

**Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas**  
**PEDECIBA Biología**

**Enzimas con potenciales aplicaciones tecnológicas:**  
**Producción de una enzima laccasa de origen bacteriano**

**Lic. Victoria Braña**

**Directora: Dra. Susana Castro**

**Co-director: Dr. Raúl Platero**

Tribunal: Dra. Angela Cabezas  
Dra. Ana Ramón  
Dra. Laura Franco-Fraguas

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Unidad de Microbiología Molecular

Abril 2016

# Contenido

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....</b>	<b>8</b>
<b>ESTRUCTURA DE LA TESIS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>1. CONSIDERACIONES GENERALES .....</b>	<b>12</b>
<b>2. LACCASAS.....</b>	<b>13</b>
2.1 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS .....	13
2.2 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES .....	15
2.3 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO.....	16
2.4 MECANISMO DE REACCIÓN DE LAS LACCASAS .....	16
2.5 LOCALIZACIÓN CELULAR .....	18
2.6 DISTRIBUCIÓN .....	19
2.7 LACCASAS: ENZIMAS CON MÚLTIPLES TAREAS.....	21
2.8 SISTEMAS LACCASA-MEDIADOR ( <i>LMS</i> EN INGLÉS) .....	25
2.9 LACCASAS: ENZIMAS CON DIVERSAS APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS .....	26
2.9.1 Industria textil .....	26
2.9.2 Nanobiotecnología .....	28
2.9.3 Síntesis química.....	29
2.9.4 Industria farmacéutica .....	30
2.9.5 Biorremediación.....	31
2.9.6 Industria alimenticia.....	31
2.9.7 Industria papelera .....	32
2.10 PRODUCTOS COMERCIALES ACTUALMENTE DISPONIBLES .....	33
<b>3. ANTECEDENTES DE TRABAJO .....</b>	<b>34</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>37</b>
<b>MARCO TEÓRICO Y ESTRATEGIA DE TRABAJO .....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>39</b>
1.1 MICROORGANISMO.....	39

1.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LACCASA, CONCENTRACIÓN PROTEICA Y CONTROLES ELECTROFORÉTICOS .....	39
1.2.1. Cultivo de células de Sm CE52G .....	39
1.2.2. Obtención del extracto celular .....	39
1.2.3. Determinación de la actividad laccasa .....	39
1.2.4. Cuantificación proteica de los extractos enzimáticos .....	40
1.2.5. Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	40
1.2.6. Actividad enzimática en gel de poliacrilamida - zymogramas .....	40
1.3 PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA ENZIMA LACCASA DE SM CE52G .....	41
1.3.1. Estrategia i - Purificación por IMAC y análisis por electroforesis bidimensional .....	41
1.3.2. Estrategia ii - Purificación por cromatografía de intercambio iónico seguido de IMAC y control por SDS-PAGE.....	42
1.3.3. Tinción de proteínas en gel SDS-PAGE con Nitrato de Plata.....	44
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
1.1 PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA ENZIMA LACCASA PRODUCIDA POR SM CE52G .....	45
1.1.1. Estrategia i - Purificación por IMAC y análisis por electroforesis bidimensional .....	45
1.1.2. Estrategia ii - Purificación por cromatografía de intercambio iónico seguido de IMAC y control por SDS-PAGE.....	52
 <b>CAPÍTULO 2 .....</b>	 <b>55</b>
 <b>MARCO TEÓRICO Y ESTRATEGIA DE TRABAJO .....</b>	 <b>56</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>57</b>
2.1 MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	57
2.2 AMPLIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA LACCASAS UTILIZANDO CEBADORES DEGENERADOS .....	57
2.2.1. Extracción de ADN genómico .....	57
2.2.2. Amplificación mediante PCR .....	58
2.2.3. Purificación de los productos de amplificación.....	59
2.2.4. Clonado de los productos de amplificación .....	59
2.2.5. Preparación de células quimio-competentes .....	59
2.2.6. Transformación a células quimio-competentes.....	59
2.2.7 Extracción del ADN plasmídico y secuenciación del inserto .....	60
2.2.8. Diseño de cebadores específicos y amplificación .....	60
2.3 OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN CODIFICANTE PARA LA LACCASA .....	61
2.3.1. Análisis filogenético de la secuencia codificante .....	64
2.3.2. Análisis in silico de la secuencia codificante .....	64
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>66</b>
2.1 AMPLIFICACIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA LACCASAS UTILIZANDO CEBADORES DEGENERADOS .....	66
2.2 OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN CODIFICANTE PARA LA MULTICOBRE OXIDASA DE PSEUDOMONAS SP. AU10 Y SU CONTEXTO GENÓMICO .....	70
2.2.1. Análisis filogenético de la secuencia codificante .....	72

