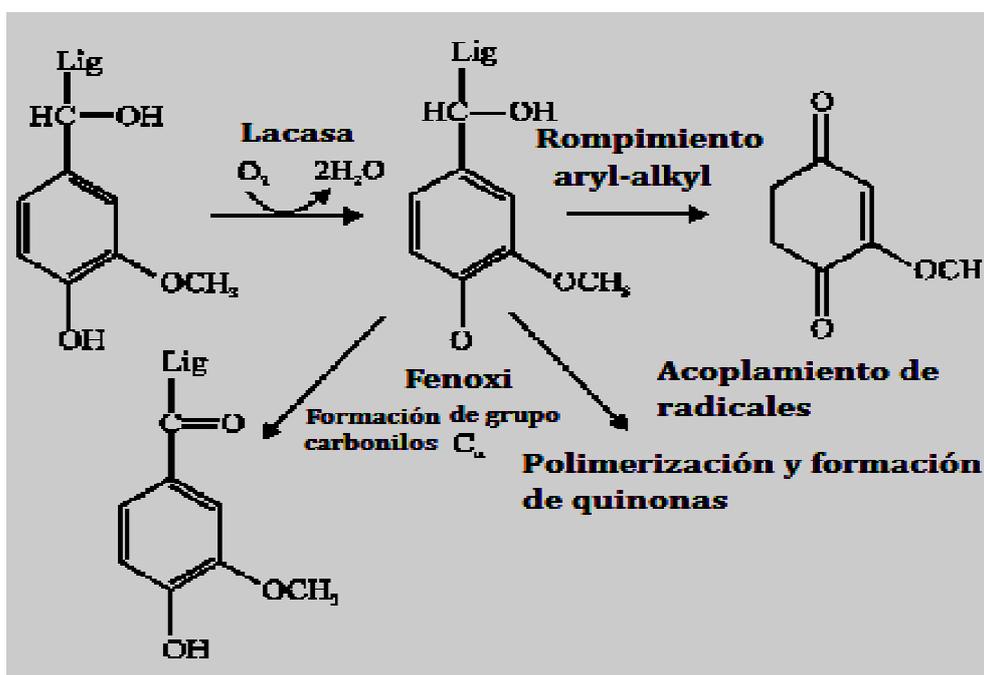


Figura 2. Reacción catalizada por lacasas sobre los compuestos fenólicos

### 1.2.1 Distribución y papel fisiológico de las lacasas

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran en plantas, hongos, bacterias y en algunos insectos (Palonen y col., 2003). La función biológica de las lacasas no está clara, y al parecer varía dependiendo del tipo de organismo. El primer reporte de lacasas, en 1883, fue en la savia de *Rhus vernicifera*, árbol de la laca japonés, del cual se deriva su designación como lacasas. Estas

enzimas se han descrito en numerosos organismos del reino vegetal: en el álamo (Ranocha y col., 1999), tabaco (De Marco y Roubelakis-Angelakis, 1997) y durazno, entre otros. La función fisiológica reportada de las lacasas en las plantas ha sido la síntesis de lignina y se han encontrado en el xilema, donde probablemente oxidan monolignoles en la primera etapa de la lignificación (Gavnholt y Laesen, 2002); también al parecer están involucradas en la recuperación de hojas dañadas (De Marco y Roubelakis-Angelakis, 1997). La determinación y purificación de las lacasas en las plantas es a menudo difícil, porque el extracto crudo contiene un gran número de enzimas de tipo oxidativo, con amplia especificidad de sustrato (Ranocha y col., 1999).

La primera lacasa bacteriana descrita fue la de *Azospirillum lipoferum* (bacteria nitrificante), y está involucrada en la pigmentación de la célula utilizando los compuestos fenólicos y/o el transporte de electrones (Alexandre y col., 1999). *Bacillus subtilis* produce una lacasa que participa en la producción de pigmentos de la cubierta de la spora, protegiéndola de factores de estrés tales como la radiación UV o el peróxido de hidrogeno (Martins y col., 2002). Las lacasas bacterianas se encuentran como proteínas intracelulares o periplásmicas (Claus, 2003), como es el caso de la lacasa caracterizada en *Sinorhizobium meliloti*, una proteína periplásmica que presenta una masa molecular de 45 kDa (Rosconi y col., 2005). Como ejemplos de lacasas bacterianas intracelulares se pueden citar las de *Azospirillum lipoferum* (Diamantidis y col., 2000), *Marinomonas mediterranea* (Solano y col., 1997) y *Bacillus subtilis* (Martins y col., 2002). En estos casos, las células bacterianas podrían usar las lacasas como una estrategia para hacer frente a subproductos tóxicos originados durante el metabolismo. De hecho, se ha propuesto la hipótesis de que el reordenamiento del sistema de transporte de electrones es una vía por la cual las células que presentan actividad de lacasas se adaptan a las quinonas endógenas sustituidas, generadas como productos de la reacción catalizada por las enzimas. La pérdida de actividad del citocromo-C oxidasa y la adquisición de la resistencia a las quinonas análogas ha sido demostrada en especies de *A. lipoferum* (Alexandre y col., 1999). En plantas y hongos, la localización extracelular de las enzimas ayuda a evitar problemas generados por las especies reactivas, tales como semi-quinonas y

quinonas, que se forman mientras se oxidan sustratos aromáticos por acción de las lacasas.

Los estudios de las lacasas en insectos han sugerido que participan en la esclerotización y pigmentación de la cutícula (Arakane y col., 2005).

La mayoría de las lacasas caracterizadas son de origen fúngico, principalmente de hongos de pudrición blanca, los cuales son eficientes degradadores de lignina. Los hongos productores de lacasas pertenecen a los ascomicetos, deuteromicetos, basidiomicetos y hongos celulolíticos. Algunos ejemplos son *Neurospora crassa* (Froehner y Eriksson, 1974), *Phlebia radiata* (Niku-Paavola y col., 1988), *Trametes versicolor* y *Coriolus polyporus* (Rogalski y col., 1991), *Phanerochaete chrysosporium* (Gold y Alic, 1993), *Pycnosporus cinnabarinus* (Eggert y col., 1996), *Chaetomium thermophilum* (Chéfetz y col., 1998) y *Coprinus cinereus* (Schneider y col., 1999). Los diferentes niveles de degradación de la lignina, con respecto a otros compuestos de la madera, dependen de las condiciones ambientales y de la especie del hongo involucrado, ya que se ha demostrado que la maquinaria enzimática de cada uno de ellos es diferente (Palmieri y col., 1997).

Se han reportado funciones de las lacasas en distintos procesos celulares fúngicos, como morfogénesis, producción de pigmentos, patogénesis y virulencia (Eggert y col., 1998), en la degradación (lignina o eliminación de fenoles tóxicos). La eliminación de compuestos tóxicos se puede hacer promoviendo la polimerización, antes de que estos compuestos entren a la hifa. En *Aspergillus nidulans* se han reportado dos isoformas de lacasas, y ambas al parecer están involucradas en la síntesis de los pigmentos de color verde de los conidios. En los hongos *Daldinia concentrica* y *Lentinula edodes* participan en la formación del cuerpo fructífero, así como en la formación de pigmentos extracelulares acoplados a la polimerización oxidativa de los componentes de la pared celular, fortaleciendo la unión entre célula y célula (Leatham y Stahmann, 1981). En *Agaricus bisporus* las lacasas se acumulan durante el crecimiento vegetativo, en forma paralela con el micelio, pero se inactivan rápidamente al iniciar la formación del cuerpo fructífero. Por ello se las ha involucrado

con el crecimiento invasivo del hongo para la hidrólisis de la lignina, y así dejar disponible a la celulosa y hemicelulosa (Ainsworth y Rayner, 1991). En *Trametes versicolor* y *Pycnoporus cinnabarinus* participan en la degradación de la lignina, donde las lacasas oxidan las subunidades fenólicas de la misma (Thurston, 1994). En *Armillaria mellea*, un hongo fitopatógeno, la lacasa se ha asociado con la formación de los rizomorfos (cadenas de micelio formadas por un gran número de hifas), ya que se propuso que las lacasas forman una cola de polifenoles que permite mantener juntas las hifas (Rehman y Thurston, 1992). Son también importantes como factor de virulencia, ya que en *Botrytis cinerea* (moho gris de la uva) se ha reportado que el papel de la enzima está relacionado con la defensa contra metabolitos tóxicos producidos por la planta. También son importantes para la patogénesis en *Cryphonectria parasitica* (Rigling y Van Alfen, 1993).

### **1.2.2 Estructura y mecanismo catalítico de las lacasas**

Se ha sugerido que el mecanismo de acción que presentan las lacasas depende de la función que requiera la célula, de su localización en la misma (si son de tipo intracelular o extracelular) y del tipo de célula que las produce, pudiendo incluso llegar a presentar diferentes sitios de unión para sustratos diferentes (Sharma y Kuhad, 2008). Las lacasas usualmente contienen cuatro átomos de cobre por monómero, unidos a tres sitios redox ( $T_1$ ,  $T_2$  y  $T_3$ , con un par de átomos de Cu, esquema "b" en la Figura 2). Los cuatro átomos de Cu difieren entre sí por sus características de resonancia paramagnéticas (EPR) (Tabla 3). Para la actividad catalítica se necesitan un mínimo de cuatro átomos de Cu por proteína activa. El sitio  $T_1$  está ligado a dos histidinas imidazol y un grupo sulfhídrico de cisteína, que forma una estructura trigonal. Este cobre puede ser remplazado por iones de mercurio o cobalto. Los cobres  $T_2$  y  $T_3$  forman un sitio de unión trinuclear, el cual es responsable de la unión del oxígeno y la reducción a agua. El cobre  $T_2$  está coordinado por dos histidinas y el par de cobre  $T_3$  por seis histidinas (esquema "a" en la Figura 3). El fuerte acoplamiento anti-ferromagnético entre los dos átomos de cobre del sitio  $T_3$  se mantiene por un puente hidroxilo (Claus, 2003).

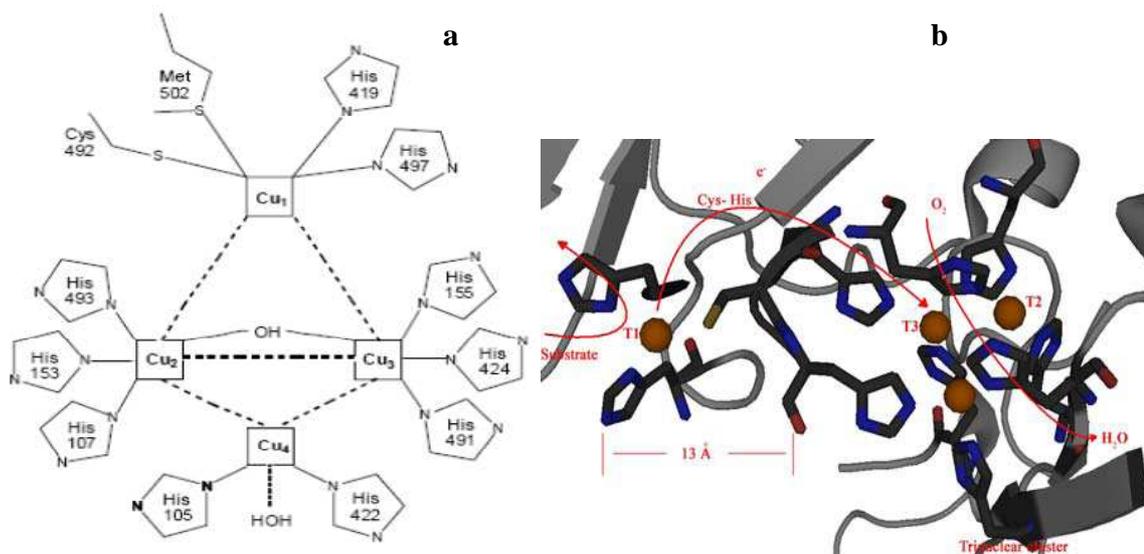


Figura 3. Estructura del sitio activo de las enzimas lacasas (a) aminoácidos presentes y (b) Dominios 1, 2, y3.

**Tabla 3. Características de los tipos de cobre de las lacasas de hongos.**

Cu	Cu/prot	Señal de EPR*	Característica	Coordinación	Función
T <sub>1</sub>	1	+ Paramagnético	Cobre azul, abs 610 nm (oxidación), potencial redox +785 mV	2 Hys, 1 Cys, 1 Leu	Oxidación del sustrato, transferencia de electrones
T <sub>2</sub>	1	+ Paramagnético	Cobre no azul (afinidad a azida, fluoruro, cianuro)	Centro trinuclear	Re-oxidación de T <sub>1</sub> y activación del oxígeno molecular
T <sub>3</sub>	2	- Dia-magnético	Par de cobre, absorbancia a 330 nm (oxidación)	8 Hys	Captación y reducción del O <sub>2</sub> por oxidación enzimática

\* Resonancia paramagnética

El cobre T<sub>1</sub>, está involucrado en la eliminación de electrones por la reducción del sustrato (donador de electrones), con la subsecuente transferencia de electrones al sitio T<sub>2</sub>/T<sub>3</sub>. El mecanismo de la transferencia de electrones y la reducción del oxígeno a agua aun no han sido totalmente aclarados, sin embargo se ha propuesto un esquema (Figura 4) para explicar el mecanismo a partir de los datos cinéticos y estructurales disponibles (Shleev y col., 2004). En el ciclo catalítico, el sustrato es

reducido en el sitio T<sub>1</sub>, y el electrón es transferido al sitio trinuclear. Se han propuestos dos mecanismos de reducción del sitio trinuclear: los sitios T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> reducen el sitio T<sub>3</sub> (“a” en la Figura 4) o cada cobre en el sitio trinuclear se reduce secuencialmente por transferencia de electrones desde el sitio T<sub>1</sub> (“b” en la Figura 4), en el caso de que el sitio T<sub>3</sub> no actuara como aceptor de dos electrones. La disminución lenta del intermediario nativo conduce a la forma totalmente oxidada. En esta forma, el sitio T<sub>1</sub> puede ser reducido por el sustrato, pero la transferencia de electrones hacia el sitio trinuclear es demasiado lenta como para que la enzima sea catalíticamente activa (Solomon y col., 1996).

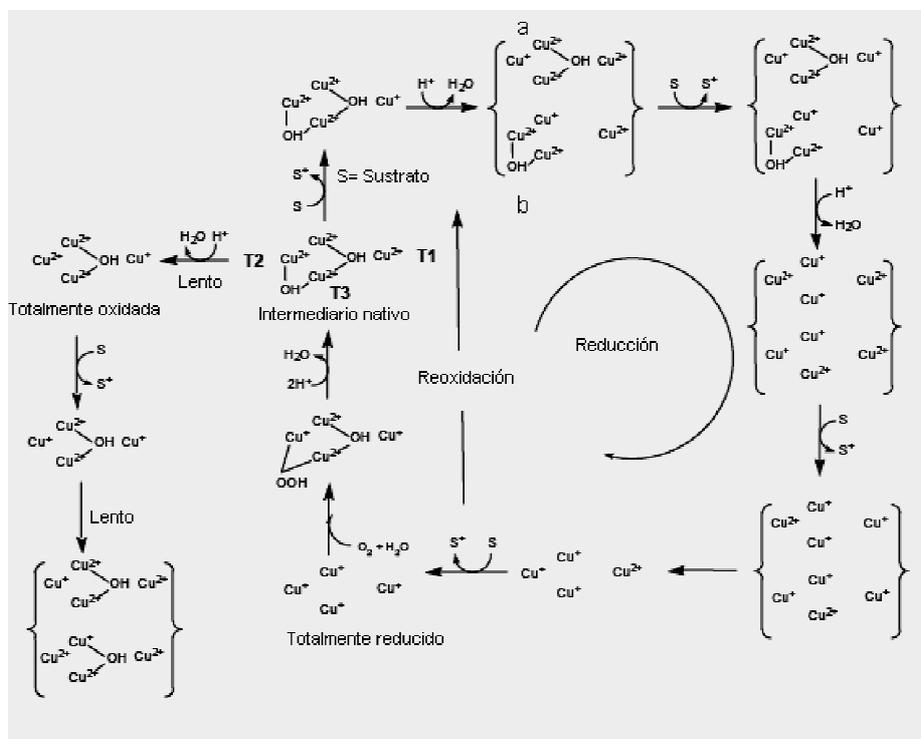


Figura 4. Ciclo catalítico de lacasas mostrando el mecanismo de reducción y oxidación de los sitios de cobre (adaptado por Shleev y col., 2004).

### 1.2.3 Secuencia de Lacasas

El análisis de las secuencias reportadas de varias lacasas de hongos, tras realizar alineamientos múltiples de las secuencias de más de 100 lacasas, dió como resultado

la identificación de cuatro regiones (L1-L4), que son útiles para la identificación de las lacasas y que permiten poder distinguirlas dentro de la amplia gama de las muy conservadas MCOs (Figura 5a) (Kumar y col., 2003). Los 12 aminoácidos que actúan como sitio de unión del cobre se encuentran dentro de las cuatro regiones conservadas, de las cuales L2 y L4 coinciden con las secuencias de unión de cobre reportadas anteriormente para MCOs, mientras que L1 y L3 son sitios distintivos de unión de cobre para las lacasas. Por otra parte, en las zonas de unión del sustrato se identificaron (mediante la superposición de estructuras 3D de las proteínas) cuatro regiones a las que se les ha llamado *loops* (bucles), nombradas como I, II, III y IV (Figura 5b). En la Figura 4 se muestra un ejemplo de alineamiento donde se observan las regiones L1-L4 y las regiones de unión del sustrato de los siguientes organismos: *Coprinus cinereus* Lac-Cc (CcL1A65) (Ducros y col., 1998), *Trametes versicolor* Lccl (TvL1GYC) (Piontek y col., 2002) y *LactiIB* (TvL1KYA) (Bertrand y col., 2002), *Rigidoporus lignosus* RL (R1G1V10) (Garavaglia y col., 2004), *Lentinus tigrinus* LtL (LtL2QT6) (Ferraroni y col., 2007) y *Trametes trogii* TtL (TtL2HRG) (Matera y col., 2008).

**a**

Proteína	L1	L2	L3	L4
<b>TvL1KYA</b>	<sup>64</sup> HWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPI	<sup>104</sup> GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	<sup>395</sup> HPFHLGH	<sup>447</sup> GPWFLHCHIDFHLEAGFAVVF
<b>TvL1GYC</b>	<sup>64</sup> HWHGFFQAGTWNADGPAFVNQCPI	<sup>104</sup> GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	<sup>395</sup> HPFHLGH	<sup>447</sup> GPWFLHCHIDFHLEAGFAIVF
<b>R1G1V10</b>	<sup>64</sup> HWHGFFQAGTTEMGPAFVNQCPI	<sup>104</sup> GTYWYHSHLSTQYCDGLRGAF	<sup>396</sup> HPFHLGH	<sup>446</sup> GPWFLHCHIDWHLEAGLAVVF
<b>CcL1A65</b>	<sup>64</sup> HWHGLFQKGTNWADGADGVNQCPI	<sup>104</sup> GTFWYHSHFGTQYCDGLRGPM	<sup>395</sup> HPFHLGH	<sup>446</sup> GPWFFHCHIEFHLMNGLAIVF
<b>LtL2QT6</b>	<sup>64</sup> HWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPI	<sup>104</sup> GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	<sup>394</sup> HPFHLGH	<sup>446</sup> GPWFLHCHIDFHLDAGFAVVM
<b>TtL2HRG</b>	<sup>64</sup> HWHGFFQKGTNWADGPAFVNQCPI	<sup>104</sup> GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPI	<sup>394</sup> HPFHLGH	<sup>444</sup> GPWFLHCHIDFHLEAGFAVVM

**b**

Proteína	Loops de unión del sustrato					
	Loop I	Loop II	Loop III	Loop IV		
<b>TvL1KYA</b>	<sup>154</sup> VAAK--LG--PA--FPLG	<sup>203</sup> LSCDPNY	<sup>261</sup> ANP-----NFGNVG----F	<sup>330</sup> FNFGTNTF--FI	<sup>384</sup> FPATAAAPGAP	<sup>454</sup> HIDFHLEAGF
<b>TvL1GYC</b>	<sup>154</sup> TAAK--LG--PR--FPLG	<sup>203</sup> LSCDPNY	<sup>261</sup> ANP-----NFGTVG----F	<sup>330</sup> FNFGTNTF--FI	<sup>384</sup> LPATALAPGAP	<sup>454</sup> HIDFHLEAGF
<b>R1G1V10</b>	<sup>154</sup> SLST--VLFNPNKAPPA	<sup>208</sup> TSCFPNY	<sup>266</sup> ANP-----SNGRNG----F	<sup>334</sup> IGRNATTADFTI	<sup>390</sup> IP-----GGGN	<sup>453</sup> HIDWHLEAGL
<b>CcL1A65</b>	<sup>154</sup> IPAP--SI-----QGAAQ	<sup>202</sup> LSCDPNW	<sup>260</sup> AQP-----NKGRNLAGTF	<sup>333</sup> LGFSGGRF--TI	<sup>397</sup> VP--AGVLGGP	<sup>453</sup> HIEFHLMNGL
<b>LtL2QT6</b>	<sup>154</sup> VAAK--LG--PR--FPKG	<sup>203</sup> LSCDPNY	<sup>261</sup> ANP-----NFGTTG----F	<sup>329</sup> FNFDGNTF--FI	<sup>383</sup> FPATTAAPGAP	<sup>453</sup> HIDFHLDAGF
<b>TtL2HRG</b>	<sup>154</sup> LAAK--VG--SP--VPT-A	<sup>202</sup> LSCDPNH	<sup>260</sup> ALP-----NSGTRN----F	<sup>329</sup> FGFAGGKF--TI	<sup>383</sup> LPATAAAGFP	<sup>454</sup> HIDFHLEAGF

Figura 5. Comparación de las secuencias de lacasas (a) y de loops de unión del sustrato (b) de las lacasas con estructura tridimensional disponible (Giardina y col., 2010).

Para ascomicetes la única estructura 3D que se ha reportado es la de *Melanocarpus albomyces*. Hakulinen y col. (2002), reportaron la estructura de la enzima nativa MaL

(MaL1GWO) y Hakulinen y col. (2008), reportaron la estructura de la enzima recombinante rMaL (rMaL2Q9O) que fue expresada en *Trichoderma reesei*. Se ha observado que la mayoría de las lacasas presentan una estructura molecular organizada en tres dominios, estructura que también se ha reportado en unas proteínas pequeñas de cobre tales como las azurinas y plastocianinas, que se les denomina MCOs, tal como las ascorbato oxidasa y ceruloplasmina de mamíferos (Giardina y col., 2010).

#### **1.2.4 Importancia industrial**

Las lacasas son biocatalizadores útiles para una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas, debido a su alta y no específica capacidad de oxidación y a que utiliza fácilmente el oxígeno molecular como aceptor de electrones. Se aplica eficientemente en la deslignificación de la pulpa y bi blanqueamiento en la industria de elaboración de papel (Bajpai, 1999), en el tratamiento de aguas residuales de plantas industriales (Durán y Esposito, 2000), para la modificación enzimática de fibras y decoloración en la industria de colorantes o textiles (Abadulla y col., 2000), en la remoción enzimática de compuestos fenólicos en bebidas y jugos de fruta procesados (Minussi y col., 2002), como biosensores y en la producción de biodiesel (Amir y col., 2009). Se utilizan también para la clarificación de vino (eliminación de compuestos fenólicos) y análisis de drogas (para distinguir morfina de codeína) (Mayer y Staples, 2000). Otra aplicación ambiental es en la biorremediación de suelos contaminados, ya que las lacasas tienen la capacidad de oxidar contaminantes orgánicos tóxicos como hidrocarburos policíclicos aromáticos y clorofenoles. Para esta aplicación, el suelo es inoculado con el hongo productor de las lacasas, debido a que utilizar la enzima aislada no es económicamente factible para la descontaminación de suelos a gran escala.

### **1.3 Fermentación**

Se ha definido fermentación como al cambio químico sufrido por ciertas sustancias orgánicas a causa de enzimas microbianas, generalmente con desprendimiento de gases. El término se deriva del verbo latino *fervere*, ebullición. La apariencia de ebullición se debe a la producción de burbujas de dióxido de carbono, causado por el catabolismo anaeróbico de los azúcares presentes en el extracto. Desde el punto de vista bioquímico, la fermentación es aquel conjunto de reacciones catabólicas productoras de ATP en las cuales moléculas orgánicas actúan como donadores primarios de electrones y como aceptores finales de los mismos (Lehninger, 1979).

La fermentación sólida (FMS) es un proceso microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida (Lonsane y col., 1985), matriz que tiene la propiedad de absorber o contener agua, con o sin nutrientes solubles. Los materiales sólidos pueden ser biodegradables (almidón, celulosa) o no biodegradables (poliuretano). El crecimiento de los microorganismos en FMS requiere que éstos crezcan sobre un soporte que difunda nutrientes, bajo una atmósfera gaseosa (Viniestra-González, 1997). Se pueden distinguir dos tipos de FMS, dependiendo de la naturaleza de la fase sólida utilizada: se puede utilizar una fase sólida constituida por un material que asuma, simultáneamente, la función de soporte y fuente de nutrientes (este material es generalmente de naturaleza amilácea y lignocelulósica) o un soporte inerte que sirva como reservorio para una solución nutritiva. La capacidad de retención de agua es de primordial importancia en la selección de un soporte de este último tipo. La FMS ha sido usada desde la antigüedad para la preparación de alimentos fermentados, ensilajes y compostaje.

Ambos sistemas de cultivo son utilizados para aplicaciones industriales como:

1. Producción de micelio de hongos comestibles y de hongos utilizados como agentes saborizantes aromáticos naturales (Lomascolo y col., 1999).
2. Producción de alimentos fermentados por hongos (Mukhopadhyay y col., 2005).

3. Producción de semilla para el cultivo de cuerpos fructíferos (Kananen y col., 2000)
4. Producción de químicos especializados incluyendo polisacáridos solubles en agua (Ooi y Liu, 1999), vitaminas, enzimas (Rogalski y col., 2006), ácidos orgánicos (Wang y McNeil, 1995).
5. Producción de compuestos terapéuticos tales como antibióticos, agentes anticancerígenos (Daba y Ezeronye, 2003), agentes antifúngicos (Liu y Wang, 2007)
6. Procesos con el objetivo de reciclar desechos industriales y agroindustriales (Elissetche y col., 2006; Revankar y Lele, 2007).

Por otro lado, la fermentación sumergida o líquida (FML) involucra el crecimiento de microorganismos en un medio líquido rico en nutrientes y con una alta concentración de oxígeno (condiciones aeróbicas). La producción industrial de enzimas se realiza principalmente en FML. El modelo de crecimiento en cultivo líquido usualmente da como resultado un crecimiento descontrolado del micelio, por lo que la extensión de la biomasa tiene un fuerte efecto sobre la transferencia de masa, el metabolismo y la secreción del producto.

La FMS ha tenido mayor interés para la investigación desde que varios estudios han mostrado mayor producción de producto por este sistema (Tabla 4); particularmente ha mostrado ser un medio muy adecuado para la producción de enzimas por hongos filamentosos, ya que reproduce las condiciones bajo las cuales estos hongos crecen en la naturaleza (Pandey y col., 2000).

**Tabla 4: Características de FML y FMS.**

<b>FML</b>	<b>FMS</b>
Esterilización por calor y control aséptico	Tratamiento por vapor, condiciones no estériles
Altos volúmenes de agua consumidos y desechados a efluentes	Baja demanda de agua
Fácil control de temperatura	Baja capacidad de transferencia de calor
Presenta represión catabólica	Represión catabólica significativamente baja o no la presenta
Utilización de sustratos solubles	Utilización de soportes inertes o sustratos insolubles, Reciclamiento de desechos agroindustrial
Fácil homogeneización	Condición estática
Modificación del ambiente de los organismos	Simulación del ambiente natural
Alto consumo de energía	Bajo consumo de energía
Gran volumen y alto costo de tecnología	Bajo volumen y bajo costo de tecnología
Concentración con respecto a sustrato/producto de 30-80 g/L	Concentración con respecto a sustrato/producto de 100-300 g/L
Los medios no requieren un pre-tratamiento	Los sustratos requieren pre-tratamiento (hidratación, tamaño de partícula, lavados para eliminar residuos)
Determinación y obtención de biomasa sencillos	Determinación y obtención de biomasa difíciles

(Pandey y col., 2000).

## 2. ANTECEDENTES

Varios trabajos han sostenido la hipótesis de que las familias de lacasas pueden tener diferentes papeles en el ciclo de vida del organismo (Solé y col., 2008). Por ejemplo, la transcripción de los genes *lcc1* y *lcc2* en *Trametes* sp y el basidiomicete I-62 son inducible en las diferentes etapas de crecimiento: *lcc1* es expresado en los estados iniciales de crecimiento y *lcc2* sólo en la fase estacionaria (Mansur y col., 1998). En *A. bisporus* y *Lentinula edodes* incubados sobre medio sólido, la expresión de lacasas se encontró principalmente durante el estado de colonización y disminuyó durante la fructificación (Ohga y col., 1999; Ohga y Royse, 2001). Este perfil de expresión concuerda con la participación de la actividad de lacasas en la bioconversión de la lignina, que es necesaria en las primeras etapas para la colonización del sustrato.

El estudio de las lacasas se ha realizado en muchos organismos, determinándose las isoformas expresadas y sus propiedades fisicoquímicas, y caracterizándose cada una de las isoenzimas encontradas para posteriormente ser utilizadas en procesos de biorremediación. Las lacasas son producidas por diferentes hongos y son secretadas en múltiples isoformas, dependiendo de la especie de hongo y de las condiciones de desarrollo en que se encuentre (Giardina y col., 1999). Se ha determinado el peso molecular mediante SDS-PAGE, y la diferencia entre lo previsto por la secuencia del péptido y el valor experimental (típicamente del 10-30% del total del peso molecular) es debida a la glicosilación, implicada en la protección contra la proteólisis (Galhaup y col., 2002). Saloheimo y col. (1991) reportaron una isoforma de lacasa de *Phlebia radiata* con una masa molecular aparente de 64 kDa (estimada por SDS-PAGE). Heinzkill y col. (1998), reportaron varias lacasas de hongos de la familia Coprinaceae: la de *Polyborus pinsitus* presentó una masa molecular de 66 kDa y la masa molecular de las lacasas de *Panaeolus sphinctrinus*, *Panaeolus papilionaceus* y *Coprinus friesii* fue de 60 kDa, con un punto isoeléctrico (pI) de alrededor de 3.5. Fukushima y Kirk (1995) encontraron dos isoformas de lacasa en *Ceriporiopsis subvermispora*, con masas moleculares de 71 y 68 kDa, pI de 3.4 y 4.8 y actividad en un rango de pH de 3 a 4 y de 3 a 6, respectivamente. *Trametes pubescens* secreta varias isoformas de

lacasas, pero Galhaup y col. (2002) sólo caracterizaron una, la cual presentó una masa molecular de 65 kDa (Tabla 5). Chefetz y col. (1998) reportaron una lacasa en *Chaetomium thermophilum* que presentó un masa molecular de 77 kDa y un pl de 5.1. La enzima fue estable a un pH de 5-10 y durante una hora a una temperatura de 70 °C. En *Monocillium indicum* se reportó una lacasa de peso molecular 100 kDa, en *Aspergillus nidulans* de 110 kDa y en *Agaricus bisporus* de 100 kDa (Thurston, 1994). En *Lentinula edodes* (shiitake, segundo hongo comestible más importante a nivel mundial; Sánchez, 2004), Kofujita y col. (1991) reportaron una lacasa con una masa molecular de 66 kDa. Posteriormente, Nagai y col. (2002) aislaron una lacasa con una masa molecular de 72.2 kDa, un pl de 3 y una temperatura óptima de 40 °C.

En *Pleurotus ostreatus* se han realizado varios trabajos con la finalidad de aislar y purificar las isoformas de lacasas. La masa molecular de POXA2 fue de 67 kDa, un pl de 4; esta isoforma mostró baja estabilidad a la temperatura (25-35 °C) y presentó cuatro átomos de cobre por molécula (Palmieri y col., 1997). Giardina y col. (1999) purificaron otra isoforma de lacasa en un cultivo suplementado con sulfato de cobre, denominada POXA1b, con una masa molecular de 62 kDa, un pl de 6.9 y cuatro átomos de cobre por molécula; además mostró un alta estabilidad al pH alcalino. Hublik y Schinner (2000) purificaron otra isoforma de *P. ostreatus* (cepa RK 36) en un cultivo en presencia de ácido ferúlico; esta isoforma presentó una masa molecular de 67 kDa, un pl de 3.6 y una temperatura óptima de 50 °C. Palmieri y col. (2003), encontraron otras dos isoformas de lacasa en un cultivo suplementado con cobre, denominadas POXA3a y POXA3b (Tabla 5). Ambas isoenzimas están constituidas por una subunidad grande de 67 kDa y una subunidad pequeña de 18 ó 16 kDa (esta heterogeneidad es debida la presencia o ausencia de una parte glicosídica), con un pl de 4.1 y 4.3, respectivamente. Tlecuítl-Beristain y col. (2008) purificaron una isoforma de lacasa de la cepa ATCC-32783 con una masa molecular de aproximadamente 43.7 kDa y un pl de 2.27, con un rango amplio de actividad a diferentes valores de pH (2 a 8) y temperatura (20-60 °C). Se ha reportado que este hongo carece de lignina peroxidasa, indicando que probablemente la presencia de varias isoformas de lacasas

se debe a que son las involucradas en la biodegradación de la lignina y que cada una de esas lacasas tiene un papel importante (Gochev y Krastanov, 2007).

Muchas de las lacasas anteriormente mencionadas se les conocen como lacasas azules, debido a la coloración que les confiere la presencia de los cuatro átomos de cobre. Sin embargo se han reportado lacasas amarillas, cuyo nombre deriva de que no presentan los cuatro átomos de cobre. Se han purificado en *Gaeumannomyces graminis* que es un ascomicete fitopatógeno (Edens y col., 1999), en *Agaricus bisporus* D621 (Wood., 1980), *Schizophyllum commune* (Vries y col., 1986), *Panus tigrinus*, *Phlebia radiata* (Leontievsky y col., 1997a), *Phellinus ribis* (Min y col., 2001) y *P. ostreatus* D1 (Pozdnyakova y col., 2004; Pozdnyakova y col., 2006). Las lacasas amarillas de *Panus tigrinus* y *Pleurotus ostreatus* D1 tienen la capacidad de oxidar sustratos no fenólicos aromáticos en la ausencia de mediadores exógenos, debido a que contienen uno endógeno natural, contrario a lo que ocurre con las lacasas azules (Leontievsky col., 1997b; Pozdnyakova y col., 2004; Pozdnyakova y col., 2006). Se ha sugerido que las lacasas amarillas son el resultado de la unión de los productos aromáticos generados por la degradación de las lacasas azules sobre sustratos que contienen lignina durante el crecimiento del hongo en condiciones de fermentación sólida. Una consecuencia de esta modificación puede ser la reducción de los átomos Cu1 y Cu2 en el sitio activo de la enzima y, en consecuencia, la pérdida del color azul (Leontievsky y col., 1997a). Aparentemente, la molécula modificada unida a la apoenzima de la lacasa amarilla realiza la función de mediador en la reacción con sustratos no fenólicos (Giardina y col., 2010).

Otro tipo de lacasas que han sido reportadas en *Pleurotus ostreatus* son las denominadas lacasas blancas (Palmieri y col., 1997). La isoenzima POXA1w es una enzima neutra que muestra alta estabilidad a pH y temperatura. Esta lacasa contiene un átomo de cobre, dos de zinc y uno de hierro por molécula de proteína. También se han purificado lacasas blancas en *Pycnoporus sanguineus* (Litthauer y col., 2007), de *Trametes hirsuta* (Haibo y col., 2009) y *Phlebia radiata* BP-11-2 (Kaneko y col., 2009). Estas lacasas oxidan el colorante alizarina rojo S, que es un hidroxipoliaromático, y el

colorante rojo de metilo (compuesto no fenólico) en ausencia de mediador. Nakamura y Go (2005) propusieron que el Cu1 puede ser reemplazado con Fe/Mn (perdiendo la coloración azul) y que el Cu3 puede ser reemplazado con zinc, permaneciendo sólo el cobre en el Cu2. Sin embargo falta conocer más al respecto de ambos tipos de enzimas.

La expresión de los genes de lacasa depende de las condiciones del cultivo, habiendo sido reportado como un sistema regulado diferencialmente. La síntesis y secreción de las lacasas están influenciadas por los niveles nutrimentales, condiciones de cultivo y por la adición de inductores (Faraco y col., 2003). Como ejemplo, el alto contenido de nitrógeno en el medio induce la transcripción de los genes de lacasas en el basidiomiceto I-62 (CECT 20197) (Mansur y col., 1998) y en *Pleurotus sajor-caju* (Soden y Dobson, 2001). Al agregar cobre u otro ion como  $Mg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  o  $Hg^{2+}$  también se puede estimular la expresión de genes de lacasa (Scheel y col., 2000; Soden y Dobson, 2001; Galhaup y col., 2002). Ciertos compuestos aromáticos con estructura relacionada con la de los precursores de lignina (como 2,5-xilidina o ácido ferúlico, por ejemplo) también incrementan la transcripción en *Trametes villosa*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus sajor-caju* (Yaver y Golightly, 1996; Collins y Dobson, 1997; Soden y Dobson, 2001). Por otra lado, *Trametes villosa* y *Pleurotus sajor-caju* presentan genes de lacasa de expresión constitutiva, lo que puede relacionarse con las diferentes funciones fisiológicas de cada lacasa en los diferentes hongos (Yaver y Golightly, 1996; Soden y Dobson, 2001). En *Pleurotus sajor-caju* se reportó que algunas de las lacasas que produce están inducidas a nivel de transcripción por los niveles de la fuente de nitrógeno: las isoenzimas *lac2* y *lac4* son reguladas positivamente por el nitrógeno, mientras que la *lac1* y *lac3* no se vieron afectadas (Soden y Dobson, 2001).

Se ha sugerido que la inducción de los genes de lacasas por iones metálicos y compuestos fenólicos es resultado de la presencia de sitios específicos de regulación en la región promotora de dichos genes. La región regulatoria rio arriba de varios de los genes de lacasas contiene elementos de respuesta a metales (MRE), que también

se han encontrado en la región promotora de las metalotioneínas, proteínas involucradas en la homeostasis y detoxificación de Zn y Cu en ciertos mamíferos (Karahanian y col., 1998; Mansur y col., 1998; Giardina y col., 1999; Galhaup y col., 2002; Faraco y col., 2003). Además, en las regiones promotoras de los genes de lacasas se han encontrado posibles elementos de choque térmico (HSE), elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) y elementos de respuesta a antioxidantes (ARE) (Saloheimo y col., 1991; Fernández-Larrea y Stahl, 1996; Giardina y col., 1999; Soden y Dobson, 2001; Galhaup y col., 2002).

El número de copias de los genes de lacasa es variable en los hongos y su cuantificación precisa es complicada, por la existencia de diferentes alelos de los genes en el genoma, al ser diploides la mayoría de los hongos estudiados (Egger y col., 1998).

Muchos genomas de hongos contienen más de un gen de lacasas: *Trametes villosa*, por ejemplo, contiene de dos a cinco genes, localizados en el mismo cromosoma (Yaver y Golightly, 1996). En el hongo patógeno *Rhizoctonia solani* hay tres genes de lacasas, que agrupan en un cluster de aproximadamente 11 kb (Wahleithner y col., 1996). *Coprinus cinereus* posee ocho genes de laccasas (Yaver y col., 1999). En *Pleurotus erygii* se han reportado dos y para *Pleurotus ostreatus* siete (Tabla 5) (Giardina y col., 1995, 1996 y 1999; Palmieri y col., 1993, 1997 y 2003). La caracterización de la familia de genes de lacasas se podría mejorar si se dispusiera de la secuencia de los genomas de los hongos, algo que aún no está disponible en muchos de los casos. Un análisis reciente del genoma de *Pleurotus ostreatus* ha mostrado que hay aun genes de lacasas sin caracterizar, y se ha propuesto que puede haber aproximadamente 12 de estos genes (Giardina y col., 2010). Por otra parte, Pezzella y col. (2009), reportaron que en un fragmento genómico de 150 kpb encontraron siete genes de lacasas en *Pleurotus ostreatus*. Una posible explicación de la presencia de diferentes isoformas en el genoma de un determinado organismo sería la existencia de diferentes funciones fisiológicas para cada una de ellas durante el ciclo de vida de los hongos.

**Tabla 5. Proteínas y Genes reportados para lacasas.**

Nombre	Gen		Proteína que codifica para el gen			
	Nombre	EMBL No Acc.	Longitud (aa)	PM <sup>+</sup> (kDa)	pl	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>cotA</i>	U51115	513	65	7.7	Martins y col., 2002
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	<i>lcs-1</i>	AY219235	519	79	3.6	Salas y col., 1995; Karahanian y col., 1998
<i>Coprinus cinereus</i>	<i>lcc1</i>	AF118267	539	63	3.7-4.0	Yaver y col., 1999; Schneider y col., 1999
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>CNLAC1</i>	L22866	624	75	n.d.*	Williamson, 1994
<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>	<i>LAC2</i>	AJ417686	577	70	5.6	Edens y col., 1999; Litvintseva y Henson, 2002
<i>Marasmius quercophilus</i> (Basidiomycete C30)	<i>lac1</i>	AF162785	517	62	3.6	Dedeyan y col., 2000
<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>lcc1</i>	AR023901	619	80	4.2	Berka y col., 1997
<i>Neurospora crassa</i>	2 alelos	M18333-4	619	64	6.8	Germann y col., 1988
<i>Phlebia radiata</i>	<i>lac1</i>	X52134	548	64	3.5	Niku-Paavola y col., 1990; Saloheimo y col., 1991
Basidiomycete PM1 (CECT 2971)	<i>lac1</i>	Z12156	517	64	3.6	Coll y col., 1993
<i>Podospora anserina</i>	<i>lac2</i>	Y08827	621	70	7-10	Fernández-Larrea y Stahl, 1996
<i>Populus euramericana</i>	<i>lac90</i>	Y13772	574	90	9.2	Ranocha y col., 1999
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>lcc4</i>	Z54277	530	66	7.5	Wahleithner y col., 1996
<i>Streptomyces lavendulae</i>		AB092576	631	73	n.d.*	Suzuki y col., 2003
<i>Trametes pubescens</i>	<i>lap2</i>	AF414807	523	65	2.6	Galhaup y col., 2002
<i>Trametes trogii</i>	<i>lcc1</i>	Y18012	496	70	3.3-3.6	Garzillo y col., 1998
<i>Trametes versicolor</i>	<i>lcc1</i>	L49376	519	67	n.d.*	Bourbonnais y col., 1995; Ong y col., 1997
<i>Trametes versicolor</i>	<i>lcc2</i>	U44430	520	64	3.1-3.3	Cassland y Jönsson, 1999
<i>Trametes villosa</i>	<i>lcc1</i>	L49377	520	63	3.5	Yaver y col., 1996
<i>Trametes villosa</i>	<i>lcc2</i>	AY249052	519	63	6.2-6.8	Yaver y col., 1996
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>POXA1b</i>	AJ005017	533	62	6.9	Giardina y col., 1999
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>POXC</i> <i>POX2</i>	Z49075	533	59	3.3	Palmieri y col., 1993; Giardina y col., 1996
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>POX1</i>	Z34847.1	529	67	4.7	Giardina y col., 1995
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>POXA1</i> <i>POXA1w</i>			61	6.7	Palmieri y col., 1997
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>POXA2</i>			67	4.0	Palmieri y col., 1997
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>POXA3a</i>	AJ344434	522	67+18	4.1	Palmieri y col., 2003
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>POXA3b</i>	AJ344434	522	67+16	4.3	Palmieri y col., 2003
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>LACC12</i>			55 kDa		Lettera y col., 2010

\* n.d., No determinado. + Peso molecular determinado por SDS-PAGE.

Un gen típico de lacasa presenta aproximadamente 500-600 aminoácidos y su región codificante normalmente contiene 8-13 intrones, de aproximadamente 50-90 pb de extensión (Galhaup y col., 2002). Sin embargo, hay algunos genes de lacasas que tienen sólo un intrón, como ocurre en *Neurospora crassa* (Germann y col., 1998). En el otro extremo, en el gen para la isoforma POX1 y POX2 de *Pleurotus ostreatus* se han encontrado aproximadamente 19 intrones (Giardina y col., 1995; Giardina y col., 1996). La presencia de un número variable de intrones se ha considerado como un indicador de la distancia evolutiva entre hongos basidiomicetos y ascomicetos.

El nivel de identidad de los aminoácidos entre las lacasas del mismo grupo generalmente varía poco, Moussa (2009) reporta similitud de un 97 y 93 % entre una lacasa de *P. ostreatus* con otras de la bases de datos (NCBI). Mientras que la identidad entre lacasas de diferentes grupos está por debajo del 40%. Los genes de las lacasas yA y tilA del ascomiceto *Aspergillus nidulans* difieren significativamente de otras secuencias de proteínas de lacasas (Aramayo y Timberlake, 1990; Scherer y Fischer, 2001), puesto que el nivel de identidad de los aminoácidos fue del 30%. Las lacasas de las bacterias *Bacillus subtilis* (Martins y col., 2002) y *Streptomyces lavendulae* (Suzuki y col., 2003) presentaron un 47% de similitud entre sí, pero difieren mucho de las otras lacasas. Se han realizado alineamientos de genes de lacasas que han sido caracterizados, como *Trametes versicolor* (Hunolstein y col., 1986), *Aspergillus nidulans* (Aramayo y Timberlake, 1990), *Coriolus hirsutus* y *Phlebia radiata* (Saloheimo y col., 1991), *Trametes villosa* y *Neurospora crassa* (Germann y col., 1998) y se ha observado que presentan un alto grado de identidad (Faraco y col., 2003).

Se ha encontrado que una cisteína y diez histidinas están involucradas en la unión de los cuatro átomos de cobre encontrados en la mayoría de las moléculas de lacasas, aminoácidos que se conservan alrededor de las cuatro regiones en las cuales el cobre se encuentra agrupado (Thurston, 1994). En *P. ostreatus* se ha reportado una isoforma que es un heterodímero, la POXA3. Su subunidad grande está claramente conservada, con respecto a las otras lacasas fúngicas conocidas, en las zonas

consenso involucradas en la unión del cobre, aunque muestra algunas diferencias, como que el aminoácido Asp<sup>206</sup> está sustituido por un residuo de Arg, como también ocurre en las lacasas Lac2 de *A. bisporus*. Hoegger y col. (2003), realizaron un análisis filogenético de las lacasas de *P. ostreatus* y *A. bisporus*, observándose que el heterodímero POXA3 y Lac2 se encuentran en el mismo cluster, en contraste con todas las demás isoformas reportadas en *P. ostreatus* (Pezzella y col., 2009). La subunidad pequeña de POXA3 no muestra similitud significativa con ninguna secuencia del banco de datos, y su posible función podría ser la estabilización del heterodímero (Faraco y col., 2008).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Las lacasas son un grupo de enzimas con una regulación diferencial y hasta el momento no se han logrado secuenciar todos los genes que codifican para lacasas en *Pleurotus ostreatus*. Por otro lado, estas enzimas tienen amplia aplicación en diferentes áreas de la biotecnología, como la biorremediación y la industria de alimentos, entre otros, por lo que la caracterización de un gen para una isoforma de lacasa que se ha mostrado como predominante y con buenas características fisicoquímicas durante la fermentación líquida, contribuirá al conocimiento científico general de *Pleurotus ostreatus* y, en específico, de los mecanismos de regulación que presenta esta isoenzima, así como a tratar de entender su función fisiológica. Poder disponer del gen clonado permitirá, asimismo, estudiar posibles mecanismos de mejora, basados en la ingeniería genética, para la producción de la lacasa.

### **4. HIPÓTESIS**

Una isoenzima producida mayoritariamente en cultivo líquido es diferente a las ya reportadas para *Pleurotus ostreatus*. La caracterización del gen codificante de dicha enzima confirmará la novedad de la misma.

## **5. OBJETIVOS**

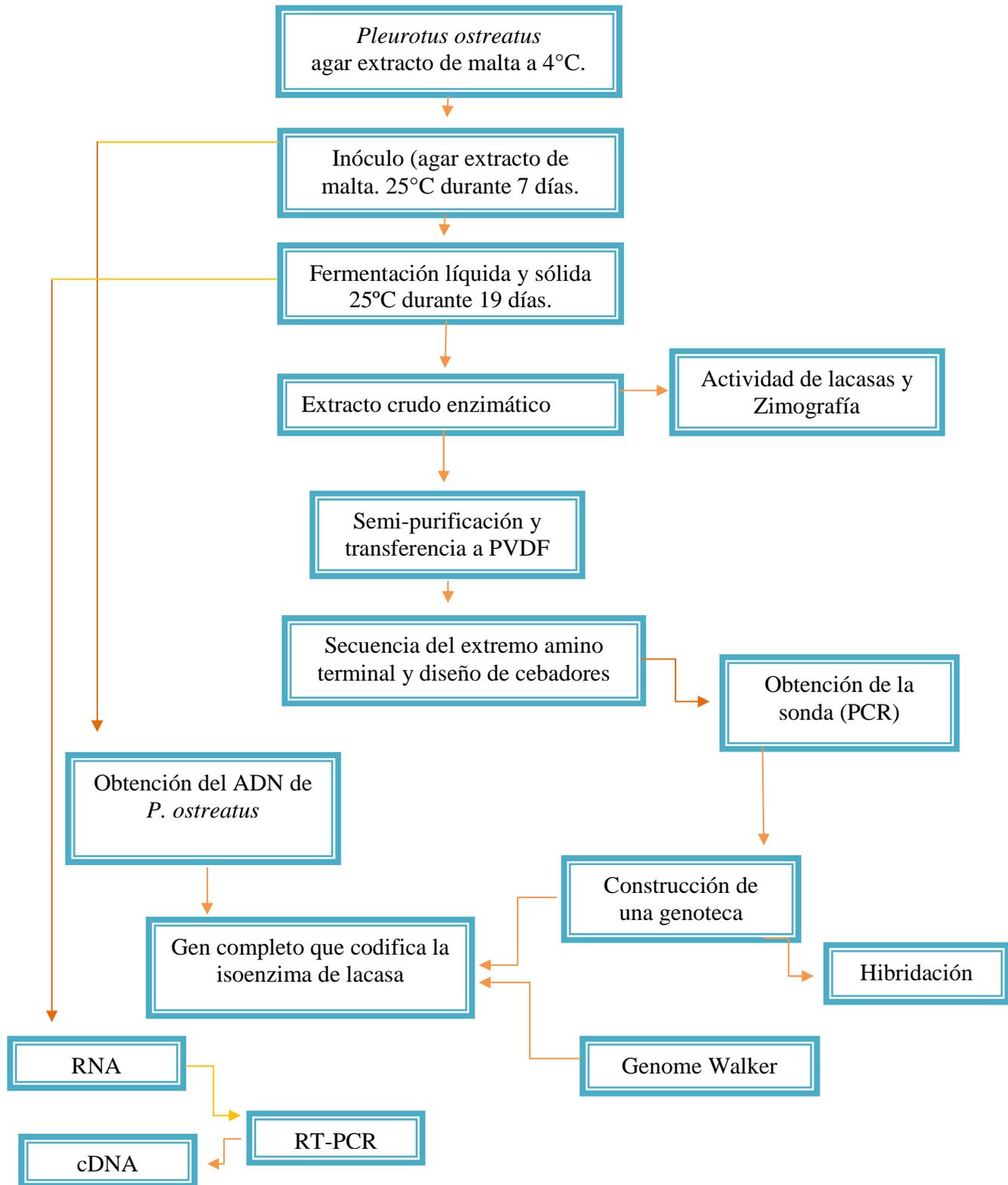
### **5.1. General:**

Identificar y analizar la secuencia de un gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus* (ATCC 32783) expresada en cultivo líquido

### **5.2. Particulares:**

- a) Establecer condiciones de producción de la isoforma de lacasa
- b) Semi-purificación de la isoenzima de *P. ostreatus*
- c) Secuenciación del extremo amino terminal de la isoenzima
- d) Diseño de cebadores y obtención de la sonda para lacasa
- e) Obtención y caracterización del gen de la isoforma de lacasa

## 6. METODOLOGÍA



## 6.1. Selección y producción de la isoforma de lacasa

### 6.1.1. Microorganismos de estudio.

Se utilizó la cepa *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783 (American Type Culture Collection, Manassas, U.S.A). El inóculo se desarrolló sobre agar dextrosa-papa, a una temperatura de 25 °C durante siete días, almacenándose a 4 °C y resemebrándose cada mes.

### 6.1.2. Fermentación

El pH del medio de cultivo utilizado (Tabla 6) se ajustó a 6.0. Tanto la FML como la FMS se realizaron en matraces de 250 mL, incubados a 25 °C con agitación de 120 rpm. Para la FMS se utilizó 0.5 g de espuma de poliuretano (PUF) de baja densidad (17 kg/m<sup>3</sup>) cortada en cubos (0.5 cm de altura × 0.5 cm de anchura × 0.5 cm de profundidad) como soporte inerte, previamente lavados y esterilizados (Díaz-Godínez y col., 2001). Cada matraz contuvo 30 mL del medio de cultivo y se inoculó con tres fragmentos de micelio, de 4 mm de diámetro, tomados de la periferia de una colonia de *P. ostreatus*.

**Tabla 6. Composición del medio para la fermentación.**

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	5
Glucosa	10
Fosfato de potasio monobásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.4
Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0.001
Fosfato de potasio dibásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.6
Sulfato de hierro FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.05
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O)	0.05
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0.5
Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O)	0.25

(Téllez-Téllez y col., 2008)

### **6.1.3. Obtención del extracto enzimático y evaluación de la biomasa**

En ambas fermentaciones se obtuvo el extracto crudo enzimático (ECE) a las 72 h de cultivo, y posteriormente cada 24 h. En la FML, el ECE se obtuvo por filtrado y retención de la biomasa a través de papel de filtro Whatman No. 4. La biomasa retenida sobre el papel Whatman se secó hasta peso constante para su cuantificación. El ECE de la FMS se obtuvo por prensado de la PUF a través de una jeringa de 50 mL. El PUF se lavó 3 veces y se secó para cuantificar la biomasa por diferencia de peso seco (Zhu y col., 1996; Díaz-Godínez y col., 2001). En todos los casos, el ECE se filtró a través de membranas Millipore (0.45  $\mu\text{m}$ ). El pH de los ECE se midió por potenciometría.

Las curvas de crecimiento fueron establecidas por la ecuación logística:

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

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

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

donde,  $C = (X_{\max} - X_0)/X_0$ ; cuando  $X = X_0$  es el valor inicial de la biomasa.

La estimación de los parámetros cinéticos de las ecuaciones previas fue hecha mediante un procedimiento de minimización de las sumas de los errores usando el programa llamado "Solver", presente en la hoja electrónica de Excel (Microsoft) (Díaz-Godínez y col., 2001; Viniegra-González y col., 2003).

### **6.1.4 Determinación de la actividad de lacasas**

La actividad de lacasas se determinó en cada ECE, utilizando como sustrato 2,6-dimetoxifenol (DMP). La mezcla de reacción se realizó con 950  $\mu\text{L}$  de DMP 2 mM, en

buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5, y 50  $\mu$ L de ECE. La actividad se determinó por incremento en la absorbancia a 468 nm de la mezcla de reacción, en una celda Peltier a 40  $^{\circ}$ C durante un minuto. Una unidad de actividad (U) de lacasa se consideró como la cantidad de enzima que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en la mezcla de reacción. Se sugiere que el grupo fenol es oxidado por la lacasa, formando una semiquinona lo que provoca la coloración, también, los dos grupos metoxi pueden ser oxidados, lo cual permite que se lleve a cabo la polimerización.

#### **6.1.5. Zimografía y geles de electroforesis**

En el ECE y en cada paso de purificación se realizaron zimogramas; El gel de separación contenía 100 g/L de acrilamida y 27 g bis-acrilamida/L. El gel de empaquetamiento contenía 40 g/L de acrilamida y 27 g bis-acrilamida/L. 30  $\mu$ L de extracto se mezcló con buffer de muestra sin un agente de la reducción de los enlaces disulfuro y sin tratamiento de calor, las muestras se colocaron en geles (espesor de 1,5 mm) en el sistema de electroforesis de Mini-Protean III (BioRad) y se aplicó 150 V por 1-1.25 h. Después de la electroforesis, los geles se lavaron con agua desionizada en un agitador orbital (20-30 rpm) durante 5-6 horas, el agua se cambia cada hora para eliminar SDS. Por último, los geles fueron incubados a temperatura ambiente en una solución de DMP. La actividad oxidativa de lacasas apareció como zonas oscuras en los geles (Téllez-Téllez y col., 2005) y geles de electroforesis por la técnica de SDS-PAGE (Laemmli, 1970). En ambas técnicas se usaron marcadores de peso molecular conocido.

#### **6.1.5. Determinación de la actividad de proteasas**

La actividad de proteasas se determinó en el ECE por la cuantificación por el cambio en la absorbancia a 280 nm, producida por la liberación de aminoácidos aromáticos en

la mezcla de reacción (450  $\mu$ L caseína al 1% en buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 6.0 y 50  $\mu$ L de ECE), incubada a 35  $^{\circ}$ C durante 15 min (Kunitz, 1947). Una unidad de actividad de proteasas es la cantidad de enzima que libera aminoácidos aromáticos provocando un cambio de 1.0 unidad en la absorbancia por min de incubación.

#### **6.1.6. Determinación de la concentración de proteína soluble**

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

#### **6.1.7. Determinación del contenido de azúcares**

Se cuantificó la cantidad azúcares reductores por medio del reactivo DNS (ácido dinitro-salicílico), a 50  $\mu$ l de ECE y 950  $\mu$ l de agua destilada se le agregó 2 ml del reactivo DNS (hidróxido de sodio 1%, Sulfito de sodio 0.05%, Fenol 0.2% y DNS 1%). Se calentó a temperatura de ebullición por 5 min y después de enfriarse se leyó la absorbancia a 575 nm (Miller, 1959). Se preparó una curva de calibración con glucosa.

#### **6.2. Purificación de la isoforma de lacasa**

De las 4 isoenzimas de lacasas reportadas para *P. ostreatus* bajo estas condiciones (Tlecuitl-Beristain y col., 2008), la que presentó una velocidad mayor de migración

sobre el zimograma de las muestras procedentes de FML también mostró mayor actividad y estabilidad, además de ser una isoenzima que se presentó también cuando el hongo se desarrolló sobre agar sin adición de Cu (Téllez-Téllez y col., 2005). Por ello, se decidió trabajar con esta isoenzima. En el proceso de purificación se utilizó una columna EconoPac de intercambio aniónico (BioRad) y una columna BioQ de intercambio aniónico (BioRad), ambas columnas conectadas al equipo Biologic System LP (BioRad). Posteriormente se concentró con filtros Centricon YM-10 (Millipore).

### **6.2.1. Inmovilización de la lacasa en membranas de difluoruro de polivinilideno**

Una vez realizada la separación electroforética (SDS-PAGE) y visualizadas las bandas de interés, se inmovilizaron las proteínas en una membrana de difluoruro de polivinilideno (Sequi-Blot PVDF Membrane for Protein Sequencing; Bio-Rad Laboratorios, Hércules, California). Se realizó la transferencia de las proteínas de un gel de poliacrilamida a la membrana PVDF con el equipo de electrotransferencia (BioRad Laboratorios, Hércules, California). Se tiñó la membrana con azul de Coomassie (Azul de Coomassie R-250 al 0.025 % en metanol al 40 %). La membrana se mantuvo a 4 °C hasta su utilización.

### **6.2.2. Secuenciación de la lacasa**

Una vez realizada la transferencia a la membrana PVDF, se cortó la banda de interés y se colocó directamente en el secuenciador automático de proteínas Procise 491 Protein Sequencing System (Applied Biosystems, Inc, Foster City, California) mediante el método Edman. Se utilizó el cartucho especial para muestras transferidas a membrana de PVDF (Blot cartridge) y se empleó el método Pulse-liquid Blot.

### **6.3. Obtención de la sonda del gen de lacasa**

#### **6.3.1. Diseño de cebadores**

El cebador (LMF) se diseñó con la secuencia obtenida a partir de la banda de proteína (extremo amino terminal) y el segundo cebador (LMR) se diseñó a partir de sitios conservados en la secuencia de estas enzimas, obtenidas de la base datos GenBank (NCBI). Los oligonucleótidos se diseñaron de manera que tuvieran temperaturas de fusión similares, o que la diferencia entre ellas no fuera superior a 3 °C. Los oligonucleótidos no deben presentar homología intra-oligonucleótido en más de 3 pares de bases, porque de lo contrario podrían formar estructuras parciales de doble cadena que interferirán con la hibridación al molde. La composición de bases de los oligonucleótidos debe estar, de preferencia, entre el 45% y el 55% en su contenido de nucleótidos de guanina y citosina.

#### **6.3.2. Obtención de la sonda**

Las dos cadenas del ADN molde se separaron mediante la incubación a una temperatura elevada (94 °C), y al bajar la temperatura (60 °C) se llevó a cabo la hibridación de los cebadores. Finalmente, la elongación a partir de los cebadores se realizó a la temperatura de 72 °C, por acción de una ADN polimerasa (Mullis y Faloona, 1987). La obtención de la sonda por PCR se realizó con la composición de la mezcla de reacción presentada en la Tabla 7. El fragmento obtenido de la amplificación por PCR se analizó por electroforesis (Maniatis y col., 1982; Sambrook y col., 1989). El ADN se cargó en el gel y la electroforesis se desarrolló en buffer mediante la aplicación de una diferencia de potencial. La tinción se realizó con bromuro de etidio (500 µg/L de Bromuro de etidio). Los geles se fotografiaron sobre un transiluminador Gel Doc 2000 (BioRad) y la banda amplificada se purificó mediante el kit SV gel and PCR Clean-Up System (Cat # A9281, Promega) y se secuenció para corroborar que se trataba de una parte del gen que codifica para una lacasa, considerándose como la sonda para localizar el gen completo.

**Tabla 7. Mezcla y condiciones de reacción de PCR.**

Componente	Volumen (µL)	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
H <sub>2</sub> O (Biología Molecular)	27.5	1	94	3
Buffer 10X	5.0	2	94	0.5
dNTP's 10 mM	2.0	3	60	1
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3.0	4	72	0.5
PrimerF 10 mM	2.0	5	repetir 2	30 ciclos
PrimerR 10 mM	2.0		72	10
DNA	1.0			
Taq Polimerasa	0.5			
Volumen Total	50			

#### **6.4 Hibridación y localización del gen completo de la isoenzima seleccionada**

La biblioteca genómica se construyó con el ADN de *P. ostreatus*, de tal forma que se pudiera identificar un clon positivo de fago DASH II que contuviera el gen de interés. La presencia del gen completo se aseguró con el tamaño del inserto, ampliamente superior al del gen teórico.

##### **6.4.1. Obtención del ADN de *P. ostreatus***

Se inoculó la cepa de *P. ostreatus* (ATCC-32783) en medio líquido (Tabla 8) y se incubó a 25 °C. Se recogió el micelio por filtración y se liofilizó, la extracción se realizó mediante el método descrito por Specht y col. (1982).

**Tabla 8. Composición del medio de crecimiento para extracción del ADN.**

Compuesto	Concentración (g/L)
Glucosa	40
NaNO <sub>3</sub>	3
Extracto de levadura	2
Cloruro potasio (KCl)	0.5
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0.5
Sulfato de hierro (FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	0.01
pH 6.0.	

## **6.4.2 Construcción de la biblioteca genómica**

Se obtuvo una colección de clonas que contuvieran los fragmentos de ADN de *P. ostreatus*, lo que permitió la localización del gen que codifica para las lacasas.

### **6.4.2.1 Digestiones parciales**

El ADN fue digerido con *Sau3AI* (enzima de corte frecuente, con sitio de corte GATC), la cual genera fragmentos de ADN con extremos compatibles con los originados por la endonucleasa *BamHI*. La digestión se puede controlar mediante la limitación del periodo de incubación o la disminución secuencial de la cantidad de enzima presente en la digestión, así se consiguen digestiones parciales de ADN, apareciendo fracciones enriquecidas en tamaños concretos. El objetivo era obtener fragmentos que permitieran asegurar encontrar el gen completo de lacasas incluido en algunos de ellos. Las digestiones parciales se realizaron modificando la concentración de la enzima. La mezcla de reacción para cada uno de los tubos fue de 16.8  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{L}$  de Buffer 10X, 1  $\mu\text{L}$  ( $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de ADN y 0.2  $\mu\text{L}$  (10 U/ $\mu\text{L}$ ) de *Sau3AI* (diluciones). Se incubaron a 37 °C durante 1 h. Se eligió la condición en que los tamaños obtenidos tuvieran una media entre 15 y 20 kpb, y se hicieron digestiones con más ADN (50-100  $\mu\text{g}$  de ADN), escalando proporcionalmente las cantidades de enzima, buffer y volumen final.

### **6.4.2.2 Fraccionamiento del ADN en gradiente de sacarosa**

Mediante esta técnica se seleccionaron fragmentos de ADN de tamaño adecuado para la construcción de la biblioteca genómica a partir de digestiones parciales. El método utilizado fue el descrito por Ausubel y col. (1987). En tubos de centrifuga Ultra Clear™ (Beckman Instruments) se realizó un gradiente lineal de sacarosa, depositando 4 mL de una solución de sacarosa al 40% (EDTA 5 mM, NaCl 1 M, Sacarosa al 40% (p/v) y Tris-HCl 20 mM pH 8, esterilizado por autoclave) en el fondo

del tubo y añadiéndole con cuidado 4 mL de una solución de sacarosa al 10% (EDTA 5 mM, NaCl 1 M, Sacarosa al 10% (p/v) y Tris-HCl 20 mM pH 8, esterilizado por autoclave). Se selló con Parafilm® y se mantuvo en posición horizontal durante 5 h. Posteriormente se le agregaron 0.8 mL de ADN digerido y se centrifugó a 22 °C, a 35000 rpm (rotor SW41 TI) durante 16 h. Se recuperaron las fracciones mediante un capilar estéril al que se le acopla una goma limpia de bomba peristáltica (la goma se limpió con EDTA 0.5 M a pH 8, etanol absoluto y H<sub>2</sub>O estéril). Se colectaron 20 fracciones con 0.4 mL de volumen. Se mezclaron 10 µL de cada fracción con 40 µL de agua estéril y 5 µL de buffer de carga. Se calentaron las muestras durante 5 min a 65 °C y se enfriaron en baño de hielo durante 2 min, analizándose por electroforesis en un gel de agarosa al 0.3% (p/v) en buffer TAE (57.1 mL/L de ácido acético, 100 mL/L de EDTA 0.5 M pH 8.0 y 242 g/L de Tris-HCl). Una vez seleccionadas las fracciones útiles, se diluyeron con TE hasta que la concentración de la sacarosa quedara aproximadamente al 10% (Tabla 9) y se precipitó con etanol frío y acetato de sodio 3 M a pH 5.2 (Tabla 9). Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min, se lavó el precipitado con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 10 µL de agua destilada estéril.

**Tabla 9. Dilución de las fracciones obtenidas por el gradiente de sacarosa.**

<b>GRADIENTE DE SACAROSA</b>																				
Fracciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
% Sacarosa	40	38.4	36.8	35.2	33.6	32.1	30.5	28.9	27.3	25.7	24.2	22.6	21	19.4	17.8	16.3	14.7	13.1	11.6	10
Vol Fracciones	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
Vol de TE	1200	1136	1072	1008	944	884	820	756	692	628	568	504	440	376	312	252	188	124	60	0
Vol Total	1600	1536	1472	1408	1344	1284	1220	1156	1092	1028	968	904	840	776	712	652	588	524	460	400
Acetato de sodio	160	153	147	140	134	128	122	115	109	102	96	90	84	77	71	65	58	52	46	40
Etanol -20°C	4000	3840	3680	3520	3360	3210	3050	2890	2730	2570	2420	2260	2100	1940	1780	1630	1470	1310	1150	1000
Total	5760	5529	5299	5068	4838	4622	4392	4161	3931	3700	3484	3254	3024	2793	2563	2347	2116	1886	1656	1440

### 6.4.2.3 Ligación y empaquetamiento de ADN de *P. ostreatus* con los brazos de DASH II

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN (9-18 kbp), se realizó la ligación con el vector DASH II (Stratagene, Figura 6), el cual fue digerido con la endonucleasa de restricción *Bam*HI (cuyo corte genera extremos compatibles con los creados por la enzima *Sau*3AI). La ligación se realizó como se muestra en la Tabla 10. La mezcla de ligación se incubó a 4 °C durante 18 h, se tomó una muestra de 0.5 µL y se confirmó la ligación mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 10. Mezcla de reacción de la ligación de ADN de *P. ostreatus* y DASH II.**

Lambda DASH II/ <i>Bam</i> HI	0.5 µl
Digestiones <i>Sau</i> 3A	4 µl
Buffer ligasa 10 x	1 µl
Ligasa	1.5 µl
H <sub>2</sub> O	3 µl
Volumen total	10 µl

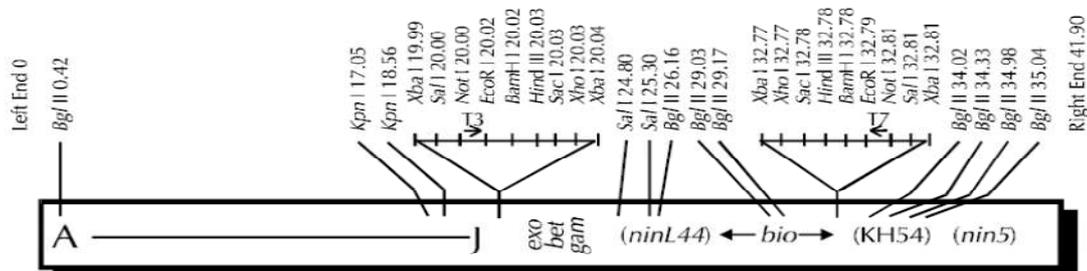


Figura 6. Secuencia del mapa lineal del Bacteriofago Lambda DASH II.

A continuación, se realizó el empaquetamiento. Para ello, a un tubo del kit Gigapack III Gold (Stratagene, Cat #200201) se le agregaron, en hielo, 4 µL del ADN ligado y se agitó suavemente con la pipeta, sin introducir burbujas. Se centrifugó y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h y se agregaron 500 µL de buffer SM (5.8 g/L de

NaCl, 2.0 g/L de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 50 mL de 1 M Tris-HCl (pH 7.5) y 5 mL de gelatina 2% (w/v)) y 20 µL de cloroformo. La suspensión de fagos se infectó en la cepa de *E. coli* apropiada. El resultado de la infección determinó si el número de bacteriófagos obtenido fue significativamente representativo del genoma de *P. ostreatus*.

Para ello se utilizó la siguiente fórmula (Clarke y Carbon, 1976):

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)}$$

Donde:

**N**= Numero de clones obtenidos

**P**= Probabilidad de que un determinado gen se encuentre integrado dentro de algunos de esos clones

**f**= Cociente entre el tamaño medio de los insertos integrados en el vector y el tamaño total del genoma de *P. ostreatus*.

#### 6.4.2.4 Infección de células de *E. coli* con el bacteriófago DASH II

Se utilizó la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRA (P2), la cual sólo es infectada por fagos recombinantes. Lambda DASH II es un vector de reemplazamiento, y contienen genes activos *red* y *gam*, por lo que el bacteriófago silvestre es incapaz de infectar una cepa lisogénica, como lo es la empleada XL1-Blue MRA (P2). Los genes *red* y *gam* están localizados en el fragmento de reemplazamiento, que es sustituido por las digestiones de ADN genómico de *Pleurotus ostreatus*. Los bacteriófagos recombinantes sí son capaces de infectar la cepa *E. coli* XL1-Blue MRA (P2). Se inoculó una colonia de *E. coli* en 100 mL de medio LB (en g/L, NaCl 10, triptona 5, extracto de levadura 5, a pH 7.0) suplementado con maltosa al 0.2% y con 10 mM de MgSO<sub>4</sub>. Se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.5 medido a 600 nm. A continuación se centrifugaron las células durante 10 min, a 5000 rpm y 4 °C y se resuspendieron en ¼ de su volumen inicial con 10 mM de MgSO<sub>4</sub> (células 4X, para

infección en medio sólido) o 1/10 del volumen inicial (células 10X, para infección en medio líquido). Las células se almacenaron a 4 °C durante 3 días. Para medio sólido se infectaron 100 µL de células 4X de *E. coli* con 10 µL de la suspensión de fago en buffer SM y se incubó a 37 °C durante 30 min. Tras la incubación se le añadió medio NZY (en g/L, NaCl 5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2, extracto de levadura 5, NZ amina 10, a pH 7.5 con NaOH) con 0.7% (p/v) de agar (precalentado a 40-45 °C), se mezcló perfectamente el tubo con la infección y se extendió sobre una base con medio NZY con 2% (p/v) de agar. Se incubaron las placas a 37 °C hasta que aparecieron los halos de lisis o calvas (aproximadamente 6 h).

#### **6.4.2.5 Transferencia de ADN de bacteriófago a membranas**

Obtenidos los halos de lisis provocados por los bacteriófagos (apartado 6.4.2.4), se mantuvieron las placas durante 2 h a 4 °C. Se colocaron las membranas (Amersham) sobre la placa y la transferencia se realizó durante un minuto, efectuándose marcas asimétricas en el filtro y en el medio, de forma que posteriormente permitan orientar el filtro sobre la placa. Se levantó la membrana y se marcó con un rotulador en la cara opuesta a la que ha estado en contacto con el medio y se depositó sobre un papel de filtro. Se realizó una réplica, dejando que la transferencia a la membrana se realizara durante 3 min. Para liberar el ADN de la envoltura proteica y separar las dos cadenas del mismo, se colocaron las membranas durante 3 min sobre una lámina de papel Whatman 3MM empapado en solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M). Seguidamente, se hicieron dos tratamientos de 5 min sobre una lámina de papel de filtro impregnada en solución neutralizante (NaCl 3 M y Tris-HCl 1 M pH 7.5) y finalmente se colocaron durante 10 min sobre una lámina de papel de filtro humedecida en SSC 2X (NaCl 3 M, Citrato sódico 0.3 mM, pH 7 y SDS 0.1%). Se dejaron secar las membranas y se fijó el ADN exponiendo la membrana a una lámpara de luz ultravioleta a 700x 100 µJ/cm<sup>2</sup> (UV 500 Crosslinker Amersham).

#### **6.4.2.6 Marcaje e hibridación de la sonda**

Se utilizó el kit de marcaje (Prime-a-Gene<sup>®</sup> Labeling System, Promega) para marcar 50 ng de sonda con 5  $\mu$ L de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La membrana se prehibridó con 10 mL de PSE (3 mL de Fosfato sódico 1 M pH 7.2, 7 mL de SDS 10% y 20  $\mu$ L de EDTA 0.5 M) en un horno a 65 °C durante 10 ó 20 min. El PSE utilizado en la prehibridación se desechó y se agregaron 10 mL de PSE nuevo al tubo de hibridación más la sonda marcada, se dejó en agitación en el horno y se hibridó durante toda la noche a 65 °C. Posteriormente se guardó la mezcla de la sonda marcada en un tubo Falcon de 50 mL. Al tubo de hibridación se le adicionaron 100 mL de solución de lavado (10% de fosfato de sodio 1 M pH 7.2 y 6.6% de SDS al 10%) y se colocó en el horno de hibridación a 65 °C durante 20 min; transcurrido ese tiempo se repitió la operación. El filtro con la marca se expuso frente a un film de Hyperfilm-MP (Amersham) en un estuche con pantallas intensificadoras (Amersham) a -70 °C. El tiempo de exposición se determinó dependiendo de la señal proporcionada por el contador Geiger-Muller.

#### **6.4.2.7 Amplificación del bacteriófago en medio líquido y obtención del ADN**

Para la obtención del ADN del bacteriófago se requirió una infección en medio líquido, para lo que se mezclaron 200-300  $\mu$ L de las células *E. coli* 10X con un número 100 veces menor de bacteriófagos ( $10^7$  u.f.p.), incubándose a 37 °C durante 30 min. A continuación se inoculó la mezcla de infección en un matraz con 100 mL de medio LB y se incubó a 37 °C y 250 rpm durante el tiempo necesario hasta la lisis total del cultivo bacteriano (5-6 h). Posteriormente, se realizó la extracción de ADN mediante el protocolo del kit Lambda Midi Kit (Cat # 12543, Quiagen).

### 6.4.3 Genome Walker

Mediante esta técnica se pretende ir amplificando una zona desconocida de un gen a partir de una zona ya conocida. Se diseñaron primers de la zona conocida, la cual se obtuvo de la secuenciación de la zona amplificada con los primers de la sonda, pero en los sentidos inversos a los habituales. Se utilizó el kit Genome Walker (Clontech Laboratories), en el cual se digirió el ADN genómico de *Pleurotus ostreatus* con cuatro enzimas (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII* y *StuI*), ligándose con unos adaptadores las digestiones generadas. Se amplificó el gen de interés a partir de las cuatro librerías generadas mediante las digestiones y amplificaciones por PCR con los primers diseñados y los específicos para los adaptadores (Figura 7), utilizándose la enzima elongasa (Invitrogen), que es una mezcla de Taq polimerasa y ADN polimerasa de *Pyrococcus* GB-D. La proporción de estas dos polimerasas termoestables es tal que la procesividad y la actividad de la Taq, junto con la actividad exonucleasa 3'-5' de la ADN polimerasa de *Pyrococcus* permite la amplificación de fragmentos mayores a 30 kb con una alta fidelidad. Las bandas que se generaron se purificaron y secuenciaron. Las secuencias obtenidas se alinearon mediante el programa SeqMan (Lasergene) y se corroboró su parecido con lacasas de hongos en el banco de genes (NCBI).

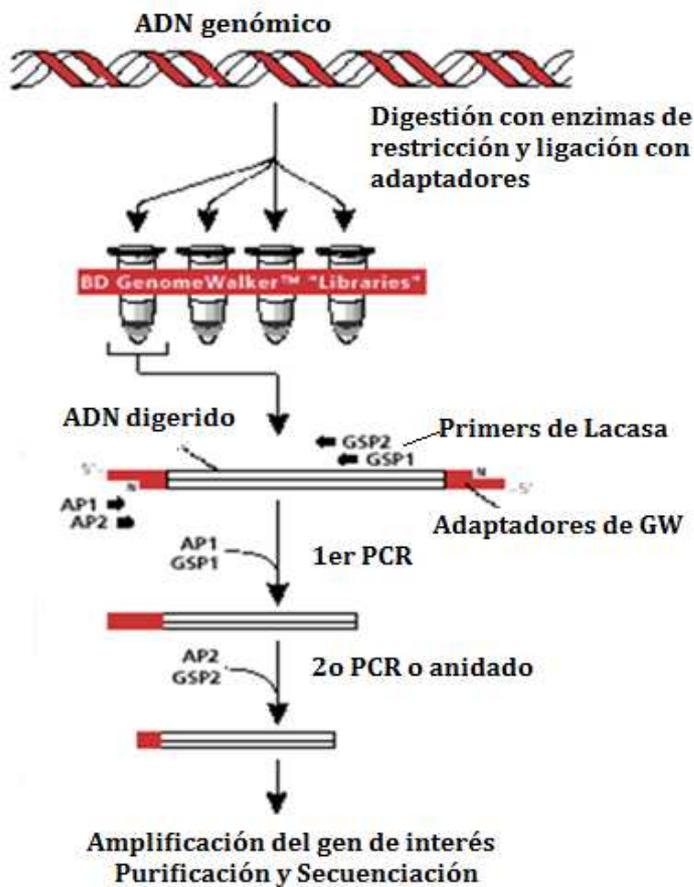


Figura 7. Esquema de la metodología del Wenome Walker.

#### 6.4.4 Aislamiento de mRNA y síntesis de cDNA

El ARN fue aislado del micelio congelado de 408 h de crecimiento de *P. ostreatus* utilizando TRIZOL (Invitrogen) como método de extracción. El ARN se limpió mediante el kit RQ1 DNase (# M610; Promega) para evitar la interferencia del ADN. Los primers para amplificación de ADNc se diseñaron mediante alineamientos de lacasas reportadas, y el fragmento de ADNc se amplificó mediante una reacción acoplada de PCR y transcripción reversa, utilizando el kit OneStep RT-PCR (QIAGEN). La mezcla de reacción se muestra en la Tabla 11 y los productos generados fueron secuenciados.

**Tabla 11. Mezcla de reacción y programa de termociclador para llevar a cabo la amplificación de cDNA por RT-PCR.**

Mezcla de reacción	Vol. (µl)	Programa de amplificación	Tiempo (min)	Tem (°C)
H <sub>2</sub> O libre de RNasa	32 µL	1. Transcripción reversa	30	50
Buffer RT-PCR 5x	10 µL	1. Activación HotStarTaq	15	95
Mezcla dNTP (10mM)	2 µL	2. Desnaturalización	1	94
Primer A (20 mM)	1.5 µL	3. Alineamiento	1	55
Primer B (20 mM)	1.5 µL	4. Extensión	1	72
Mezcla de enzimas RT-PCR	2 µL		Paso 3	Ciclos 40
RNA molde	1 µL	5. Extensión final	10	72
Volumen Total	50 µL			

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 7.1. Producción y selección de isoformas con actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus*.

El crecimiento de la cepa de *Pleurotus ostreatus* en FML y FMS se muestra en la Figura 8. En el presente trabajo la mayor producción de biomasa se obtuvo en el sistema de FML (5.5 g/L), mientras que en FMS la biomasa obtenida fue de 5 g/L. La  $\mu$  fue mayor en FMS que en FML ( $0.033 \text{ h}^{-1}$  y  $0.022 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente). Posiblemente, y tomando en cuenta que el desarrollo natural de los hongos es sobre superficies sólidas, la fase de adaptación en la FMS fue menor que en la FML, lo que se reflejó en mayores valores de  $\mu$ . En la Figura 9 se muestra el consumo de azúcares en ambos sistemas y se observa que se consumieron en su totalidad, siendo el consumo más rápido en FMS (sistema en el que los azúcares se agotan aproximadamente a las 290 h) que en FML (donde ocurre a las 430 h).

En general, el contenido de proteína fue bajo en los dos sistemas de crecimiento (Figura 10), aunque se produjo más proteína en FMS.

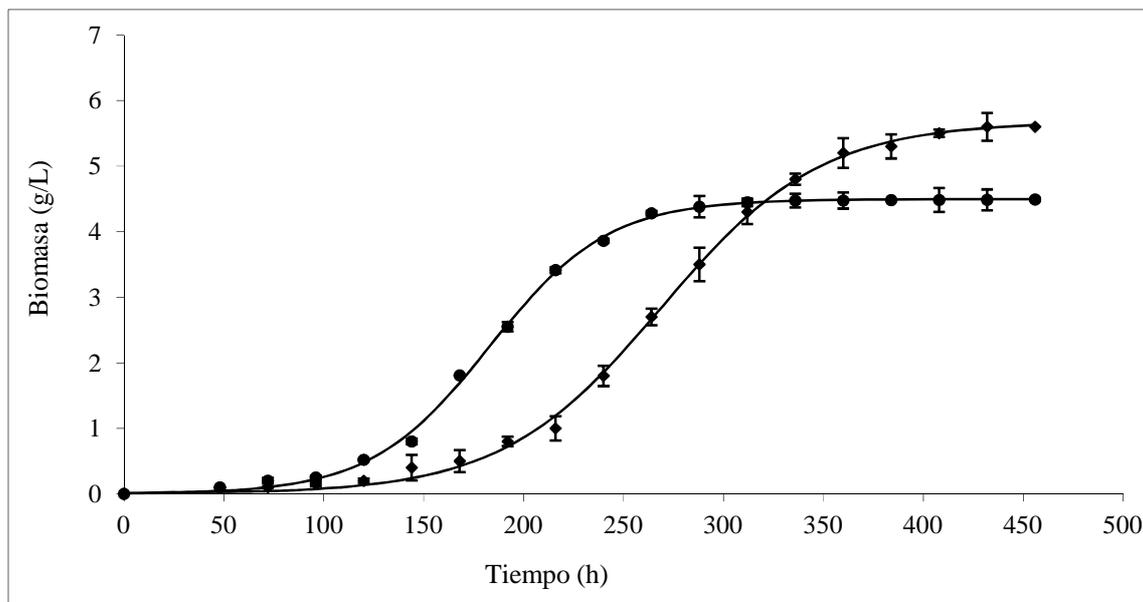


Figura 8. Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en FML (◆) y FMS (●).

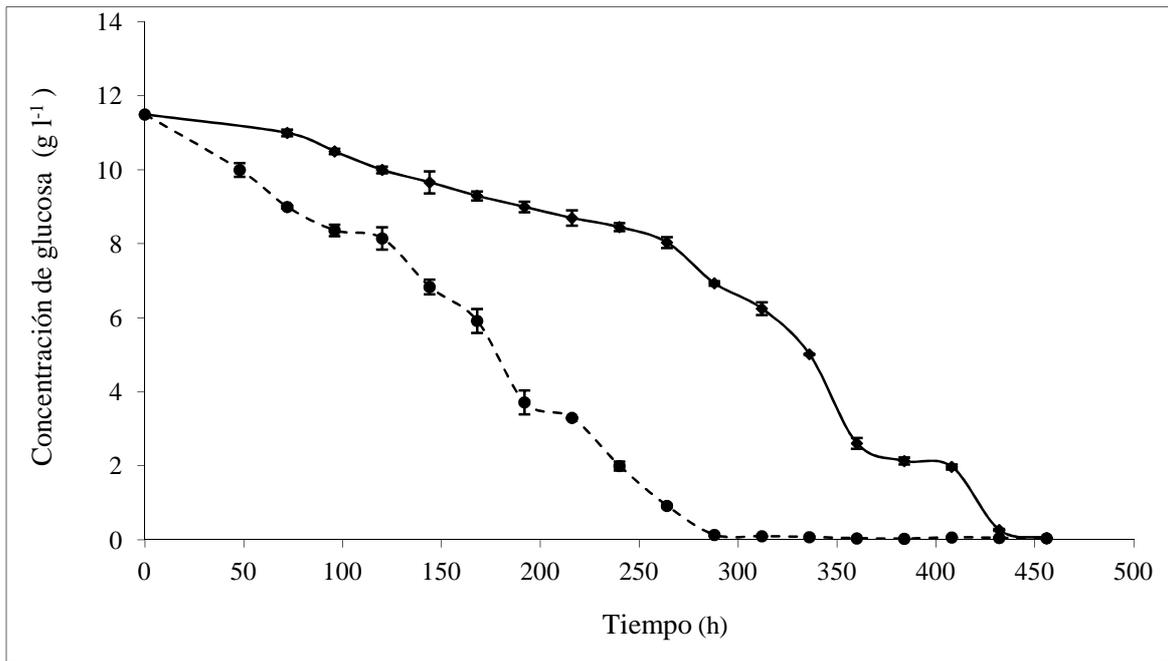


Figura 9. Consumo de azúcares por *Pleurotus ostreatus* en FML (◆) y FMS (●).

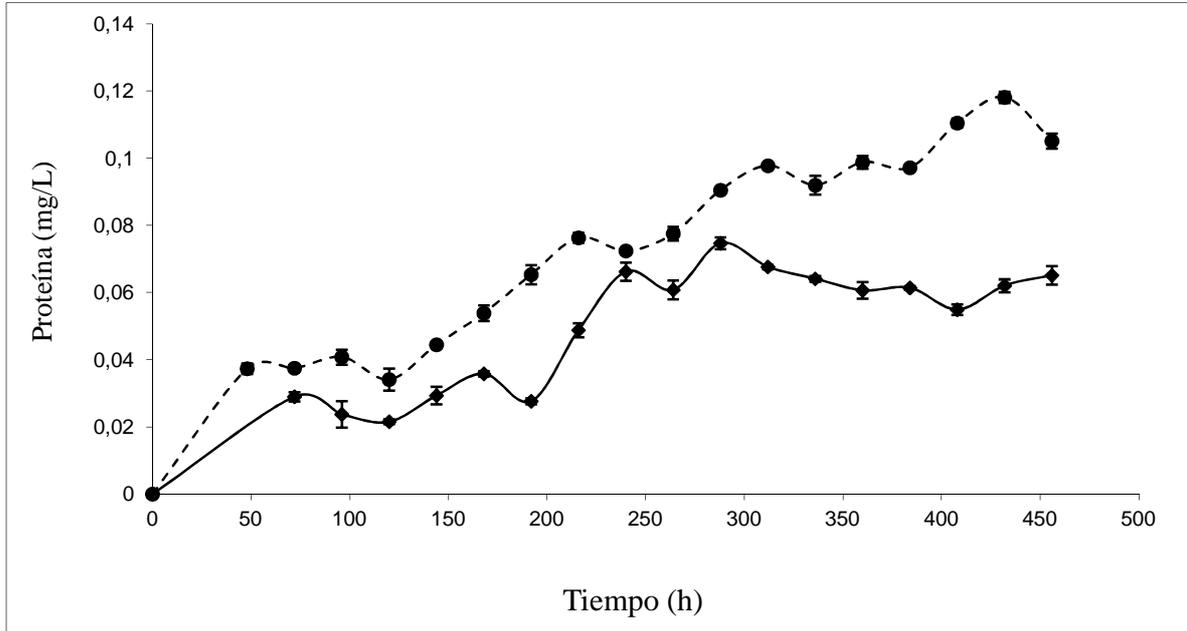


Figura 10. Contenido de proteína extracelular de *Pleurotus ostreatus* en FML (◆) y FMS (●).

La actividad de las lacasas bajo las diferentes condiciones de producción se puede observar en las Figuras 11 y 12. Los resultados muestran niveles bajos de actividad desde el inicio de la fase exponencial de crecimiento, alcanzándose los valores máximos durante la fase estacionaria de desarrollo. La mayor actividad se obtuvo en este caso en FML, siendo la producción máxima de 13000 U/L a las 456 h de cultivo (en comparación con las 2400 U/L en FMS). Se observa que la producción de lacasas en FML fue aproximadamente 5 veces mayor que en la FMS. Sin embargo, al cuantificar proteasas ECE de ambos sistemas de crecimiento, únicamente se encontraron en FMS (Figura 13).

En la Figura 14 se observan los zimogramas de actividad de lacasas, en los que se determinaron el número de isoformas presentes durante el cultivo en las dos condiciones de producción. Se observó la aparición de una isoforma (la de mayor velocidad de migración) durante la fase de adaptación, isoforma que se conservó durante todo el tiempo de desarrollo de los hongos. En la FML se observó, además, un incremento en el número de isoformas (hasta cuatro, a la mitad del desarrollo exponencial y durante la fase estacionaria), mientras que en la FMS mostró una isoforma al inicio de la fase exponencial, dos o posiblemente tres isoformas durante toda la fase exponencial y sólo dos isoformas en la fase estacionaria.

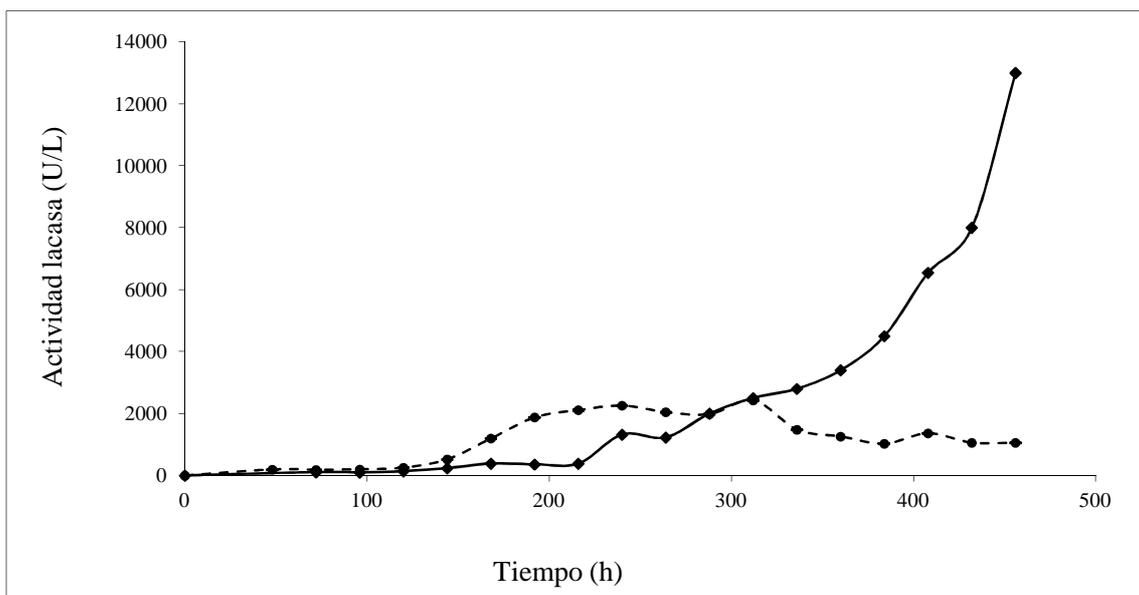


Figura 11. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* obtenida por FML (♦) y FMS (●).

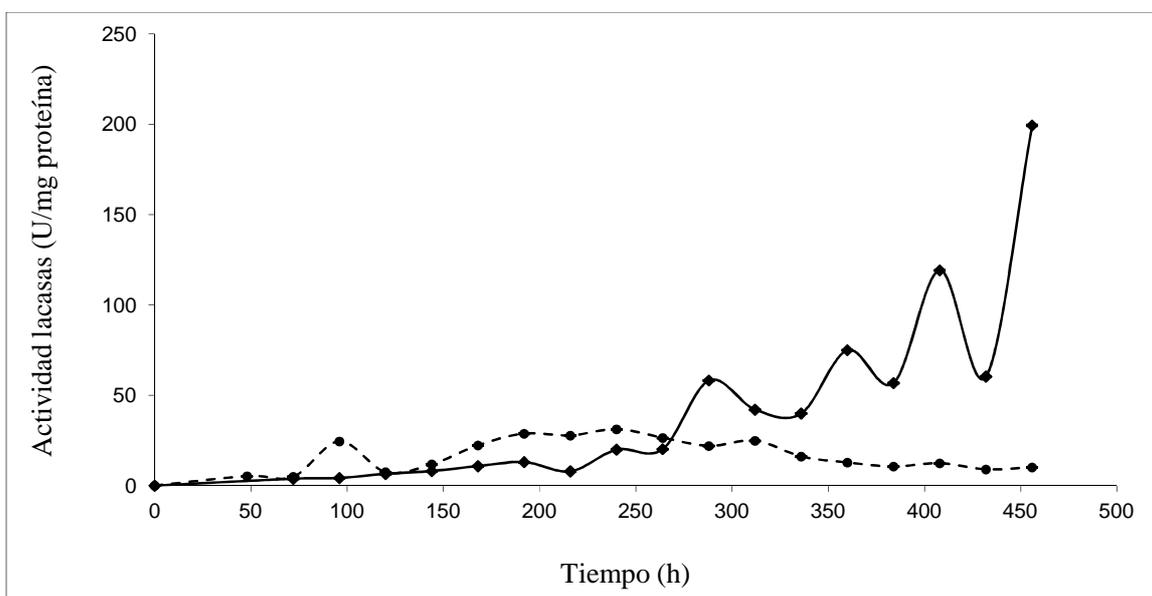


Figura 12. Actividad específica de lacasas de *Pleurotus ostreatus* en FML (♦) y FMS (●).

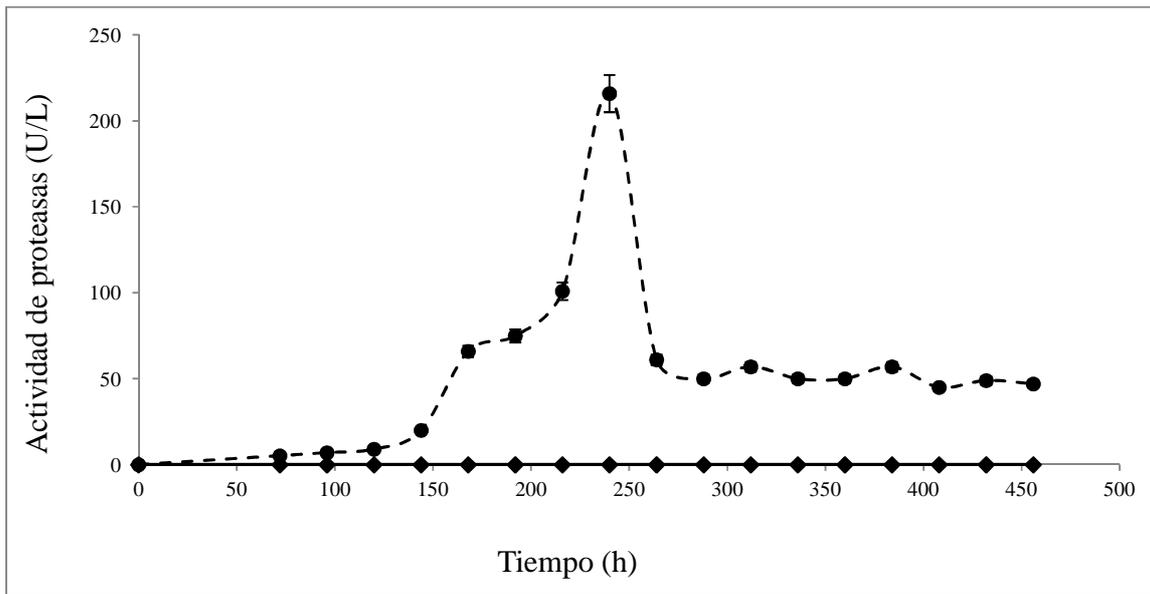


Figura 13. Actividad de proteasas de *Pleurotus ostreatus* en FML (♦) y FMS (•).

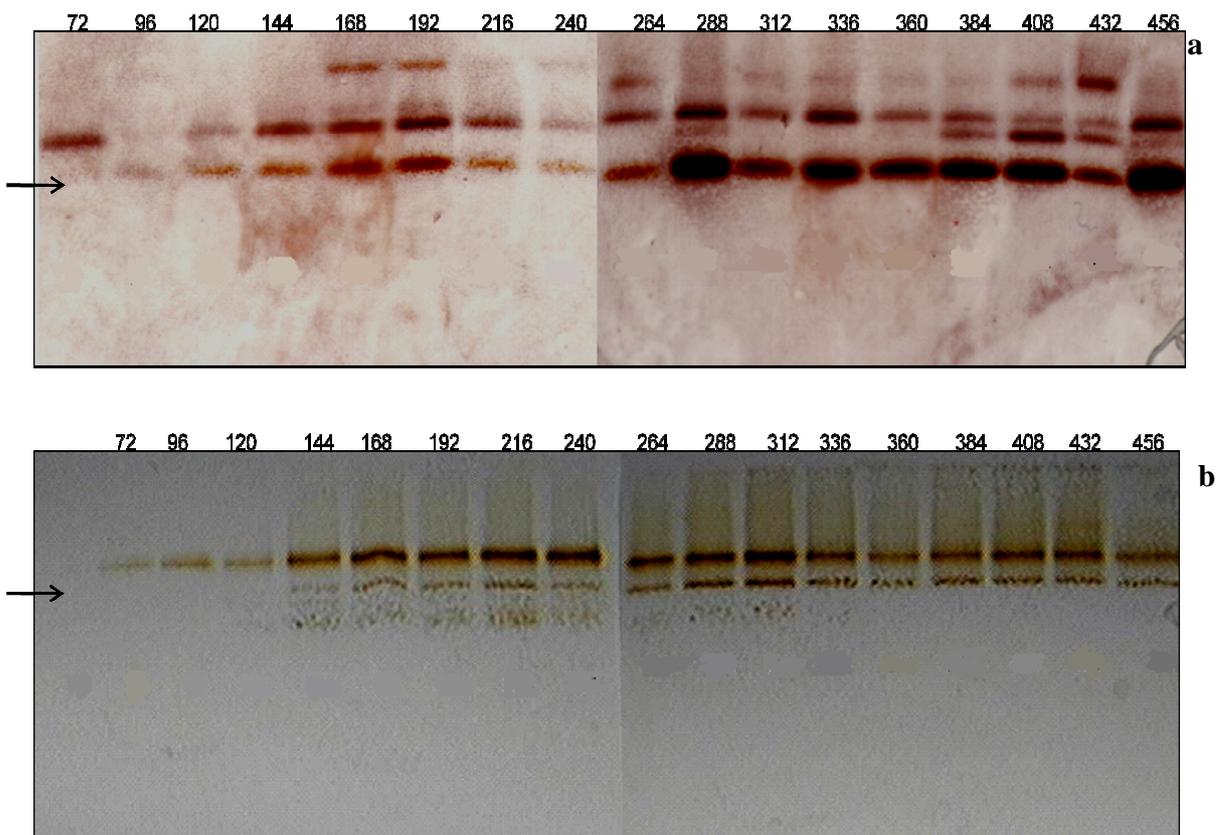


Figura 14. Zimogramas de la actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* a) FML, b) FMS.

Se observó un crecimiento atípico de esta cepa, ya que en los trabajos reportados para los dos tipos de sistemas de fermentación, la producción de biomasa y de enzimas es, en general, mayor en la FMS. En el presente trabajo, el cultivo en el sistema FML (Figura 15). Se observó, por otra parte, que el medio de cultivo no presentó cambios drásticos de pH, ya que mostró variaciones de 0.5 unidades. Por ello, cabe deducirse que el pH no es el responsable de las diferencias observadas en la actividad de lacasas y biomasa entre ambos sistemas. El consumo total de azúcares fue igual en ambos sistemas, por lo que las diferencias de producción de biomasa no están tampoco relacionadas con la cantidad de glucosa asimilada. Otros estudios realizados en FML con esta misma cepa de *Pleurotus ostreatus* reportaron valores de  $\mu$  próximos a  $0.02 \text{ h}^{-1}$  (Tlecuítl-Beristain y col., 2008), lo cual concuerda con nuestros resultados. La producción de biomasa coincide con lo reportado por Confortin y col. (2008), quienes utilizaron un medio optimizado para FML y reportaron una producción de biomasa de 5.5 g/L para *Pleurotus sajor-caju*, incubado durante 20 días, al igual que en el presente estudio.

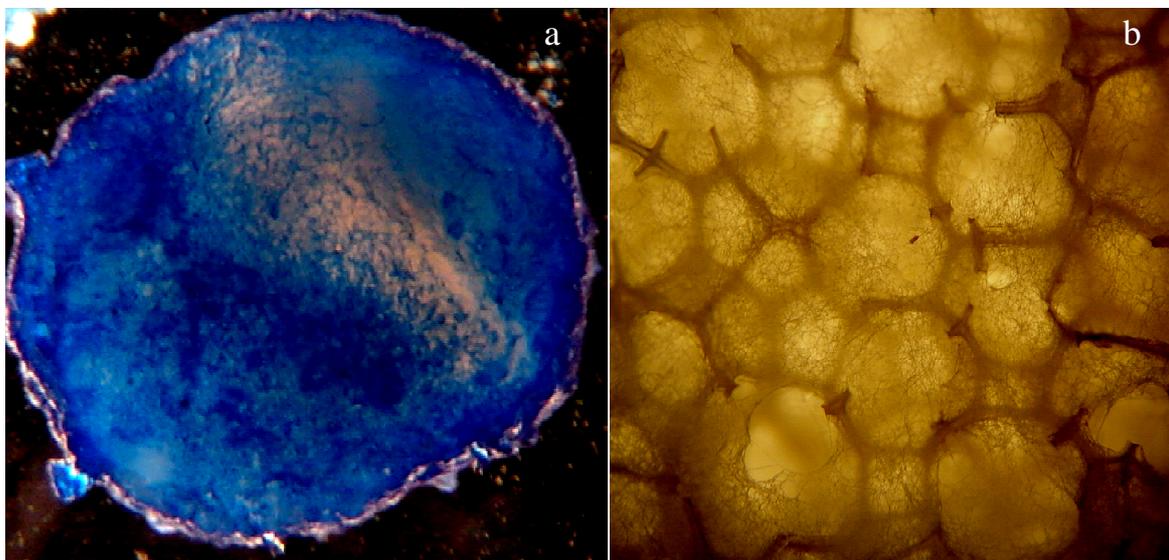


Figura 15. Morfología de *Pleurotus ostreatus* hongo en ambos sistemas de crecimiento, a) FML y b) FMS.

Lenz y Hölker (2004) realizaron un estudio comparativo de dos sistemas de crecimiento (FML y FMS) para *P. ostreatus*, en el cual se observó que la mayor producción de lacasas se dió en la FMS, con 1000 U/L (por solo 20 U/L obtenidas en la FML). Estos autores utilizaron, sin embargo, bagazo de caña como sustrato, y obtuvieron los valores de producción a las 9 semanas de crecimiento. En el presente trabajo, por el contrario, la producción máxima obtenida fue de 13000 U/L a los 18 días de crecimiento.

Se ha considerado la producción de proteasas como indeseable, ya que degradan las enzimas de interés. En un estudio comparativo con *Aspergillus niger*, la producción de proteasas fue mayor en FML, mientras que en FMS fue baja (Aguilar y col., 2001). Esto contrasta con lo obtenido en el presente trabajo, donde no se detectó actividad de proteasas en FML. En la producción de otras enzimas de interés económico se ha reportado que el sistema FMS es el óptimo para obtener mayor rendimiento (Viniegra-González y col., 2003; Hölker y col, 2004). Esto también contrasta con el presente trabajo, ya que el mejor sistema de producción fue la FML (lo que podría deberse a la ausencia de proteasas o a un mecanismo de respuesta a condiciones sub-óptimas de desarrollo del hongo). Se sabe que el número y tipo de isoformas son dependientes de las condiciones de cultivo, de la especie de los hongos y del estado de desarrollo de los mismos (Giardina y col., 1999).

## **7.2. Purificación de la isoforma de lacasa de *Pleurotus ostreatus***

En la Figura 16 se observa el cromatograma de intercambio iónico (Econo-Pac), en el que se aprecian tres picos de proteína: uno entre la fracción 5-10, otro entre las fracciones 10-15 y el último a partir de fracción 18-24. El pico de las fracciones 10-15 coincide con el primer pico de actividad de lacasa y la fracción de proteína 18-24 con el segundo pico de actividad de lacasa. En la Figura 17 se observan los zimogramas, donde se pueden apreciar dos isoformas de lacasa de diferente peso molecular, las lacasas de menor peso molecular se agruparon en las fracciones 18-24, mientras que

en las fracciones 10-15 se concentraron las lacasas de mayor peso molecular. En los geles teñidos con plata se puede observar las diferentes proteínas presentes en las fracciones obtenidas mediante este proceso. En el segundo paso de purificación se utilizó la columna Econo-Paq (intercambio iónico), y en el cromatograma de la Figura 18 se pueden apreciar dos picos de proteína: un pico pequeño entre las fracciones 4-7 y otro que abarca desde las fracciones 13-30 y que coincide con el único pico de actividad de lacasa (que se encontró entre las fracciones 19-24). En el zimograma (Figura 19) se observa que, al parecer, este pico corresponde a una sola isoforma de lacasa, la de menor peso molecular y el gel de plata nos muestra que hay pocas proteínas contaminantes. En el cromatograma (Figura 20) de la tercera etapa de purificación se observa también un solo pico de proteína y de lacasa. En el zimograma se observó una banda de lacasa (la de menor peso molecular), mientras que en el gel teñido con plata en condiciones reductoras se observa que disminuyó el contenido de proteínas, aunque aún hay dos proteínas contaminantes, una de mayor y otra de menor peso molecular, con respecto a la banda de interés (Figura 21).

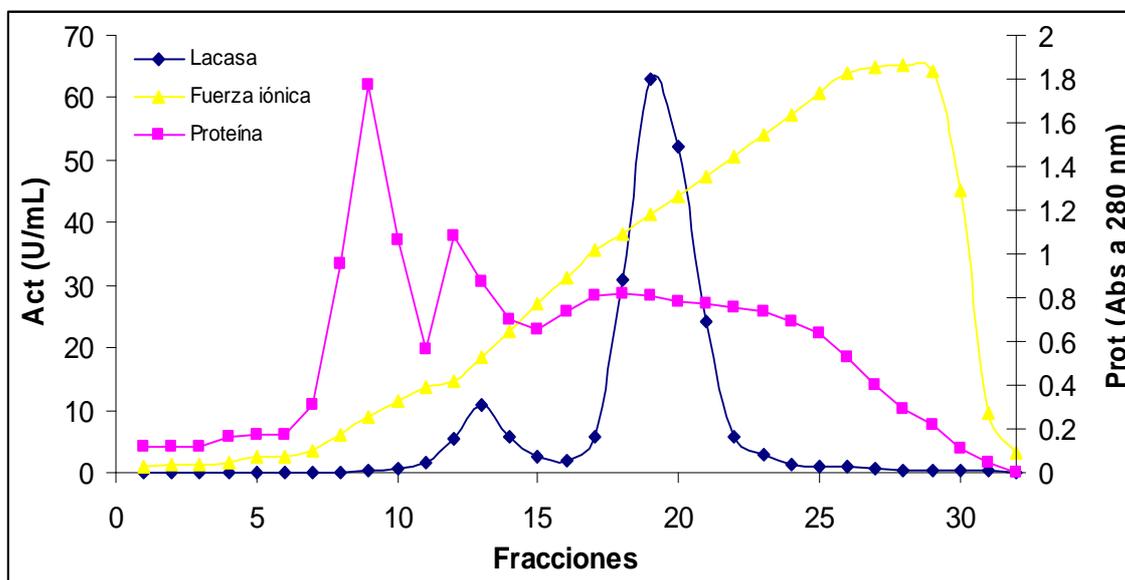


Figura 16. Cromatograma de la separación de proteína por cromatografía de intercambio iónico (Econo-Pac).

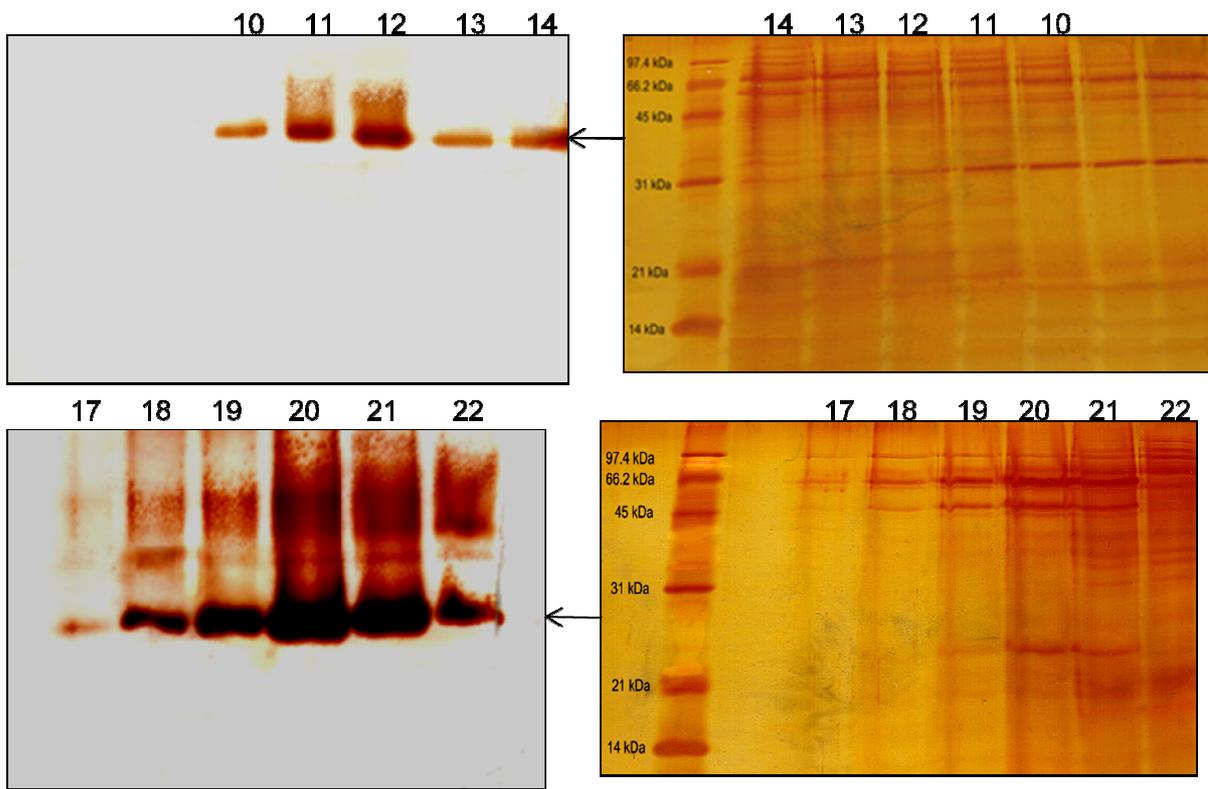


Figura 17. Zimografía y tinción con plata de las fracciones con actividad de lacasa obtenidas de cromatografía de intercambio iónico (columna Econo-Pac).

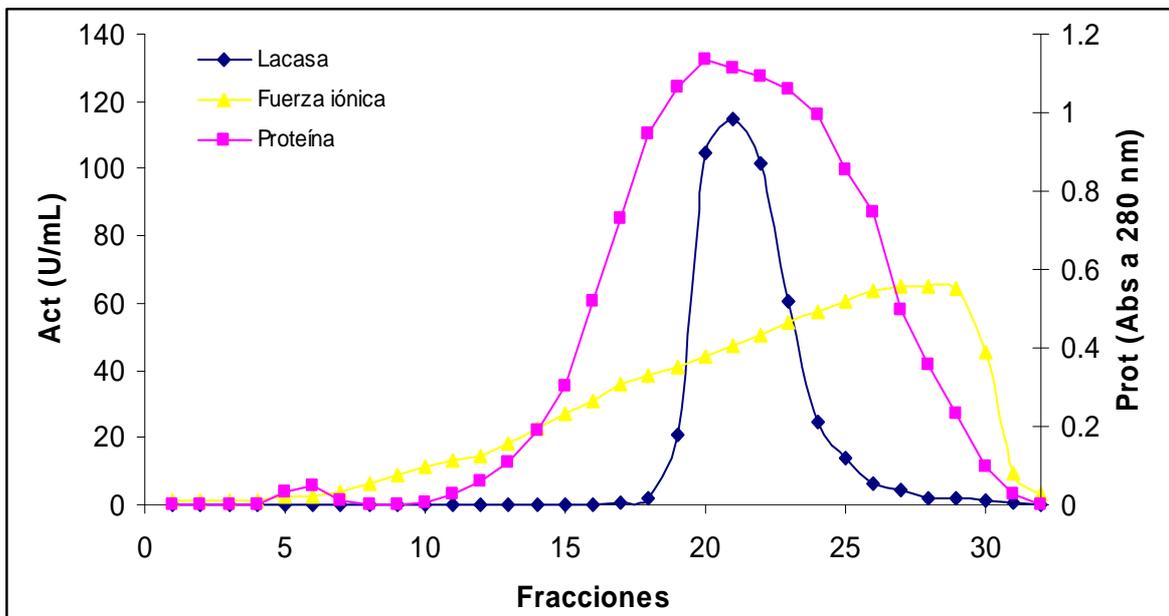


Figura 18. Cromatograma de la segunda separación de proteína por cromatografía de intercambio iónico (Econo-Pac).

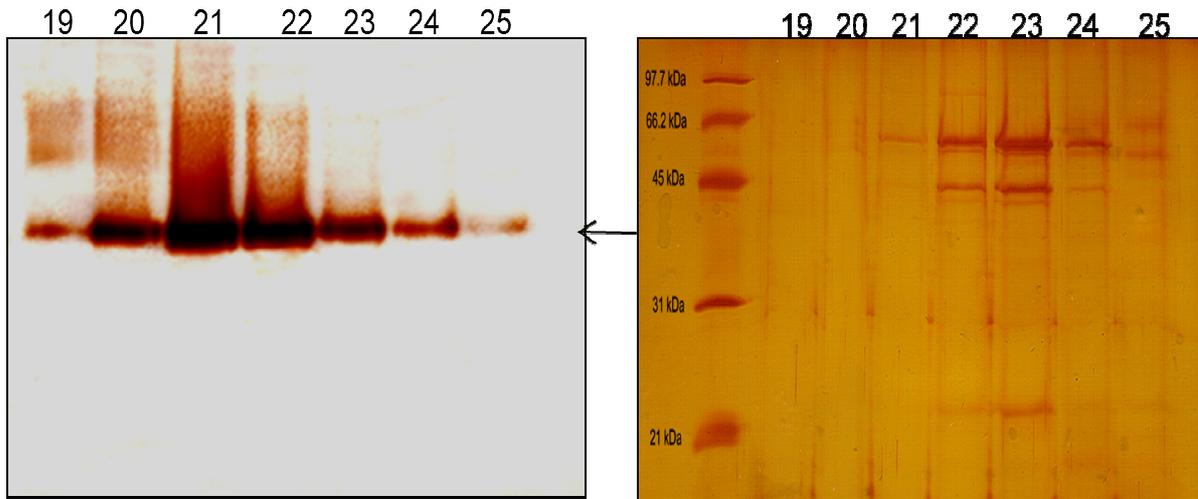


Figura 19. Zimografía y tinción con plata de las fracciones con actividad de lacasa obtenidas de cromatografía de intercambio iónico (Econo-Pac).

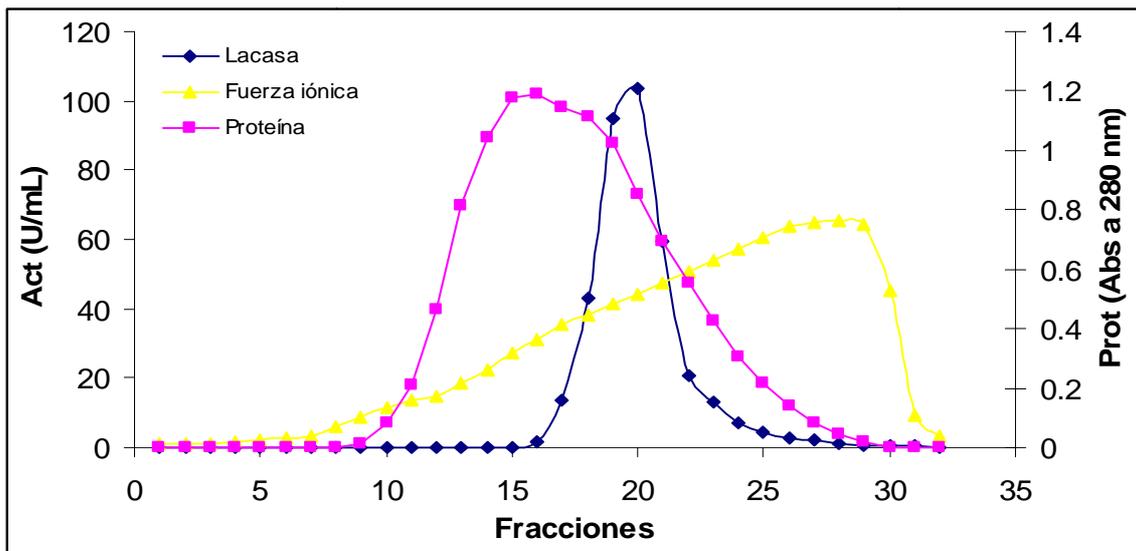


Figura 20. Cromatograma de la tercera separación de proteína por cromatografía de intercambio iónico (columna Bio-Q).

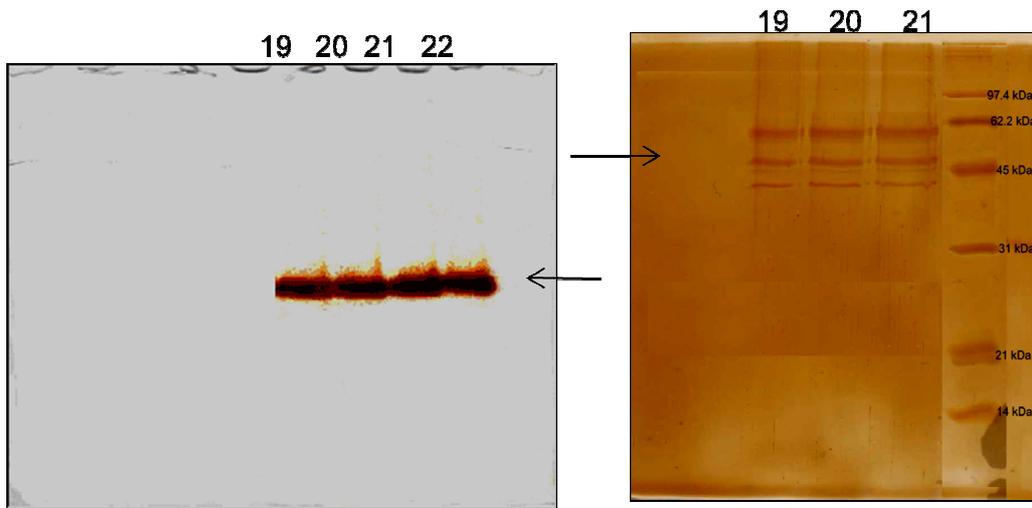


Figura 21. Zimografía y tinción con plata en condiciones semi-desnaturalizantes y desnaturalizantes de las muestras obtenidas en cromatografía de intercambio iónico (columna Bio-Q).

Una vez obtenido el extracto semi-purificado de *P. ostreatus*, con dos proteínas contaminantes (Figura 21), se inmovilizaron las proteínas en una membrana de difluoruro de polivinilideno (Figura 22).

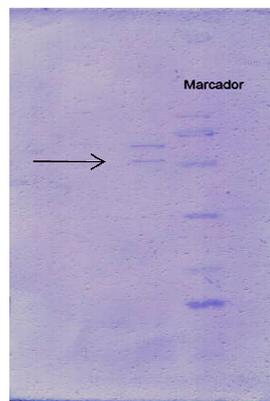


Figura 22. Membrana de difluoruro de polivinilideno con las proteínas inmovilizadas de *P. ostreatus*.

Como resultado de la secuenciación del extremo amino terminal de la banda de interés se obtuvieron 15 aminoácidos de la proteína:

A I G P T G D M Y I V N E D V

Se realizó el análisis Blast (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de la secuencia de aminoácidos de la isoforma de lacasa de interés, que presentó un 100% de identidad con enzimas lacasas de *P. ostreatus*. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos (Figura 23) permitió conocer la posición de la secuencia y a partir de ésta se diseñó el cebador LMF. Para diseñar el segundo cebador (LMR) se realizó una búsqueda en la base de datos (NCBI) de las secuencias reportadas de lacasas y se tomó una parte del sitio activo de dichas enzimas. En este cebador se utilizaron posiciones degeneradas, tomándose en cuenta el uso preferente de codones de *Pleurotus*. La letra **R** se utiliza cuando las bases son A o G y la **K** cuando son bases G o T. La secuencia de los primers fue la siguiente

Primers **LMF: GGCAACATGTACATCGTCAACGAGGAC**

Primers **LMR: GAAAGATGCGARTGRTACCARAACGTKCC**

Al comparar la secuencia del amino terminal de la proteína semi-purificada con las lacasas de *Pleurotus* en la bases de datos (NCBI; Figura 23) se observa que dicha secuencia comienza justo después del aminoácido 24 de las secuencias de la base de datos, aminoácidos que pertenecen al péptido señal en ambos genes. En la Figura 38 se muestra la secuencia de aminoácidos del gen de lacasa obtenidos en este trabajo de investigación y se puede observar que antes del amino terminal se encuentran 22 pb las cuales pueden ser el péptido señal, lo cual confirmaría la el origen extracelular de la lacasa de *Pleurotus*.

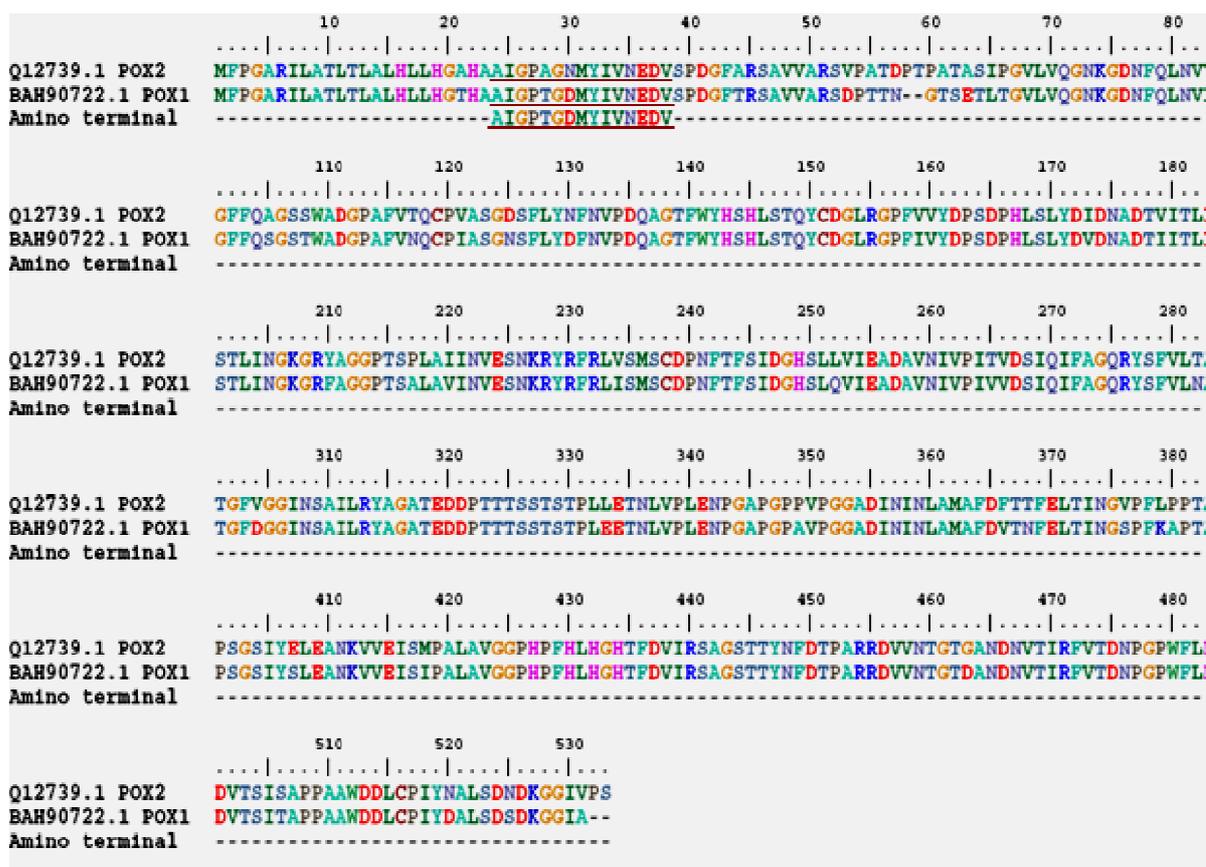


Figura 23. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos obtenida por la secuenciación de la isoforma de lacasa de *Pleurotus ostreatus*.

Los trabajos de investigación de varios autores han reportado hasta ahora siete isoformas para *P. ostreatus* (Giardina y col., 1995, 1999 y 2010; Palmieri y col., 1997 y 2003; Pezzella y col., 2009). Giardina y col. (2010) reportaron recientemente que probablemente haya hasta 12 isoformas de lacasas en el genoma de *P. ostreatus*, por lo que se espera que se describan más lacasas. Tlecuitl-Beristain y col. (2008) reportaron una isoforma de diferente peso molecular a las ya reportadas, de 43.7 kDa (SDS-PAGE) y un punto isoeléctrico de 2.3, y por su posición sobre los zimogramas parece que es la isoforma que se presenta durante toda la fase de crecimiento en la FML en este trabajo. Esta isoforma podría tener diferentes papeles biológicos, ya que en las fases log y exponencial podría estar involucrada en la degradación del sustrato

mientras que en la fase estacionaria podría participar en procesos morfológicos o de pigmentación, algunas de las funciones descritas para las lacasas de hongos.

### **7.3. Obtención de la sonda del gen de lacasa**

#### **7.3.1. Obtención del ADN de *P. ostreatus***

El ADN genómico de *P. ostreatus* se obtuvo por el método descrito en el apartado 6.4.1. En la Figura 24 se muestra un gel de agarosa (0.4%) con el ADN total de *Pleurotus ostreatus*. Se utilizó el ADN del bacteriófago lambda para poder tener una referencia, ya que este tiene un tamaño de 50 kpb y en el gel se observa que el tamaño del ADN de *P. ostreatus* fue semejante al del marcador. Este ADN se utilizó en la amplificación de la sonda mediante PCR y para realizar las digestiones parciales. Para este último efecto, y para garantizar la obtención de fragmentos con el tamaño adecuado para la construcción de la biblioteca genómica se requerían moléculas de ADN con un tamaño aproximado de 50 kpb.

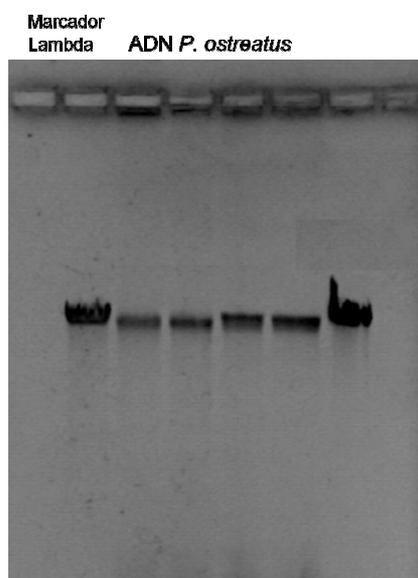


Figura 24. Gel de agarosa con la muestra de ADN total de *Pleurotus ostreatus*

### 7.3.2. Obtención de la sonda mediante PCR

Con los primers diseñados a partir de las secuencias de lacasas, se amplificó un fragmento de aproximadamente 600 pb (Figura 25), el cual se utilizaría como sonda para detectar el gen completo en la biblioteca genómica. El producto de PCR se purificó y se secuenció para confirmar que se trataba de un fragmento de la secuencia para la enzima lacasa. Se utilizó el programa de búsqueda de similitud BLAST, que encuentra regiones similares entre secuencias reportadas de diferentes organismos (GenBank NCBI), comparando secuencias de nucleótidos o aminoácidos y calculando la similitud estadística. Los resultados de la comparación de la secuencia obtenida por PCR y las contenidas en el banco de genes (NCBI) se muestran en la Tabla 12, y permiten confirmar que la secuencia obtenida corresponde a una lacasa.

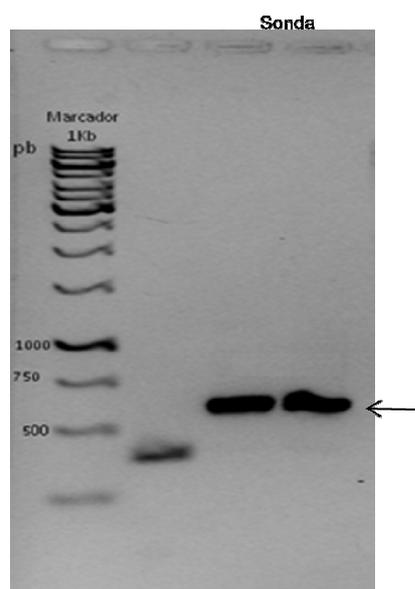


Figura 25. Gel de agarosa de la amplificación del ADN de *Pleurotus ostreatus* con los cebadores diseñados.

**Tabla 12. Resultado del análisis de tipo Blast para la secuencia de nucleótidos obtenida por PCR.**

Descripción	No. Acceso GenBank	% identidad
<i>Pleurotus ostreatus</i> pox1 mRNA for phenol oxidase 1, complete cds	AB514561.1	97%
<i>Pleurotus eryngii</i> laccase mRNA, complete cd	GU480806.1	97%
<i>Pleurotus sajor-caju</i> laccase 1 (Lac1) mRNA, partial cds	AF297525.1	97%
<i>P.ostreatus</i> pox1 mRNA for diphenol oxidase	Z34847.1	94%
<i>Pleurotus pulmonarius</i> laccase 2 (lac2) mRNA, complete cds	AY836675.1	89%
<i>Pleurotus eryngii</i> laccase gene, complete cds	GU953215.1	87%

#### **7.4. Hibridación y localización del gen completo**

##### **7.4.1. Obtención de la Biblioteca Genómica de *Pleurotus ostreatus***

Se realizaron digestiones parciales con la enzima de restricción *Sau3A1*. En la Figura 26 se incluye el resultado de un gel de electroforesis con un gradiente de digestiones parciales del ADN de *P. ostreatus*, observándose una disminución del ADN digerido conforme disminuye la concentración de la enzima. Tras este ensayo se seleccionó la concentración  $3.9 \times 10^{-3}$  U, la cual generó el tamaño de ADN digerido dentro del rango de 9 a 18 kpb, más o menos el tamaño requerido para insertar en el bacteriófago DASH II utilizado como vector de clonación. Los fragmentos se purificaron mediante gradiente de sacarosa (Figura 27) y la fracción del tubo 8, en el cual se encuentran las moléculas de ADN de alrededor del tamaño de interés (Figura 28a) se utilizaron para la ligación con el vector DASH II, digerido con *Bam*HI (Figura 28b).

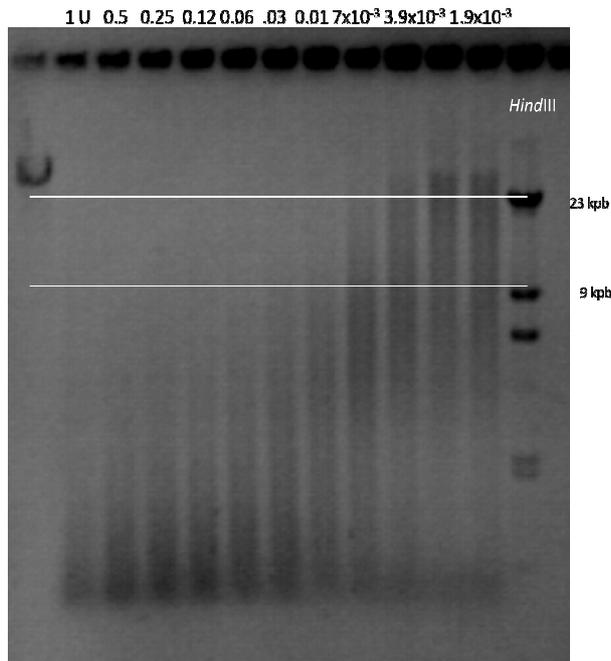


Figura 26. Gel de agarosa con las digestiones *Sau3A1* del ADN de *Pleurotus ostreatus*.

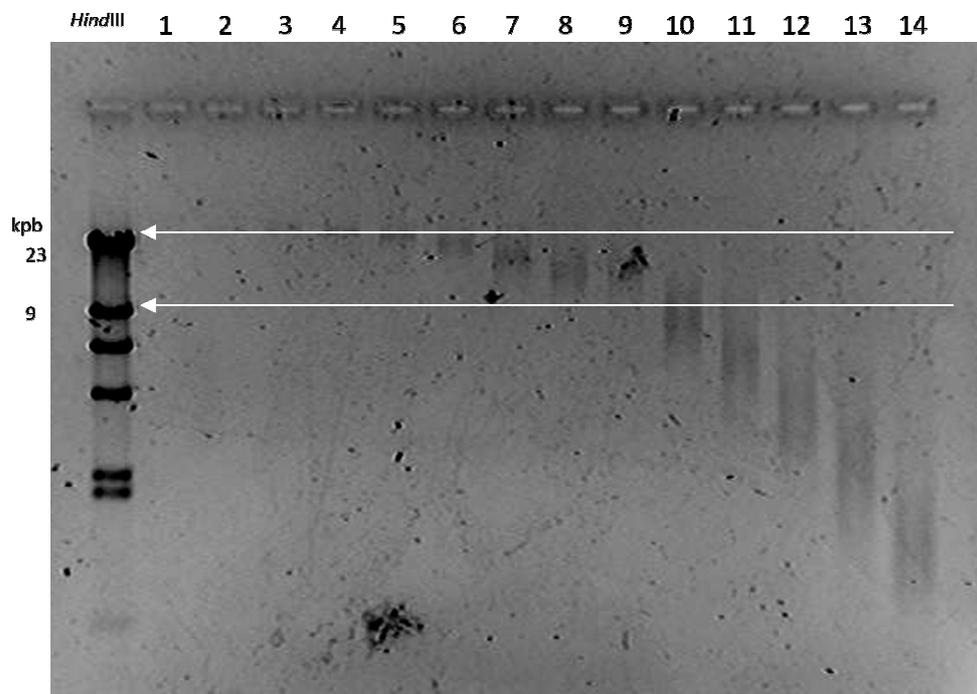


Figura 27. Fracciones obtenidas mediante el gradiente de sacarosa de la digestión parcial del ADN de *Pleurotus ostreatus*.

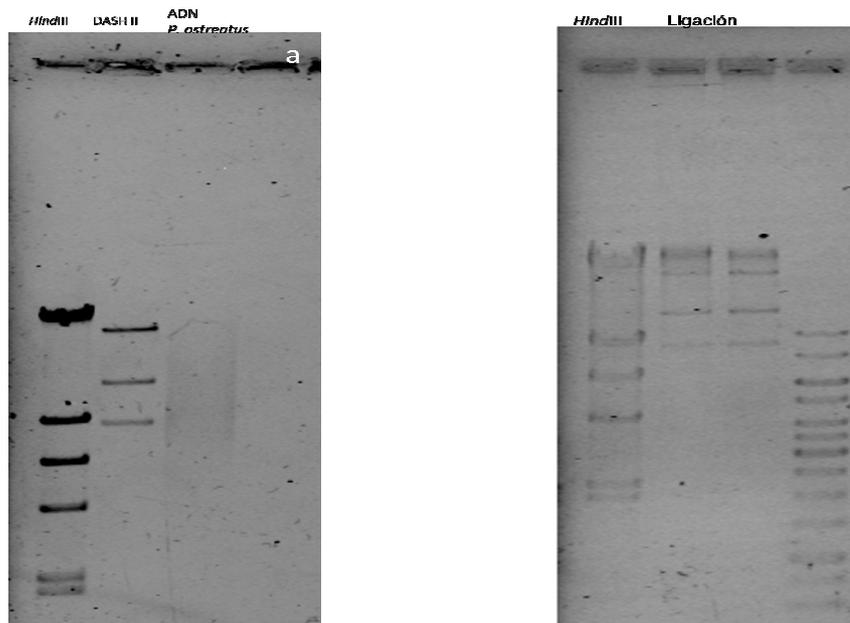


Figura 28. Gel de agarosa con el ADN de *Pleurotus ostreatus* y fago DASH II (a) y ligación (b).

Posteriormente se encapsidó la ligación y se infectó la cepa *E. coli* XL-Blue MRA (P2). El número de bacteriófagos obtenidos permite suponer una representatividad completa del ADN del microorganismo en las bibliotecas genómicas sintetizadas. Aun no se ha reportado el genoma de *P. ostreatus*, por lo que no se sabe el tamaño exacto. Sin embargo, hay algunos trabajos en los que mediante la técnica de PFGE se han separado los cromosomas, proponiéndose diferentes tamaños para el genoma de *P. ostreatus*. Sagawa y Nagata (1992) reportaron seis cromosomas y un tamaño total del genoma de 20.8 Mpb, Peberdy y col. (1993) reportaron un genoma de un tamaño total de 31.3 Mpb e identificaron nueve cromosomas y Larraya y col. (1999) reportaron 11 cromosomas y un tamaño de 35.1 Mpb. Así, para poder determinar si se tenía representado el genoma completo de *P. ostreatus* se tomó en cuenta el tamaño de genoma del último trabajo mencionado (el más alto de los tres). Utilizando la fórmula del apartado 6.4.2.3 tendría que obtenerse una titulación de 16182.67 u.f.p. para considerar que el genoma de *P. ostreatus* estaba representado en la biblioteca genómica. Se obtuvo una titulación de la biblioteca genómica de 75250 u.f.p. (Figura 29).

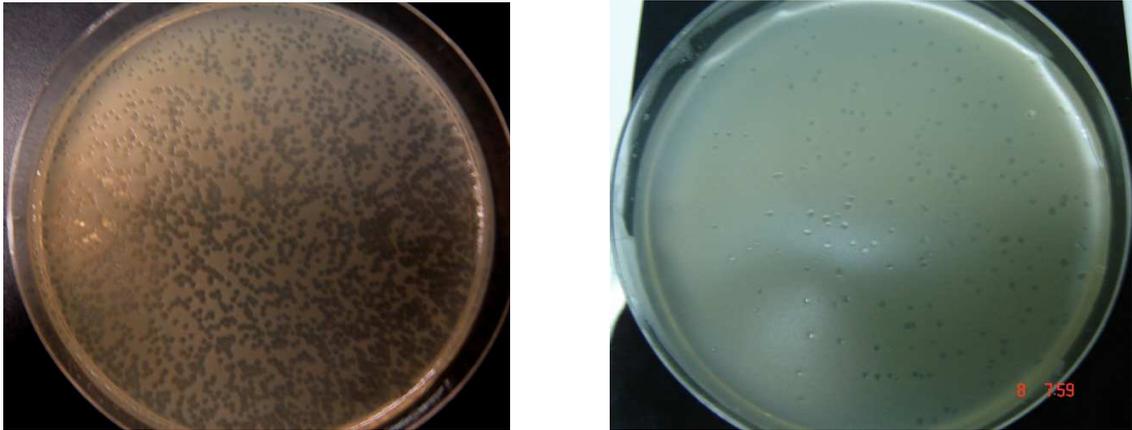


Figura 29. Placas de lisis obtenidas de la biblioteca genómica de *Pleurotus ostreatus*.

Se realizó la hibridación con la sonda marcada radiactivamente con la técnica del desplazamiento de mellas. En la Figura 30 se puede observar el film para la localización del gen de lacasa, con dos réplicas de cada placa (cada una fue hibridada con una sonda distinta, para asegurar el resultado como positivo). Se seleccionaron varios bacteriófagos que mostraban señal de hibridación positiva y fueron purificados a través de sucesivos experimentos de hibridación (Figura 30). Una vez obtenido el bacteriófago que contenía el inserto con el gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus* se purificó su ADN, como se indicó en el apartado 6.4.2.7. En este punto hubo problemas para poder ligar el ADN digerido del bacteriófago a un plásmido que sirviera de base para obtener la secuencia de nucleótidos, y como se había desarrollado en paralelo una estrategia de PCR inverso que sí fue eficiente, se decidió avanzar más rápidamente con esa estrategia

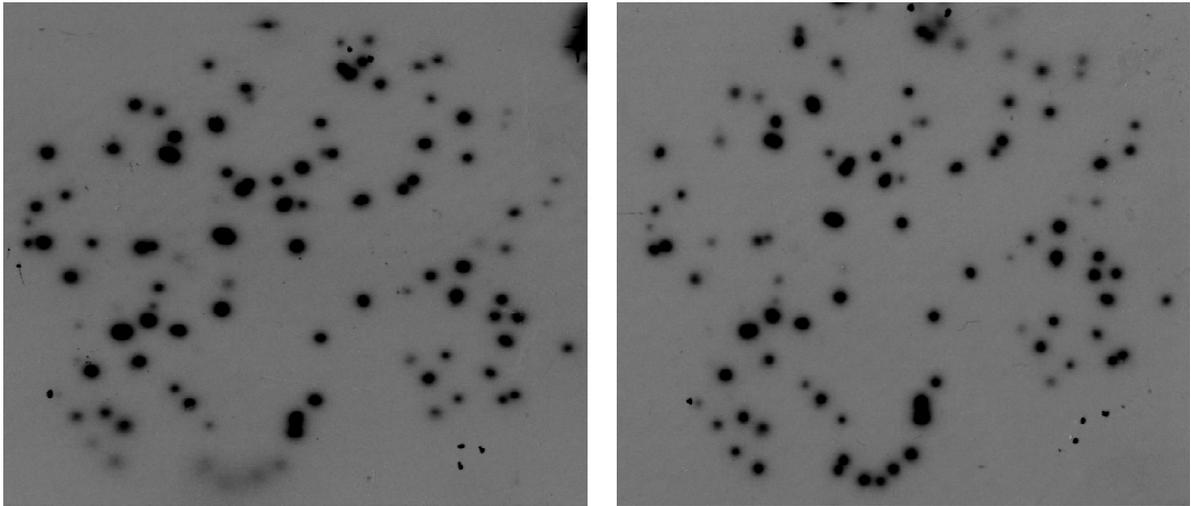


Figura 30. Resultado de la exposición de filtros de ADN de bacteriófagos seleccionados como portadores del gen de lacasa de *P. ostreatus*.

#### **7.4.2. Obtención del gen de lacasa mediante Genome Walker**

Como se explicó en el apartado 6.4.3, a partir de la sonda obtenida se diseñaron primers con los sentidos contrarios a los habituales, buscando amplificar las secuencias adyacentes a la zona conocida. En la Tabla 13 se muestra la secuencia de todos los primers diseñados que se utilizaron en esta técnica, en total cinco juegos de primers. En la Figura 31 se muestran geles obtenidos con los cuatro pares de primers, observándose en las imágenes 1, 2 y 3 que se obtienen bandas muy definidas, y en algunos casos aparecen hasta dos bandas por carril. En el presente trabajo únicamente se purificó y secuenció aquellas bandas que presentaban una mayor concentración. Con los primers 4a y 4b (Figura 31-4) se obtuvieron bandas con todas las enzimas, aunque difusas (a pesar de realizar el segundo PCR anidado). En estos casos sólo se purificó el producto del tratamiento con dos enzimas. Tras secuenciarlo, se observó que dichos fragmentos no se alineaban con las secuencias obtenidas a partir de los anteriores primers.

Finalmente, con el empleo de esta técnica, se obtuvo una secuencia total de 1800 pb, que se muestra el alineamiento en la Figura 32. La secuencia se analizó en el programa Blast (NCBI) y permitió delimitar que abarcaba parte del promotor del gen, aunque no era suficiente para cubrir el gen completo de la lacasa de *P. ostreatus*.

**Tabla 13. Secuencia de primers diseñados para Genome Walker.**

	Reverse	Foward
1.	AACGAAGGATAAAGACAAGGTAAT	TCCACTTACGAACGATTGAA
2.	TTCATGGTAATCAACTTACAGAACG	CTAGTACACTCATCAACGGTAAAGG
3.	GATGATGATGTTTTACGTCGTCCG	TAATGTAAGCGTAGCGAGAATCCGT
4a	ATGATGTTTTACGTCGTCCG	GAGCCCGAGAGGAATGG
4b	ACGGTGTAACAGTACGC	AGCGAAAAGACTCAAAGCG

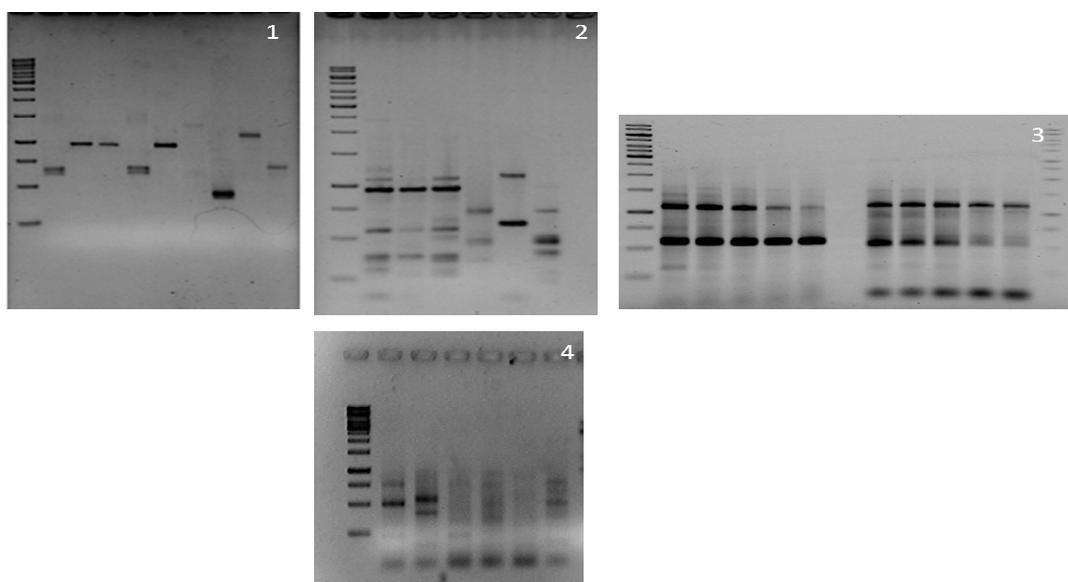


Figura 31. Geles de las bandas amplificadas mediante la técnica de Genome Walker.

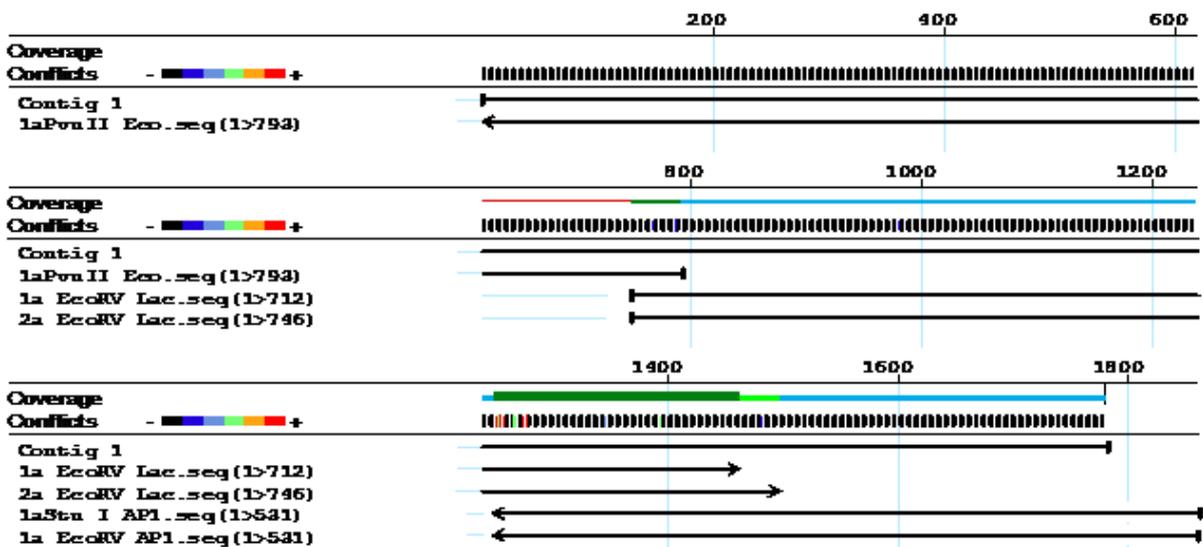


Figura 32. Alineamiento de las secuencias obtenida mediante la técnica de PCR-anidado del ADN de *Pleurotus ostreatus*.

En este punto se recurrió de nuevo al ADN clonado en el bacteriófago, que presentaba un tamaño aproximado de 9 kpb y podría contener el gen completo. Con los primers ya diseñados que se utilizaron en el PCR-anidado, se amplificó el gen completo utilizando enzima de alta fidelidad para realizar los RCR. En la Figura 33 se observa el alineamiento de la secuencia obtenida por amplificación del ADN del bacteriófago recombinante positivo, con la secuencia que se generó mediante PCR inverso. El tamaño total del fragmento del gen de lacasa fue de 3105 pb, e incluye péptido señal, promotor, intrones y exones. Giardina y col. (1995) reportaron un gen de una difenol oxidasa de un tamaño de 3155 pb de longitud (No Acc. Z22591.1), Giardina y col. (1995) reportaron POX1 de 2592 pb (No Acc. AB514560.1) y Giardina y col. (1996) reportaron también el gen POX2, de un tamaño de 2608 pb (No Acc. Z49075.2). Palmieri y col. (2003) reportaron a POXA3, de 3480 pb (No Acc. AJ344434.2), que sólo incluye la subunidad grande y Giardina y col. (1999) reportaron a POXA1b de 3371 pb de longitud. El tamaño encontrado para la lacasa de *P. ostreatus* ATCC 32783 se encuentra en el rango de lo reportado hasta la fecha. En la Figura 34 se representa esquemáticamente la estrategia seguida para la obtención del gen completo se muestra mediante el Genome Walker con ADN total *P. ostreatus* y ADN del fago de obtenido mediante la biblioteca genómica.

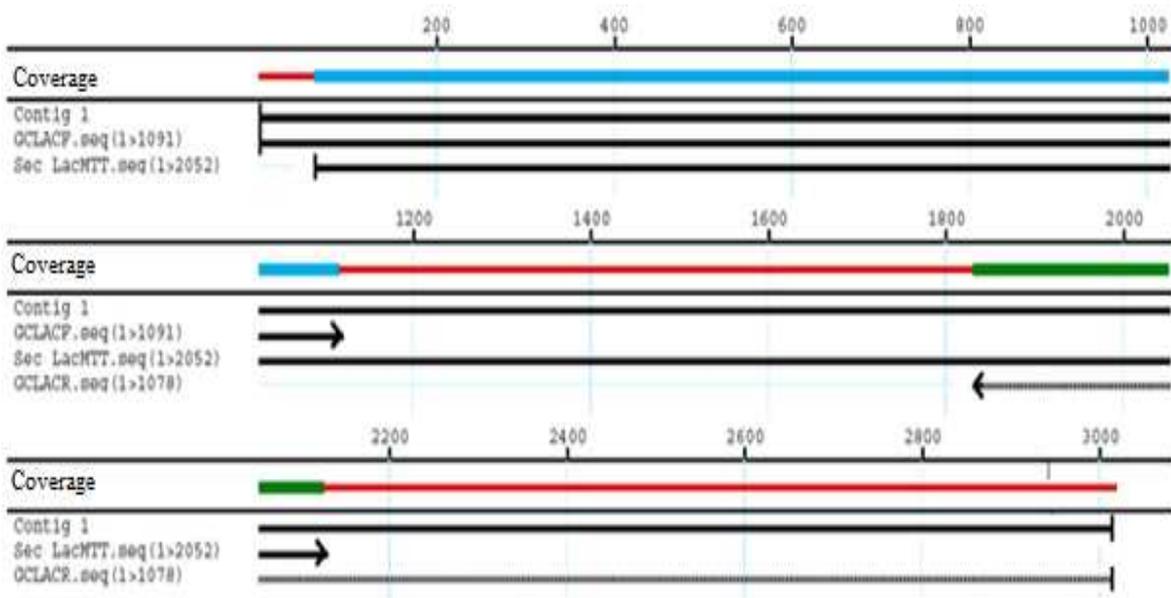


Figura 33. Alineamiento de las secuencias obtenidas mediante la amplificación de los primers de la técnica de PCR-anidado con el ADN purificado a partir del bacteriófago.

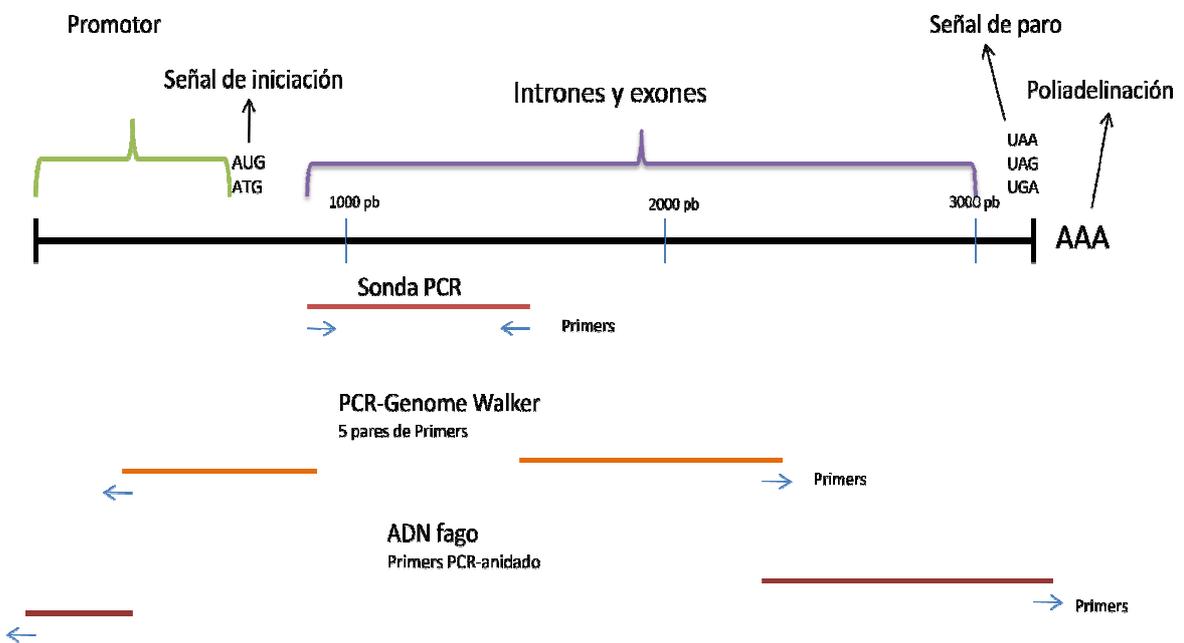


Figura 34. Estrategia de obtención del gen completo de lacasa de *Pleurotus ostreatus*.

### **7.4.3. Caracterización molecular del gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus***

Una vez obtenido el gen completo se realizó la predicción del promotor utilizando software específico en las páginas web: [www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.htm](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.htm) y <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>, Los dos programas señalaron la secuencia:

TCTATAGGTATATTTAAGACGTGCACGGACGACTGGAAAACATCATCATC

En ambos programas la puntuación máxima es de 1.0 por lo que la secuencia propuesta como parte del promotor obtuvo una puntuación de 0.98. El promotor se localizó 469 pb antes del ATG, se analizó mediante los programas: [http://meme.sdsc.edu/meme4\\_4\\_0/intro.html](http://meme.sdsc.edu/meme4_4_0/intro.html), <http://jaspar.genereg.net>, <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>, <http://cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess> y <http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml>.

Mediante estos se identificaron sitios posibles de regulación, tales como MRE (Elementos de respuestas a xenobióticos), XRE (Elementos de respuesta a metales) y respuesta de defensa. Los sitios de regulación encontrados en el promotor de *Pleurotus ostreatus* se muestran en la Figura 35. Aparecen cuatro sitios posibles de regulación MRE, los cuales están localizados en las posiciones -19, -178, -353 y -402 (líneas amarillas), tres posibles sitios XRE, en las posiciones -101, -280 y -372 (líneas rojas), un posible sitio de respuesta de defensa, en la posición -390 (línea naranja), y un elemento de respuesta al estrés, en la posición -459 (línea rosa). La caja TATA aparece en la posición -89 (línea morada) y la caja GC (línea verde) en la posición -190.

Se ha reportado en varios trabajos que la inducción de la producción de lacasas en varios hongos parece estar regulada por diferentes factores fisiológicos, lo que denomina regulación diferencial, por lo que es probable que diferentes mecanismos de activación transcripcional estén involucrados. Estos mecanismos dependen de factores transcripcionales que se unen en sitios específicos de los promotores de los

genes. Se ha reportado, por ejemplo, que la isoforma POXA1b de lacasa presenta también una región rica en GC, homóloga al sitio de unión del factor transcripcional Sp1 (factor transcripcional de mamíferos), y cuya ocupación hace disminuir la afinidad de unión al sitio MRE adyacente, afectando la interacción con los factores transcripcionales del hongo (Faraco y col., 2003).

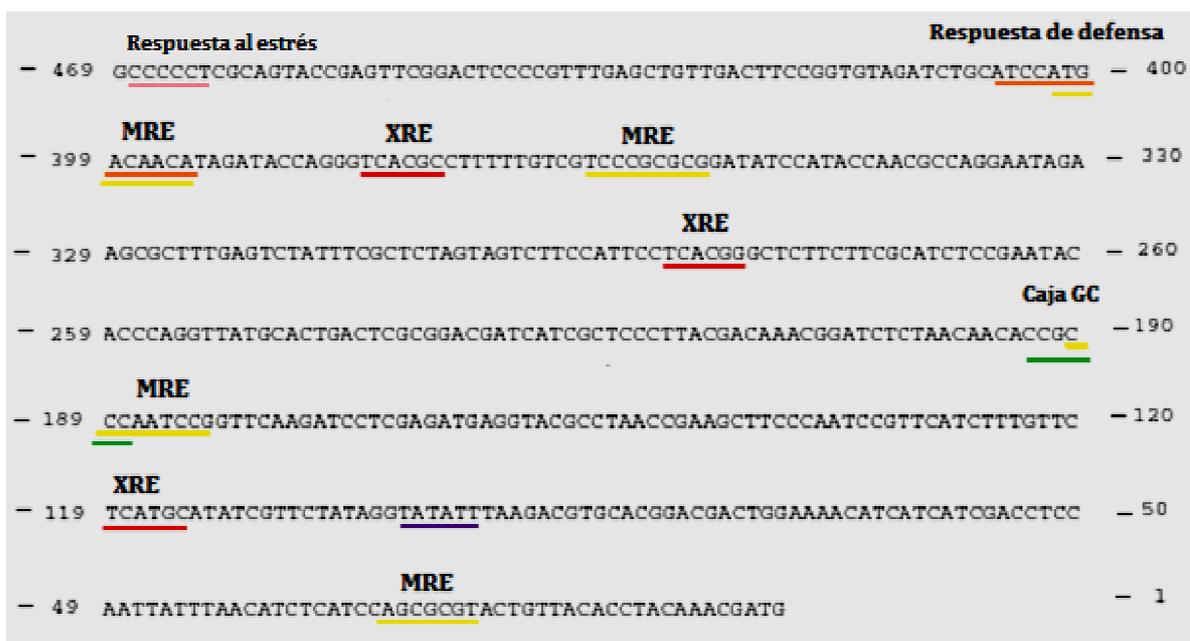


Figura 35. Secuencia de nucleótidos de la región del promotor de *Pleurotus ostreatus*, que se extiende 469 pb antes al codón de inicio (ATG). Mostrando los posibles factores transcripcionales.

La secuencia de todos los MREs es similar al núcleo de una secuencia consenso (5'-TGRCNC-3') identificada en el promotor del gen de la metalotioneína (*mt*) (Thiele, 1992). El sistema de genes regulados transcripcionalmente por metales es importante en la homeostasis del metal y la detoxificación del mismo (Kägi y Shäffer, 1988). El papel de los MREs en la protección contra la toxicidad de los metales se correlaciona con la capacidad de diversos iones metálicos, incluyendo zinc, cobre, cadmio y otros, para activar la transcripción del gen de *mt* (Hamer, 1986) y algunos otros sistemas de respuesta a metales (Merchant y col., 1991).

Se ha reportado que los elementos XRE median la activación transcripcional por sustancias aromáticas en genes de eucariontes, por lo que se ha sugerido que participan en la inducción de las lacasas de hongos por compuestos aromáticos (Soden y Dobson, 2001). En el promotor de *Trametes pubescens* no hay presencia de elementos de respuesta XRE, lo que se ha relacionado con el hecho de que en experimentos de inducción de la producción de lacasas mediante compuestos tales como 2,5 xilidina o catecol (los cuales normalmente son compuestos inductores de lacasas) no se indujo la actividad de dicha enzima (Galhaup y col., 2002). Se ha sugerido que el efecto estimulador del cobre y otros iones metálicos no sólo inhibe el crecimiento, como se ha sugerido para otros hongos (Gianfreda y col., 1999), sino que el organismo presenta un mecanismo de protección basado en la estimulación de la síntesis de melanina, algo que se ha observado en *T. pubescens* en presencia de altas concentraciones de cobre (Galhaup y Haltrich, 2001).

Galhaup y col. (2002) reportaron que se incrementó la síntesis de lacasas en *T. pubescens* en respuesta a varios iones de metales pesados, lo que sugiere que la presencia de regiones MRE en el promotor del gen de la lacasa *lap2* tiene una gran significancia fisiológica. Se han reportado múltiples posibles sitios MRE en otros promotores de genes de lacasas (Karahanian y col., 1998; Mansur y col., 1998; Klonowska y col., 2001; Galhaup y col., 2002). Los promotores analizados para *P. ostreatus* muestran varios sitios de regulación MRE: el promotor de POX4 solo presentó uno, pero POX2 presentó cuatro y POX3 presentó cinco. Con respecto a los XRE, estos elementos sólo estuvieron presentes en POX2 y POXA3. El sitio de unión para el elemento de respuesta al estrés solo se presentó en POXA3. Al parecer, los promotores de la familia de lacasas de *Pleurotus ostreatus* son poco conservados (Pezzela y col., 2009).

En este trabajo se obtuvo el gen completo. En la Figura 36 se muestra el alineamiento del gen, que presentó un tamaño de 2636 pb interrumpido por 16 intrones que varían en tamaño entre 47 y 65 pb, y 17 exones, que codifican una proteína de 509 aminoácidos. La cadena de la zona codificante (ADNc) constó de 1527 pb, la cual se

obtuvo mediante la técnica de RT-PCR (apartado 6.4.4). En la Figura 37 se muestra el alineamiento de las tres secuencias utilizadas para determinar la región codificante. Para obtenerlas se diseñaron tres pares de primers: para amplificar el fragmento RNA1 se utilizaron los primers: RLacF1 CGTATGTTTCCAGGCGCA y RLacR1 CATTCTGAGGGGCCACAA; para amplificar el fragmento RNA2: RLacF2 CGACACCATCATTACACTTGAA y RLacR2 GAAGGCCATAGCGAGATTG, y para amplificar la secuencia RNA3 se utilizaron: RLacF3 CTGGAGGCGCAGACATCA y RLacR3 TTGTTTGAATGCAGATGGTTC. Mediante el alineamiento en el programa SeqMan (Lasergene) se obtuvo la cadena que representaba al ARNm, la cual se comparó mediante alineamiento (Megalign) con la secuencia que se tenía del gen completo (Figura 35) para determinar la localización y extensión de intrones y exones.

Majority	ATGTCCAGGGCGACGGATCTCGCTACGCTTACATTAGCTCTTACCTTTTACATGGGACTCATGCTGCCATCGGGCCCAC	
	10 20 30 40 50 60 70 80	
GenLac.seq	ATGTCCAGGGCGACGGATCTCGCTACGCTTACATTAGCTCTTACCTTTTACATGGGACTCATGCTGCCATCGGGCCCAC	80
RT-PCR mRNA	ATGTCCAGGGCGACGGATCTCGCTACGCTTACATTAGCTCTTACCTTTTACATGGGACTCATGCTGCCATCGGGCCCAC	80
Majority	TGGCGACATGTACATCGTCAACGAAGACGTCTCTCCTGACGGCTTCAATCGTTCATAAGTGGATCCTCGGAATCCTTTTG	
	90 100 110 120 130 140 150 160	
GenLac.seq	TGGCGACATGTACATCGTCAACGAAGACGTCTCTCCTGACGGCTTCAATCGTTCATAAGTGGATCCTCGGAATCCTTTTG	160
RT-PCR mRNA	TGGCGACATGTACATCGTCAACGAAGACGTCTCTCCTGACGGCTTCAATCGTTC-----	134
Majority	GCCCCAGCACTAATTGATCACACAGGGCTGTCTCGCTCGCGATGTGCCGCCACAGATGCGGCGTCAGAGACGGCATCG	
	170 180 190 200 210 220 230 240	
GenLac.seq	GCCCCAGCACTAATTGATCACACAGGGCTGTCTCGCTCGCGATGTGCCGCCACAGATGCGGCGTCAGAGACGGCATCG	240
RT-PCR mRNA	-----GGCTGTCTCGCTCGCGATGTGCCGCCACAGATGCGGCGTCAGAGACGGCATCG	189
Majority	GTTACTGGCGTCTCGTTCAAGGAAACAAGGTAACCCATGTCCGCCTTCATGAAGCCGCTCGCTTGTCTACTCTTCTTA	
	250 260 270 280 290 300 310 320	
GenLac.seq	GTTACTGGCGTCTCGTTCAAGGAAACAAGGTAACCCATGTCCGCCTTCATGAAGCCGCTCGCTTGTCTACTCTTCTTA	320
RT-PCR mRNA	GTTACTGGCGTCTCGTTCAAGGAAACAAGG-----	220
Majority	GGGCGATAACTTCCAGCTGAACGTTCTCAATCAACTGTCCGACACGACTATGTTGAAGACCACTAGTATCGTATGTATGA	
	330 340 350 360 370 380 390 400	
GenLac.seq	GGGCGATAACTTCCAGCTGAACGTTCTCAATCAACTGTCCGACACGACTATGTTGAAGACCACTAGTATCGTATGTATGA	400
RT-PCR mRNA	--GCGATAACTTCCAGCTGAACGTTCTCAATCAACTGTCCGACACGACTATGTTGAAGACCACTAGTATC-----	288
Majority	CAATAGTGTTTTAGACGAATATTGACTACCTGCGCAGCATTGGCATGGCTTCTTTCAATCCGGCTCTACGTGGGCAGAT	
	410 420 430 440 450 460 470 480	
GenLac.seq	CAATAGTGTTTTAGACGAATATTGACTACCTGCGCAGCATTGGCATGGCTTCTTTCAATCCGGCTCTACGTGGGCAGAT	480
RT-PCR mRNA.seq	-----CATTTGCATGGCTTCTTTCAATCCGGCTCTACGTGGGCAGAT	330
Majority	GGTATATCCTATAATACGTGCTGCGATGCCTCGCTAATCTTTTTTTTCAAGGACCCGCGTTTCGTGAATCAATGCCCATC	
	490 500 510 520 530 540 550 560	
GenLac.seq	GGTATATCCTATAATACGTGCTGCGATGCCTCGCTAATCTTTTTTTTCAAGGACCCGCGTTTCGTGAATCAATGCCCATC	560
RT-PCR mRNA	GG-----ACCCGCGTTTCGTGAATCAATGCCCATC	360
Majority	GCATCGGGGAACAGCTTCCGTGAGTGTCAATACCTTGTCTTTATCCTTCGTTTCATCGAGATATCTCAGATATGATTTT	
	570 580 590 600 610 620 630 640	
GenLac.seq	GCATCGGGGAACAGCTTCCGTGAGTGTCAATACCTTGTCTTTATCCTTCGTTTCATCGAGATATCTCAGATATGATTTT	640
RT-PCR mRNA	GCATCGGGGAACAGCTTCC-----ATATGATTTT	390
Majority	AACGTTCCCGACCAAGCTGGCAGTTCTGTAAGTTGATTACCATGAAACCAGTTGTGTCTCCTGACCGTATATCCAGGG	
	650 660 670 680 690 700 710 720	
GenLac.seq	AACGTTCCCGACCAAGCTGGCAGTTCTGTAAGTTGATTACCATGAAACCAGTTGTGTCTCCTGACCGTATATCCAGGG	720
RT-PCR mRNA.seq	AACGTTCCCGACCAAGCTGGCAGTTCTG-----G	420
Majority	TACCATTGCGATCTTTCCACCCAGTATTGTGATGGTCTTAGAGGACCATTATAGTGTAAAGTTTCATATCGATAAGACGC	
	730 740 750 760 770 780 790 800	
GenLac.seq	TACCATTGCGATCTTTCCACCCAGTATTGTGATGGTCTTAGAGGACCATTATAGTGTAAAGTTTCATATCGATAAGACGC	800
RT-PCR mRNA.seq	TACCATTGCGATCTTTCCACCCAGTATTGTGATGGTCTTAGAGGACCATTATAGT-----	476

Majority	'TAAGACGCGCCGGCTCAACCGTCTACGCAGATACGACCCCTCCGATCCFCACCTGTCCCTGTATGACGTTGACAACCGG'	
	810 820 830 840 850 860 870 880	
GenLac.seq	TAAGACGCGCCGGCTCAACCGTCTACGCAGATACGACCCCTCCGATCCFCACCTGTCCCTGTATGACGTTGACAACCGG	880
RT-PCR mRNA	-----ATACGACCCCTCCGATCCFCACCTGTCCCTGTATGACGTTGACAACG--	523
Majority	GAGCTGTGAACGTATTCCAGCCGCTGCACCGTGTGACAGTCTCACTTGCAGCCGACACTGTCATTACACTTGCAGATTG	
	890 900 910 920 930 940 950 960	
GenLac.seq	GAGCTGTGAACGTATTCCAGCCGCTGCACCGTGTGACAGTCTCACTTGCAGCCGACACTGTCATTACACTTGCAGATTG	960
RT-PCR mRNA	-----CCGACACTGTCATTACACTTGCAGATTG	551
Majority	GGTACATTTCACTCCCTCAIGGAAATTAATGTGTCTCACTCTTTCTGTAGTACCATGTTGTGGCTCCTCAGAATGCGGT	
	970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040	
GenLac.seq	GGTACATTTCACTCCCTCAIGGAAATTAATGTGTCTCACTCTTTCTGTAGTACCATGTTGTGGCTCCTCAGAATGCGGT	1040
RT-PCR mRNA	G-----TACCAATGTTGTGGCTCCTCAGAATGCGGT	581
Majority	GCTTCCTACTCCTGATAGTACACTCATCAACGGTAAAGGTGCGTTGCGTGGGGGGGCTACTTTCGCTTTGGCTGTATCA	
	1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120	
GenLac.seq	GCTTCCTACTCCTGATAGTACACTCATCAACGGTAAAGGTGCGTTGCGTGGGGGGGCTACTTTCGCTTTGGCTGTATCA	1120
RT-PCR mRNA.seq	GCTTCCTACTCCTGATAGTACACTCATCAACGGTAAAGGTGCGTTGCGTGGGGGGGCTACTTTCGCTTTGGCTGTATCA	661
Majority	ACGTCGAAAGCAACAAGCGATATCGTTTCACTTATCTCGATGCTTTCGACCCCAATTTACAGTTCTCAATCGACGGT	
	1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200	
GenLac.seq	ACGTCGAAAGCAACAAGCGATATCGTTTCACTTATCTCGATGCTTTCGACCCCAATTTACAGTTCTCAATCGACGGT	1200
RT-PCR mRNA.seq	ACGTCGAAAGCAACAAGCGATATCGTTTCACTTATCTCGATGCTTTCGACCCCAATTTACAGTTCTCAATCGACGGT	741
Majority	CACCTTTGCAGGTCATAGAGGAGACGCTGTCAATATTGTGCCTATCGTCGGTATGTCCTTTGCGCTTGGCTTCACTG	
	1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280	
GenLac.seq	CACCTTTGCAGGTCATAGAGGAGACGCTGTCAATATTGTGCCTATCGTCGGTATGTCCTTTGCGCTTGGCTTCACTG	1280
RT-PCR mRNA	CACCTTTGCAGGTCATAGAGGAGACGCTGTCAATATTGTGCCTATCGTCG-----	793
Majority	TCTAAATCGCTGAAATTCGGATGTCGATATTGATGTGGATAGTATTCAAATCTTCGCGGGTAAATTCACCCGCCCTTT	
	1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360	
GenLac.seq	TCTAAATCGCTGAAATTCGGATGTCGATATTGATGTGGATAGTATTCAAATCTTCGCGGGTAAATTCACCCGCCCTTT	1360
RT-PCR mRNA	-----TGGATAGTATTCAAATCTTCGCGGG-----	818
Majority	CATCGAAACTTTGCTAAGCCGACTTTCAAGGCCAACGCTATTCCTTCGTCTTGAATGCCAATCAGACTGTTGACAATTAC	
	1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440	
GenLac.seq	CATCGAAACTTTGCTAAGCCGACTTTCAAGGCCAACGCTATTCCTTCGTCTTGAATGCCAATCAGACTGTTGACAATTAC	1440
RT-PCR mRNA	-----CCAACGCTATTCCTTCGTCTTGAATGCCAATCAGACTGTTGACAATTAC	867
Majority	TGGATTCGTGCAAAATCCCAACTTGGGATCGACTGGTATGGCATCTTGAAGCAACACTTGTGCTTCGCTGACTTCCCTGTA	
	1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520	
GenLac.seq	TGGATTCGTGCAAAATCCCAACTTGGGATCGACTGGTATGGCATCTTGAAGCAACACTTGTGCTTCGCTGACTTCCCTGTA	1520
RT-PCR mRNA	TGGATTCGTGCAAAATCCCAACTTGGGATCGACTGG-----	902
Majority	ATGCCAGCCCTTCGATGGTGGTATCAATTCGCTATCCTTCGGTATGCTGGTGCCACTGAGGATGACCTACCACGACTT	
	1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600	
GenLac.seq	ATGCCAGCCCTTCGATGGTGGTATCAATTCGCTATCCTTCGGTATGCTGGTGCCACTGAGGATGACCTACCACGACTT	1600
RT-PCR mRNA	-----CTTCGATGGTGGTATCAATTCGCTATCCTTCGGTATGCTGGTGCCACTGAGGATGACCTACCACGACTT	973

Majority	CCTCAACCAGCACCCCCCTTCACGACACTAATCTCCTGCCCTTGAAAATCCTGCTGCTCCCGTCCAGCTGTCCCTCGA	
	1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680	
GenLac.seq	CGTCAACGAGCACCCCCCTTGAGGAGACTAATCTCGTGCCCTTGAAAATCCTGCTGCTCCCGTCCAGCTGTCCCTGGA	1680
RT-PCR mRNA.seq	CGTCAACGAGCACCCCCCTTGAGGAGACTAATCTCGTGCCCTTGAAAATCCTGCTGCTCCCGTCCAGCTGTCCCTGGA	1053
Majority	GGCCGAGACATCAACATCAATCTCGCTTATGGCCCTTCGAACGTTACTAACTTTGAATTGACCATCAACGGTACGCAGTC	
	1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760	
GenLac.seq	GGCCGAGACATCAACATCAATCTCGCTTATGGCCCTTCGAACGTTACTAACTTTGAATTGACCATCAACGGTACGCAGTC	1760
RT-PCR mRNA.seq	GGCCGAGACATCAACATCAATCTCGCTTATGGCCCTTCGAACGTTACTAACTTTGAATTGACCATCAACGGT-----	1125
Majority	TAGGTACTTTCAATGCCCTGAAATGGCTGCTCATCGACCCATGGCCAGGTTTCCCCCTTCCAAGCACCGACTGGTAAGCT	
	1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840	
GenLac.seq	TAGGTACTTTCAATGCCCTGAAATGGCTGCTCATCGACCCATGGCCAGGTTTCCCCCTTCCAAGCACCGACTGGTAAGCT	1840
RT-PCR mRNA.seq	-----TCCCCCTTCCAAGCACCGACTG-----	1147
Majority	CAACTCGCCAGCGAAATACCAAAAAAATTGATGTGATATTCCTGTAGCTCCTGTTCTGCTCCAGATTCTGTGGGTGCT	
	1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920	
GenLac.seq	CAACTCGCCAGCGAAATACCAAAAAAATTGATGTGATATTCCTGTAGCTCCTGTTCTGCTCCAGATTCTGTGGGTGCT	1920
RT-PCR mRNA.seq	-----CTCCTGTTCTGCTCCAGATTCTGTGGGTGCT	1179
Majority	ACAACGCGCCCTCGCTTCTTCCTTCAGGTAGTATATACTCGCTAGAAGCCAACAAAGTTGTCGAAATCTCCATACCCGC	
	1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000	
GenLac.seq	ACAACGCGCCCTCGCTTCTTCCTTCAGGTAGTATATACTCGCTAGAAGCCAACAAAGTTGTCGAAATCTCCATACCCGC	2000
RT-PCR mRNA.seq	ACAACGCGCCCTCGCTTCTTCCTTCAGGTAGTATATACTCGCTAGAAGCCAACAAAGTTGTCGAAATCTCCATACCCGC	1259
Majority	CTTAGCTGTTGGAGGACCGGTAAGCCCCAAGCCCCGGCGCCAGAAACCATGTTCTGATAACTATCGCGCTGAACAGCAT	
	2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080	
GenLac.seq	CTTAGCTGTTGGAGGACCGGTAAGCCCCAAGCCCCGGCGCCAGAAACCATGTTCTGATAACTATCGCGCTGAACAGCAT	2080
RT-PCR mRNA.seq	CTTAGCTGTTGGAGGACCG-----CAT	1281
Majority	CCTTCCATCTTCACGGGGTGAGTAATGCGACCCTCACAATCTATCCAACGGCTGATCGACCTCGAATAGCACACGTTC	
	2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160	
GenLac.seq	CCTTCCATCTTCACGGGGTGAGTAATGCGACCCTCACAATCTATCCAACGGCTGATCGACCTCGAATAGCACACGTTC	2160
RT-PCR mRNA.seq	CCTTCCATCTTCACGG-----CACACGTTC	1308
Majority	GACGTCATCAGGAGTCCGGCTCTACTACGTACAACCTTCGACACCCCTGCGCGACGGATGTTGTCAACACTGGAAGTGA	
	2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240	
GenLac.seq	GACGTCATCAGGAGTCCGGCTCTACTACGTACAACCTTCGACACCCCTGCGCGACGGATGTTGTCAACACTGGAAGTGA	2240
RT-PCR mRNA.seq	GACGTCATCAGGAGTCCGGCTCTACTACGTACAACCTTCGACACCCCTGCGCGACGGATGTTGTCAACACTGGAAGTGA	1388
Majority	CGCGAACGACAACGTTACCATCCGCTTTGTGACGGATAATCCAGGCCATGGTTCCCTTCACTGCCACATTGACTGGCATC	
	2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320	
GenLac.seq	CGCGAACGACAACGTTACCATCCGCTTTGTGACGGATAATCCAGGCCATGGTTCCCTTCACTGCCACATTGACTGGCATC	2320
RT-PCR mRNA.seq	CGCGAACGACAACGTTACCATCCGCTTTGTGACGGATAATCCAGGCCATGGTTCCCTTCACTGCCACATTGACTGGCATC	1468
Majority	TCGAAATCGGTCTCGGGTCGTTTTTCGCGAAGATGTCACGTCCATCACGGCCCCACCTGCCCGTGGGACGACTTGTGT	
	2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400	
GenLac.seq	TCGAAATCGGTCTCGGGTCGTTTTTCGCGAAGATGTCACGTCCATCACGGCCCCACCTGCCCGTGGGACGACTTGTGT	2400
RT-PCR mRNA.seq	TCGAAATCGGTCTCGGGTCGTTTTTCGCGAAGATGTCACGTCCATCACGGCCCCACCTGCCCGTGGGACGACTTGTGT	1548

Majority	CCGATTTATGATGCTTTGAGCGATTCCGACAAAGGTGGCATAGCTTGA TAGGTGGCTTTGTTTATTGTTTTATTCTCTGG	
	2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480	
GenLac.seq	CCGATTTATGATGCTTTGAGCGATTCCGACAAAGGTGGCATAGCTTGA TAGGTGGCATTTGTTTATTGATTTAATTACTCG	2480
RT-PCR mRNA	CCGATTTATGATGCTTTGAGCGATTCCGACAAAGGTGGCATAGCTTGA GATCGCTTCCCTAATTCTGCCTATTCATGG	1626
Majority	ACTTAAAGTCGAATTTAGTGGTCTCGTGTTCGTTTTTCGXX	
	2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560	
GenLac.seq	ACTCAAAGGC--ATTTAGCGGTCTCGCGGTGTTTTTCGCGAAGATGTCA CGTCCATCACGGCCCCACCTGGTATGTCTC	2558
RT-PCR mRNA	AAATAAGTCGAAAGAAATAGAACCATCTCCATTCCAAC	1665
Majority	XX	
	2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630	
GenLac.seq	TTCATACCTATCACCGCAGCTTGTGTTCGTATGCATGACCTTCAGTTCTCCAGCCAGCGTGAACGAACCAGTGA	2633
RT-PCR mRNA		1665

Figura 36. Secuencia de nucleótidos del gen de lacasa de *Pleurotus ostreatus*. Mostrando intrones (GenLAC) y exones (DNAcLac).

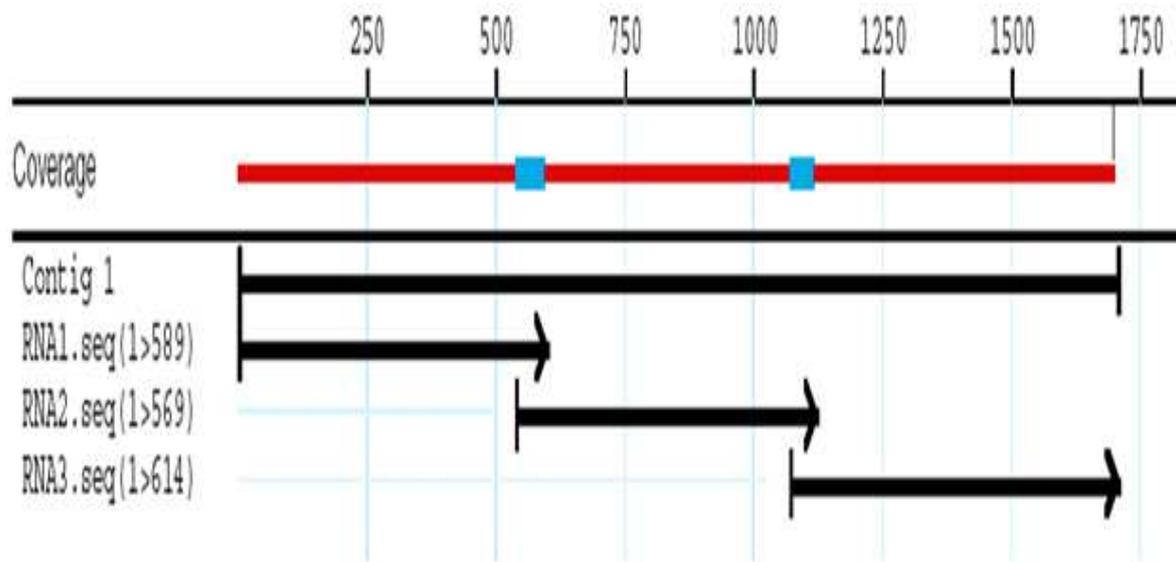


Figura 37. Alineamiento de las secuencias obtenidas por RT-PCR para obtener el cDNA, mediante el programa Lasergene (Seqman).

Se han reportado varias secuencias de ARNm de los genes para varias isoenzimas de lacasas de *Pleurotus ostreatus*, la longitud que se encontró en este trabajo de investigación se parece a la reportada por otros autores: para el gen POX1 se reportó una longitud de 1663 pb y 529 aminoácidos (Giardina y col., 1995), para pox2 un tamaño de 1713 pb, que codifica para 533 aminoácidos (Palmieri y col., 1993), POXA1b presento un ARNm de 1772 pb y 533 aminoácidos (Giardina y col., 1999), POXA3 presentó un tamaño de 1566 pb, que codifica para 521 aminoácidos (Palmieri y col, 2003) y POX4 de 1599 pb, que codifica para 509 aminoácidos (Pezzella y col., 2009). La gran mayoría de los genes muestran un patrón común de codificación para un polipéptido de 520 a 550 residuos de aminoácidos (Baldrian, 2006), excepto POX4. La longitud de los intrones también se ha reportado entre 48-59 pb. En la mayoría de los genes de lacasa de *Pleurotus ostreatus* anteriormente mencionados se han encontrado 19 intrones, aunque en este gen sólo se encuentran 17 (Figura 36). Su localización, sin embargo, está conservada, como ya se ha reportado para los genes de lacasas en los basidiomicetos. La lacasa presentó un posible sitio de poliadenilación AATAAA (Figura 37, línea amarilla) 40 nucleótidos después del codón de terminación (TGA).



El gen de lacasa aislado codifica una proteína de 509 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 38 y se observa que está dentro del rango de número de aminoácidos reportados para este tipo de proteínas.

Todas las secuencias de proteína de lacasas contienen secuencias consenso L1-L4, y en este caso también. En la Figura 39 se muestra la secuencia de aminoácidos, indicándose los sitios de unión de cobre (línea). Además, se localizaron las diez histidinas que se coordinan con los átomos de cobre y cuatro residuos de Cys que pueden estar involucrados en la formación de enlaces disulfuro.

En la Figura 40 se muestra el alineamiento de los aminoácidos que forman al sitio de unión del cobre de la isoforma de lacasa obtenida en este trabajo de investigación (LACCM) con los de las lacasas reportadas para *Pleurotus ostreatus* (POX1, POX3, POX4, LACC12, POXC, POXA1b y POXA3). Se puede observar que se parece a las secuencias POX1 y POX4, encontrándose un porcentaje de similitud significativo. En el análisis de contenido de aminoácidos de la proteína se observó que los aminoácidos que se presentan con más frecuencia fueron: Ala, Asp, Gly, Leu, Ser, Thr y Val, similar a los aminoácidos predominantes de las secuencias POX1 (GenBank Q12739.1), lacasa (GenBank AAR21094.1) y bilirrubin oxidasa (GenBank BAA85185.1) (con la única diferencia que éstas últimas no presentan Asp como aminoácido predominante, sino Pro. En la secuencia de la lacasa sí aparece también este aminoácido, pero con menor frecuencia que Asp).

En el análisis mediante el programa BLAST (NCBI) de la secuencia de la proteína derivada del gen de lacasa secuenciado, se puede observar (Tabla 14) que la proteína presentó alrededor de un 96-97% de semejanza a nivel de aminoácidos con las cuatro secuencias reportadas en el banco de datos, al igual que la isoforma que reportaron Moussa y col. (2009). A nivel de nucleótidos, se observa que el gen completo presentó semejanzas de entre un 86 y un 94%. Utilizando el ARNm, la semejanza fue similar a la encontrada con el gen completo. Se puede concluir que es un gen diferente a los ya reportados en *P. ostreatus*, debido a las diferencias significativas en la secuencia y a

que el protomor presenta grandes diferencias con los promotores ya reportados para estas enzimas. Aparte, la proteína presenta también diferencias en su peso molecular y en las propiedades catalíticas, con respecto a las reportadas hasta la fecha.

Se han reportado siete isoformas de la lacasa para *P. ostreatus* (Pezzella y col., 2009), y se ha propuesto la existencia de una subfamilia de lacasas (que podría consistir de tres miembros, basándose en la similitud de las secuencias y la estructura de los intrones-exones). Además, las investigaciones del genoma de *P. ostreatus* realizadas por el Departamento de Energía e Instituto Conjunto del Genoma (<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/50009.html>, DOE-JGI) han sugerido que la familia de las MCO es compleja y que posiblemente haya nuevos genes que codifican para lacasas, pudiéndose llegar hasta los 12 miembros en esta especie de hongo (Lettera y col., 2010). Los múltiples genes de lacasas en hongos pueden ser una consecuencia de eventos independientes de duplicación y divergencia durante la evolución, de forma que estas secuencias homólogas (genes parálogos) diferirían dentro de la célula de acuerdo a las funciones fisiológicas que cumplan los productos por ellas codificadas. La divergencia debida a la función de las isoenzimas ha sido postulada también para algunos basidiomicetos que poseen la familia de enzimas oxidorreductasas (Lundell y col., 2010). La presencia de algunas de las isoformas puede deberse a sus respectivas funciones *in vivo* y podría explicar el por qué de los múltiples genes que se están reportando, aunque no se haya encontrado aun el ADNc o la proteína correspondientes (Pezzella y col., 2009). Un caso adicional que apoyaría esta hipótesis es la LACC12 (55 kDa por SDS-PAGE), que únicamente se ha encontrado en cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* (Lettera y col., 2010).

```

MSRRTDLATLTLALHLLHGTHAAIGPTGDMYI VNEIDVSPDGFNRSAVVARDVPATDAASETASVTGVLVQGNKGNDFQLN 80
                               L1                               L2
VLNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQSGSTWADGPAFVNQCPIASGNSFLYDFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFIVY 160
DPSDPHLSLYDVDNADTVITLADWYHVAVPQNAVLPDSTLINGKGRFAGGATSALAVINVESNKRYRFRLISMSCDPN 240
FTFSIDGHSLQVIEADAVNIVPIVWDSIQIFAGQRYSFVLNANQTVDNWIIRANPNLGSTGFDGGINSAILRYAGATEDD 320
PTTSSSTSTPLEETNLVPLENPGAPGPAVPGGADININLAYGPSNVTNFELTINGSPFQAPTAPVLLQILSGATTAASLL 400
                               L3
PSGSTYSLEANKVVEISIPALAVGGPHPEHLEHGHTEFDVIRSAGSTTYNFETPARRDVVNTGTDANDNVTIRFVTDNPGPW 480
                               L4
FLHCHIDWHLLEIGLAVVFAEDVTSITAPPAAWDDLCPIDALSDSDKGGIA 531

```

Figura 39. Secuencia de aminoácidos del gen de lacasas de *Pleurotus ostreatus* con los cuatro posibles dominios de unión del cobre.

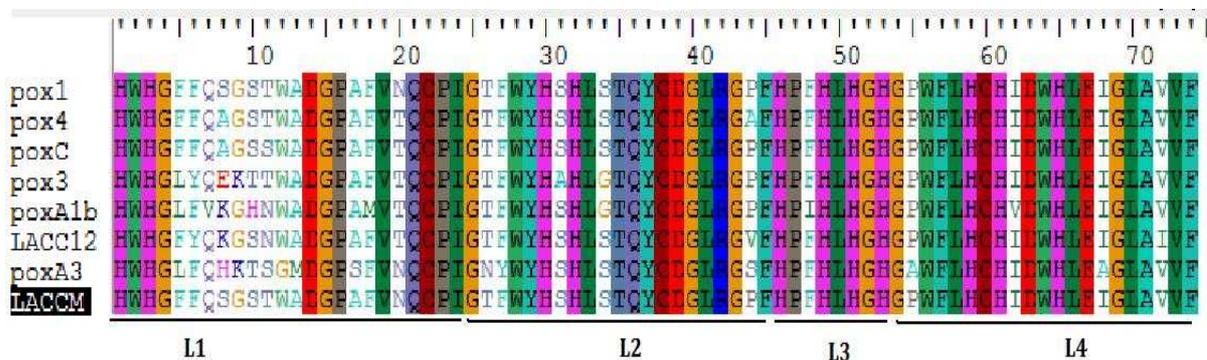


Figura 40. Alineamiento de los cuatro dominios de unión de cobre de la lacasa (LACCM) con otras lacasas reportadas de *P. ostreatus*.

**Tabla. 14. Comparación del gen, RNAm y aminoácidos de la lacasa de *Pleurotus ostreatus* con secuencias NCBI (GenBank).**

No. Acceso	Descripción	% Max ident
<b>Gen</b>		
Z22591.1	<i>P.ostreatus</i> diphenol oxidase gene	94
GU953215.1	<i>Pleurotus eryngii</i> laccase gene, complete cds	92
EU031523.1	<i>Pleurotus eryngii</i> laccase (lac4) gene, partial cds	90
Z34848.1	<i>P.ostreatus</i> pox2 mRNA for diphenol oxidase	86
<b>cDNA</b>		
Z34847.1	<i>P.ostreatus</i> pox1 mRNA for diphenol oxidase	94
AY485827.1	<i>Pleurotus ostreatus</i> laccase mRNA, complete cds	94
Z34848.1	<i>P.ostreatus</i> pox2 mRNA for diphenol oxidase	84
AB020026.1	<i>P. ostreatus</i> mRNA for bilirubin oxidase, complete cds	84
<b>Aminoácidos</b>		
Q12729.1	<i>P. ostreatus</i> diphenol oxidase 1	96
AAR82932.1	laccase [ <i>Pleurotus ostreatus</i> ]	96
AAR21094.1	laccase [ <i>Pleurotus ostreatus</i> ]	96
CAO79914.1	laccase [ <i>Pleurotus eryngii</i> ]	96

## 8. CONCLUSIONES

Se puede afirmar que estamos en presencia de una lacasa de *Pleurotus ostreatus* no descrita hasta la fecha, ya que se encontraron diferencias con respecto a las ya reportadas. El peso molecular encontrado es de aproximadamente 54.1 kDa (SDS-PAGE), el cual no sido reportado en los anteriores trabajos. En el análisis de BLAST (NCBI) se puede observar que la similitud con las otras secuencias del banco de genes, tanto en proteína, ARNm y gen completo no alcanza el 100%, siendo bastante inferior en el caso del ADN y el ARNm.

El promotor presentó diferencias con los ya reportados para lacasas de *Pleurotus ostreatus*, ya que no se habían reportado posibles elementos de repuesta al estrés y de defensa. Además, en este promotor no se encontraron elementos de repuesta a choque térmico, como los reportados para POXA1b.

Se confirma que la proteína es extracelular, el péptido señal consto de 22 aminoácido. Comparando las secuencias con las de los péptidos señal reportados para las otras proteínas, el tamaño (de aproximadamente 20-24 aminoácidos) y la secuencia fue semejantes.

Los factores transcripcionales son de suma importancia en la expresión de genes, por lo que se podría proponer que la producción de más lacasas en medio líquido podría deberse a respuestas o mecanismo de defensa del organismo al estrés o la presencia de cobre (como ya se había reportado en *Trametes*, hongo que en estos casos incrementa la producción de pigmentos). En trabajos sin la presencia de cobre se ha observado que el medio presenta menos contenido de pigmentos, y la presencia de factores de transcripción XRE, respuesta al estrés y de defensa permiten suponer que el organismo buscará alternativas fisiológicas en caso de mantenerse en condiciones no óptimas de crecimiento.

## 9. PERSPECTIVAS

1. Sobreexpresar el gen de lacasa caracterizado en este trabajo, buscando incrementar su producción.
2. Realizar expresión heteróloga en un organismo de rápido crecimiento, como *Aspergillus niger*, lo que permitiría la producción de lacasa en menor tiempo.
3. Evaluar si la diferencia en producción de lacasas observada en FML y FMS está regulada por algún tipo de estrés.
4. Explicar el rol biológico de esta lacasa en *Pleurotus ostreatus*, debido a que es la forma predominante. Este objetivo podría abordarse por silenciamiento del gen, determinándose su efecto sobre la fisiología del organismo.

## 10. REFERENCIAS

- Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K-H., Covaco-Paulo A. y Gübitz. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Applied and Environment Microbiology* 66: 3357-3362.
- Aguilar C.N., Augur C., Favela-Torres E. y Viniegra-González G. (2001). Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 26: 296-302.
- Ainsworth A.M. y Rayner A.D.M. (1991). Ontogenic stages from coenocyte to basidiome and their relation to phenoloxidase activity and colonisation processes in *Phanerochaete magnoliae*. *Mycology Research* 95: 1414-1422.
- Alexandre G., Bally R., Taylor B.L. y Zhulin I.B. (1999). Loss of cytochrome oxidase activity and acquisition of resistance to quinone analogs in a laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum*. *Journal Bacteriology* 181: 6730–6738.
- Amir L., Tam T.K., Pita M., Meijler M.M., Alfonta L. y Katz E. (2009). Biofuel cell controlled by enzyme logic systems. *Journal of the American Chemical Society* 131: 826-832.
- Anderson W.F. y Akin D.E. (2008). Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 355-366.
- Arakane Y., Muthukrishnan S., Beeeman R., Kanost M.Y. y Kramer K. (2005). Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Developmental Biology* 102: 11337-11342.
- Aramayo R. y Timberlake W.E. (1990). Sequence and molecular structure of *Aspergillus nidulans* *yA* (laccase I) gene. *Nucleic Acids Research* 18: 3415-3418.
- Asgher M., Bhatti HN., Ashraf M. y Legge RL. (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19: 771-783.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D., Smith J.A., Seidman J.G. y Struhl K. (1987). *Current protocol in molecular biology*. Greene Publishing Associates. Brookly, Nueva York.
- Baborova P., Moder M., Baldrian P., Cajthamlova K. y Cajthaml T. (2006). Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology* 157: 248-253.
- Bajpai P. (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress* 15: 147-157 70.
- Baldrian P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215-242.

- Berka R. M., Schneider P., Golightly E. J., Brown S. H., Madden M., Brown K. M., Halkier T., Mondorf K. y Xu F. (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied Environmental Microbiology* 63: 3151-3157.
- Bertrand T., Jolivald C., Briozzo P., Caminade E., Joly N., Madzak C. y Mougín C. (2002). Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41: 7325-7333.
- Bourbonnais R., Paice M.G., Reid I.D., Lanthier P. y Yaguchi M. (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in Kraft lignin depolymerization. *Applied Environmental Microbiology* 61: 1876-1880.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Breene W.M. (1990). Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection* 53: 883-894.
- Camarero S., Sarkar S., Ruiz-Duenas F.J., Martínez M.J. y Martínez A.T. (1999). Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *Journal of Biological Chemistry* 274: 10324-10330.
- Cassland P. y Jönsson L.J. (1999). Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 393-400.
- Champagne P. (2007). Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: A Canadian perspective Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues in Canada. *Resources, Conservation and Recycling* 50: 211-230.
- Chang S.T. (1999). Global impact of edible and medicinal mushroom on human welfare in the 21st century: non-green evolution. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1: 1-7.
- Chefetz B., Chen Y. y Hadar Y. (1998). Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3175-3179.
- Chen J. y Seviour R. (2007). Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1/3), (1/6)-glucans. *Mycology Research* 111: 635-652.
- Chiu S.W. (1996). Nuclear changes during fungal development. In: Chiu S-W, Moore D (eds) *Patterns in fungal development*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 105-125.

- Clarke L. y Carbon J. (1976). A colony bank containing synthetic Co/EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9: 91.
- Claus H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives Microbiology* 179: 145-150.
- Claus H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*: 35: 93-96.
- Cohen R., Persky L. y Hadar Y. (2002) Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 582-594.
- Coll P.M., Fernandez-Abalos J.M., Villanueva J.R., Santamaria R. y Perez P. (1993). Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete M1 (CECT 2971). *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2607-2613.
- Collins P.J. y Dobson A.D.W. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied Environment Microbiology* 63: 3444-3450.
- Confortin F.G., Marchetto R., Bettin F., Camassola M., Salvador M. y Dillon P.A.J. (2008). Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 1149-1155.
- Daba A.S. y Ezeronye O.U. (2003). Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher Basidiomycete mushrooms. *African Journal of Biotechnology* 2: 672-678.
- De Marco A. y Roubelakis-Angelakis K.A. (1997). Laccase activity could contribute to cell-wall reconstitution in regenerating protoplasts. *Phytochemistry* 46: 421-425.
- Dedeyan B., Klonowska A., Tagger S., Tron T., Iacazio G., Gil G. y Le Petit J. (2000). Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 925-929.
- Diamantidis G., Effosse A., Potier P. y Bally R. (2000). Purification and characterization of the first bacterial laccases in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 919-927.
- Díaz-Godínez G., Soriano J., Augur C. y Viniegra-González G. (2001). Exopectinases Produced by *Aspergillus niger* in Solid-State and Submerged Fermentation: A Comparative Study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 271-275.
- Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Brown S.H., Østergaard P., Schneider P., Yaver D.S., Pedersen A.H. y Davies G.J. (1998). Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology* 5: 310-316.
- 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.

- Edens W.A., Goins T.Q., Dooley D. y Henson JM. (1999). Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3071-3074.
- Eggert C., LaFayette P.R., Temp U., Eriksson K.-E. y Dean J. (1998). Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1766-1772.
- Eggert C., Temp U. y Eriksson K.E. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarius*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1151-1158.
- Elissetche J.P., Ferraz A., Freer J. y Rodríguez J. (2006). Influence of forest soil on biodegradation of *Drimys winteri* by *Ganoderma australe*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 57: 174-178.
- Faraco V., Ercole C., Festa G., Giardina P., Piscitelli A. y Sannia G. (2008). Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77:1329-1335.
- Faraco V., Giardina P. y Sannia G. (2003). Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* 149: 2155-2162.
- Farman M.L. y Leong S.A. (1995). Genetic and physical mapping of telomeres in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genetics* 140: 479-492.
- Fernández-Larrea J. y Stahl U. (1996) Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Molecular Genetics & Genomics* 252: 539-551.
- Ferraroni M., Myasoedova N.M., Schmatchenko V., Leontievsky A.A., Golovleva L.A., Scozzafava A. y Briganti F. (2007). Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. *BMC Structural Biology* 7: 60-72.
- Froehner S.C. y Eriksson K.E. (1974). Purification and properties of *Neurospora crassa* laccases. *Journal of Bacteriology* 120: 458-465.
- Fukushima Y. y Kirk T.K. (1995). Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispota* lignin-degrading system. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 872-876.
- 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., Strauss J. y Haltrich D. (2002). Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169.
- Garavaglia S., Cambria M.T., Miglio M., Ragusa S., Iacobazzi V., Palmieri F., D'Ambrosio C., Scaloni A. y Rizzi M. (2004). The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *Journal of Molecular Biology* 342: 1519-1531.

- Garzillo A.M.V., Colao M.C., Caruso C., Caporale C., Celletti D. y Buonocore V. (1998). Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49: 545-551.
- Gavnholt B. y Larsen K. (2002). Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiology Plant* 116: 273-280.
- Germann U.A., Müller G., Hunziker P.E. y Lerch K. (1998). Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. Amino and carboxyl terminal processing of a precursor. *Journal Biology Chemistry* 263: 885-896.
- Gianfreda L., Xu F. y Bollag J.M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3: 1-25.
- Giardina P., Aurilia V., Cannio R., Marzullo L., Amoresano A., Siciliano R., Pucci P. y Sannia G. (1996). The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *European Journal of Biochemistry* 235: 508-515.
- Giardina P., Cannio R., Martirani L., Marzullo L., Palmieri G. y Sannia G. (1995). Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2408-2413.
- Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S. y Sannia G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 369-385.
- 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* 34: 655-663.
- Gochev V.K. y Krastanov A.I. (2007). Fungal laccases. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 13: 75-83.
- Gold M. y Alic M. (1993). Molecular biology of the lignin-Degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews* 57: 605-622.
- Guinberteau J. (1990). Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushrooms classification. *Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons (Francia)* 48: 261-264.
- Haibo Z. Yinglong Z. Feng H. Peiji G. y Jiachuan C. (2009). Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters* 31: 837-843.
- Hakulinen N., Andberg M., Kallio J., Koivula A., Kruus K. y Rouvinen J. (2008). A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccases. *Journal of Structural Biology* 162: 29-39.
- Hakulinen N., Kiiskinen L.L., Kruus K., Saloheimo M., Paananen A., Koivula A. y Rouvinen J. (2002). Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural & Molecular Biology* 9: 601-605.
- Hamer D.H. (1986). Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* 55: 913-951.

- Heinzkill M., Bech L., Halkier T., Schneider P. y Anke T. (1998). Characterization of laccase and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1601-1606.
- Herrera T. y Ulloa M. (1998). El reino de los hongos: micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica. México, D.F.
- Hilden K. Hakala T.K. y Lundell T. (2009). Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnology Letters* 31: 1117-1128.
- Hoegger P.J., Kilaru S., James T.Y., Thacker J.R. y Kues U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* 273: 2308-2326.
- Hoegger P.J., Navarro-Gonzalez M., Kilaru S., Hoffmann M., Westbrook E.D. y Kues U. (2003). The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Current Genetics* 45: 9-18.
- Hölker U., Höfer M. y Lenz J. (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64:175–186.
- Hublik G. y Schinner F. (2000). Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 330-336.
- Hunolstein C.V., Valenti P., Visca P., Antonini G., Nicolini L. y Orsi N. (1986). Production of laccase A and B by a mutant strain of *Trametes versicolor*. *Journal of Genetic and Applied Microbiology* 32:185-191.
- Johansson T., Welinder K.G. y Nyman P.O. (1993). Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. II. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300: 57-62
- Kägi J.H.R. y Schäffer A. (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27: 8509-8515.
- Kananen D.L., LaPolt D.L. y McDaniel J.A. (2000). Mushroom casing spawn U.S. Patent 6,073,388.
- Kaneko S., Cheng M., Murai H., Takenaka S., Murakami S. y Aoki K (2009). Purification and characterization of an extracellular laccase from *Phlebia radiata* strain BP-11-2 that decolorizes fungal melanin. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 73: 939-942.
- Karahanian E., Corsini G., Lobos S. y Vicuña R. (1998). Structure and expression of a laccases gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1443: 65-74.
- Klein K. (1996). Pattern formation and development of the fungal mycelium. *Patterns in fungal development* (Ed. Sui-Wai Chiu y David Moore). pp 70-82. Cambridge University Press. Great Britain.

- Klonowska A., Le Petit J. y Tron T. (2001). Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. *FEMS Microbiology Letters* 200: 25-30.
- Kofujita H., Ohta T., Asada Y. y Kuwahara M. (1991). Purification and characterization of laccase from *Lentinus edodes*. *Mokuzai Gakkaishi* 37: 562-569.
- Kües U. y Liu Y. (2000). Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 141-152
- Kumar S.V.S., Phale P.S., Durani S. y Wangikar P.P. (2003). Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering* 83: 386-394.
- Kunitz M. (1947). Crystalline soy bean trypsin inhibitor. || General properties. *Journal General Physiology* 30: 291.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larraya L.M., Pérez G., Peñas M.M., Baars J.J.P., Mikosch T.S.P., Pisabarro A.G. y Ramírez L. (1999). Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3413-3417.
- Leatham G.F. y Stahmann M.A. (1981). Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *Journal of General Microbiology* 125: 147-157.
- Lehninger A.L. (1979). *Bioquímica*. 2a edición. Omega. Barcelona, España. 203-205.
- Lenz J y Hölker U. (2004). Trickle-film processing: an alternative for producing fungal enzymes. *BIOforum Europe* 6: 55-7.
- Leontievsky A., Myasoedova N., Pozdnyakova N. y Golovleva L. (1997a). "Yellow" laccase of *Panus tigrinus* oxidizes nonphenolic substrates without electron-transfer mediators. *FEBS Letters* 413: 446-448.
- Leontievsky A.A., Vares T., Lankinen P., Shergill J.K., Pozdnyakova N.N., Myasoedova N.M., Kalkkinen N., Golovleva L.A., Cammack R., Thurston C.F. y Hatakka A. (1997b). Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiology Letters* 156: 9-14.
- Lettera V., Piscitelli A., Leo G., Birolo L., Pezzella C. y Sannia G. (2010). Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. *Fungal Biology* 114: 724-730.
- Litthauer D., Jansen Van Vuuren M., Van Tonder A. y Wolfaardt F.W. (2007). Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme and Microbial Technology* 40: 563-568.
- Litvintseva A. P. y Henson J.M. (2002). Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Applied and Environment Microbiology* 68:1305-1311.
- Liu G.Q. y Wang X.L. (2007). Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide

- production by *Agaricus blazei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 78-83.
- Lomascolo A., Stentelaire C., Asther M. y Lesage-Meesen L. (1999). Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for food industry. *Focus* 17: 282-289.
- Lonsane B.K., Ghildyal N.P., Budiartman S. y Ramakrishna S.V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbiology Technology* 7: 258-265.
- Lundell T. K., Mäkelä M.R. y Hildén K. (2010). Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes –ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology* 50: 5–20
- Mai C. Kues U. y Militz H. (2004). Biotechnology in the wood industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 477-494.
- Maniatis T., Fritsch E.F. y Sambrook J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Mansur M., Suarez T. y González A.E. (1998). Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied Environment Microbiology* 64: 771-774.
- Martins L.O., Soares C.M., Pereira M.M., Teixeira M., Costa T., Joanes G.H. y Henriques A.O. (2002). Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal Biology Chemistry* 277: 18849-18859.
- Marzullo L., Cannio R., Giardina P., Santini M.T. y Sannia G. (1995). Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase oxidized substrates. *Journal of Biological Chemistry* 270: 3823-3827.
- Mata G y Salmones. 2003. Edible mushroom cultivation at the Institute of Ecology in Mexico. *Micologia Aplicada International* 15:23-29.
- Matera I., Gullotto A., Tilli S., Ferraroni M., Scozzafava A. y Briganti F. (2008). Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate. *Inorganica Chimica Acta* 361: 4129-4137.
- Mayer A.M. y Staples R.C. (2000). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Merchant S., Hill K. y Howe G. (1991). Dynamic interplay between two copper-titrating components in the transcriptional regulation of Cytochrome c6. *The EMBO Journal* 10: 1383-1389.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-429.
- Min K.L., Kim Y.H., Kim Y.W., Jung H.S. y Hah Y.C. (2001). Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 392: 279-286.

- Minussi R., Pastore G.M. y Duran N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 13: 205-216.
- Moore D. (1998). *Fungal morphogenesis*. Cambridge University Press. New York.
- Moussa T. (2009). Molecular characterization of the phenol oxidase (pox2) gene from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 298: 131-142
- Mukhopadhyay R., Chatterjee S., Chatterjee B.P. y Guha A.K. (2005). Enhancement of biomass production of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in whey by plant growth hormones. *Process Biochemistry* 40: 1241-1244.
- Mullis K.B. y Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155: 335-350. ed. R. Wu. Ed Academic Press, San Diego E.U.A.
- Nagai M., Sato T., Watanabe H., Saito K., Kawata M. y Enei H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 327-335.
- Nakamura K. y Go N. (2005). Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 2050-2066.
- Niku-Paavola K.E., Salola P. y Raunio V. (1988). Lignolytic enzymes of the white rot fungus *Phlebia radiata*. *Journal of Biochemistry* 254: 877-884.
- Niku-Paavola M.L., Karhunen E., Kantelinen A., Viikari L., Lundell T. y Hatakka A. (1990). The effect of culture conditions on the production of lignin modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Journal of Biotechnology* 13: 211-221
- Ohga S. y Royse D.J. (2001). Transcriptional regulation of laccase and cellulose genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. *FEMS Microbiology Letters* 201: 111-115.
- Ohga S., Smith M., Thurston C.F. y Wood D.A. (1999). Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes in the mycelium of *Agaricus bisporus* during fruit body development on a solid substrate. *Mycology Research* 103: 1557-1560.
- Ong E., Pollock W.B. y Smith M. (1997). Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor*. *Gene* 196: 113-119.
- Ooi V.E. y Liu F.A. (1999). A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1: 196-206.
- Palmieri G., Cennamo G., Faraco V., Amoresano A., Sannia G. y Giardina P. (2003). A typical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 220-230.
- 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: 31301-31307.

- Palmieri G., Giardina P., Marzullo L., 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.
- Palonen H., Saloheimo M., Viikari L., y Kruus K. (2003). Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 854-862.
- Pandey A., Soccol C.R. y Mitchell D. (2000). New developments in solid state fermentation: I–Bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35: 1153-1169.
- Peberdy J.F., Hanifah A. H. y Jia J.H. (1993). New perspectives on the genetics of *Pleurotus*. En Chang S.T., Buswell J.A. y Chiu S.W. (ed.), *Mushroom biology and mushroom products*. The Chinese University Press, Hong Kong. pp 55–62
- Pezzella C., Autore F., Giardina P., Piscitelli A., Sannia G. y Faraco V. (2009). The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics* 55: 45-57.
- Piontek K., Antorini M. y Choinowski T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry* 277: 37663-37669.
- Pozdnyakova N.N., Rodakiewicz-Nowak J. y Turkovskaya O.V. (2004). Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* 30: 19-24.
- Pozdnyakova N.N., Turkovskaya O.V., Yudina E.N. y Rodakiewicz-Nowak Y. (2006). Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: purification and characterization. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42: 56-61.
- Ranocha P., McDougall G., Hawkins S., Sterjiades R., Borderies G., Stewart D., Cabanes-Macheteau M., Boudet A.M. y Goffner D. (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases –a divergent gene family- in poplar. *European Journal of Biochemistry* 259: 485-495.
- Record E., Punt P.J., Chamkha M., Labat M., Van den Hondel C.A. y Asther M. (2002). Expresión of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinante enzyme. *Europe Journal of Biochemistry* 269: 602-609.
- Rehman A.U. y Thurston C.F. (1992). Purification of laccase I from *Armillaria mellea*. *Journal of General Microbiology* 138: 1251-1257.
- Revankar M.S. y Lele S.S. (2007). Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresource Technology* 98: 775-780.
- Rigling D. y Van Alfen N. (1993). Extra-intracellular laccase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3634-3639.

- Rodgers C.J., Blanford C.F., Giddens S.R., Skamnioti P., Armstrong F.A. y Gurr S.J. (2009). Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?. *Trends in Biotechnology* 28: 63-72.
- Rogalski J., Lundell T., Leonowicz A. y Hatakka A. (1991). Production of laccases, lignin peroxidase and manganese dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture condition. *Acta Microbiologica Polonica* 40: 221-234.
- Rogalski J., Szczodrak J. y Janusza, G. (2006). Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. *Bioresource Technology* 97: 469-476.
- Rosconi F., Fraguas L.F., Martínez-Drets G. y Castro-Sowinski S. (2005). Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme Microbiology Technology* 36: 800-807.
- Ruiz-Dueñas F.J., Camarero S., Pérez-Boada M., Martínez M.J. y Martínez A.T. (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochemical Society Transactions* 29: 116-122.
- Sagawa I. y Nagata Y. (1992). Analysis of chromosomal DNA of mushrooms in genus *Pleurotus* by pulsed field gel electrophoresis. *Journal of General and Applied Microbiology* 38: 47-52.
- Salas C., Lobos S., Larrain J., Salas L., Cullen D. y Vicuña R. (1995). Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 21: 323-333.
- Saloheimo M., Niku-Paavola M.L. y Knowlws J.K.C. (1991). Isolation and structural analysis of the laccase gene lignin-degrading fungus *Phlebia radiate*. *Journal of General Microbiology* 137:1537-1544.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sánchez C. (2004). Modern aspects of mushroom culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64:756-762
- 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.
- Scherer M. y Fischer R. (2001). Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters* 199: 207-213.
- Schneider P., Caspersen M.B., Mondorf K., Halkier T., Skov L.K., Ostergaard P.R., Brows S.H. y Xu F. (1999). Characterization of a *Coprinus cinereus* laccases. *Enzyme Microbial Technol* 25: 502-508.
- Schoemaker H.E. (1990). On the chemistry of lignin biodegradation. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 109: 255-272.

- Schwarze F., Engels J. y Mattheck C. (2000). Fundamental aspects. In Fungal strategies of wood decay in trees. Springer. pp 5-31.
- Sharma K.K. y Kuhad R.C. (2008). Laccases: enzyme revisited and function redefined. *Indian Journal of Microbiology* 48: 309-316.
- Shleev S.V., Khan I.G., Morozova O.V., Mazhugo Y.M., Khalunina A.S. y Yaropolov A.I. (2004). Phenylpyrazolones, novel oxidoreductase redox mediators for degradation of xenobiotics. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 40:140-5.
- Soden D.M. y Dobson A.D.W. (2001). Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 148: 1755-1763.
- Solano F., García E., Pérez de Egea E. y Sánchez-Amat A. (1997). Isolation and characterization of strain MMB-1 a novel melanogenic marine bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3499-3506.
- Solé M., Kellner H., Brock S., Buscot F. y Schlosser D. (2008). Extracellular laccase activity and transcript levels of putative laccase genes during removal of the xenoestrogen technical nonylphenol by the aquatic hyphomycete *Clavariopsis aquatica*. *FEMS Microbiology Letters* 288: 47-54.
- Solomon E.I., Sundaram U.M. y Machonkin T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96: 2563-2605.
- Sonnenberg A.M., de Groot P.W.J., Schaap P.J., Baars J.J.P., Visser J. y Van Griensven L. (1996). Isolation of expressed sequence tags of *Agaricus bisporus* and their assignment to chromosomes. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4542-4547.
- Specht C.A., DiRusso C.C., Novotny C.P. y Ulrich R.C. (1982). A method for extraction high-molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical Biochemistry* 119: 158-163.
- Stamets P. y Chilton J.S. (1983). *The Mushroom Cultivation*. Washington. Ed Agarikon Press Olympia pp 415.
- Suzuki T., Endo K., Ito M., Tsujibo H., Miyamoto K. y Inamori Y. (2003). A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67: 2167-2175.
- Téllez-Téllez M., Fernández J.F., Montiel-González A.M., Sánchez C. y Díaz-Godínez G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 675-679.
- Téllez-Téllez M., Sánchez C., Loera O. y Díaz-Godínez G. (2005). Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase for *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters* 27:1391-1394.
- Thiele D.J. (1992). Metal regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 20: 1183-1191.

- Thurston C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.
- Tlecuitl-Beristain S., Sánchez C., Loera O., Robson G.D. y Díaz-Godínez G. (2008). Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: Production of a novel laccase isoform. *Mycological Research* 112: 1080-1084.
- Umar M.H. y Van Griensven L. (1998). The role of morphogenesis cell death in histogenesis of the mycelia cord of *Agaricus bisporus* and in the development of macrofungi. *Mycological Research* 102: 719-735.
- Vetvicka V. y Yvin J.C. (2004). Effects of marine  $\beta$ -1,3 glucan on immune reactions. *International Immunopharmacology* 4: 721-730.
- Viniegra-González G. (1997). Solid state fermentation: Definition, characteristics, limitations and monitoring. In *Advances in Solid State Fermentation*. pp-5-18. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
- Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar C.N., Romero-Gómez S.J., Díaz-Godínez G. y Augur C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* 13: 157-167.
- Vries O.M.H., Kooistra W.H.C.F. y Wessels G.H. (1986). Formation of an extracellular laccase by *Schizophyllum commune* dikaryon. *Journal of General Microbiology* 132: 2817-2826.
- Wahleithner J.A., Xu F., Brown K.M., Brown S.H., Golightly E.J., Halkier T., Kauppinen S., Pederson A. y Schneider P. (1996). The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 29: 395-403.
- Wang Y. y McNeil B. (1995). pH effects on exopolysaccharide and oxalic acid production in cultures of *Sclerotium glucanicum*. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 124-130.
- Wei H., Xu Q., Taylor L.E., Baker J.O., Tucker M.P. y Ding S.Y. (2009). Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Current Opinon in Biotechnology* 20: 330-338.
- 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.
- Williamson P.R. (1994). Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *Journal Bacteriology* 176: 656-664.
- Wood D.A. (1980). Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology* 117: 327-338.

- Yaver D.S. y Golightly E.J. (1996). Cloning and characterization of three laccase genes of the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene* 181: 95-102.
- Yaver D.S., Overjero M.J., Xu F., Nelson B.A., Brown K.M., Halkier T., Bernauer S., Brown S.H. y Kauppinen S. (1999). Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase lcc1. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4943-4948.
- Zhu Y., Knol W., Smits J.P., y Bol J. (1996). Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-stated fermentation using polyurethane foam as inert carrier. *Enzyme and Microbial Technology* 18: 108-112.
- Zolan M.E. (1995). Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiological Reviews* 59: 686-698.