2.2.2. Análisis in silico de la secuencia codificante .....	77
---	----

### **CAPÍTULO 3 .....** **83**

#### **MARCO TEÓRICO Y ESTRATEGIA DE TRABAJO .....** **84**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS.....** **86**

##### 3.1 MICROORGANISMOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS.....

86

##### 3.2 PRODUCCIÓN DE LAC458 EN *E. COLI* .....

86

##### 3.2.1. Construcción del vector de expresión.....

86

##### 3.2.2. Transformación de las cepas de expresión .....

88

##### 3.2.3. Ensayos de expresión .....

89

##### 3.2.4. Expresión en condiciones de microaerobiosis y presencia de Cu<sup>2+</sup> .....

89

##### 3.2.5. Preparación del extracto y fraccionamiento celular .....

89

##### 3.2.6. Determinación de la actividad laccasa .....

90

##### 3.3 SOLUBILIZACIÓN, PLEGAMIENTO *IN VITRO* Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA.....

90

##### 3.3.1. Solubilización de los cuerpos de inclusión .....

90

##### 3.3.2. Plegamiento in vitro y purificación por cromatografía de afinidad a metales.....

90

##### 3.3.3. Confirmación de la identidad de la proteína expresada .....

91

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....** **92**

##### 3.1 PRODUCCIÓN DE LAC458 EN *E. COLI* .....

92

##### 3.1.1. Construcción del vector de expresión pLAC458-H6.....

92

##### 3.1.2. Expresión de LAC458 recombinante en la cepa C41(DE3)-pDIA17 .....

93

##### 3.1.3. Efecto de la temperatura y concentración del agente inductor en la expresión.....

95

##### 3.1.4. Expresión en condiciones de microaerobiosis y presencia de Cu<sup>2+</sup> .....

96

##### 3.2 SOLUBILIZACIÓN, PLEGAMIENTO *IN VITRO* Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA.....

98

### **DISCUSION GENERAL, PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES .....** **104**

### **APENDICE 1: .....** **108**

### **ANEXO 1:.....** **109**

### **ANEXO 2:.....** **111**

### **ANEXO 3:.....** **112**

### **ANEXO 4:.....** **113**

### **ANEXO 5:.....** **114**

**BIBLIOGRAFÍA..... 115**

*A Emma*

## AGRADECIMIENTOS

No podría haber realizado este trabajo sin el apoyo y la ayuda de muchas personas a quienes quiero expresar mi gratitud.

En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. Susana Castro, directora de esta tesis, por su dedicación y orientación, su apoyo incondicional e infinita paciencia (particularmente durante mi "reducción cerebral" 😊). Muy especialmente, gracias por tu calidez, cariño y constante estímulo cuando los resultados obtenidos no eran los tan esperados.

Al Dr. Raul Platero, co-director de esta tesis, por su siempre buena disposición, el tiempo y la ayuda dedicada, así como por las horas invertidas en la revisión del trabajo final y las observaciones realizadas al mismo con el afán de mejorarlo.

A la Dra. Maria Morel por ser la tutora del proyecto ante la ANII que me permitió obtener la beca de posgrado gracias a la cual pude realizar este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio con los cuales he compartido muchas horas de trabajo, almuerzos, algunos que otros mates y "pocheses" colectivas. Gracias por hacer de esas horas un rato ameno y divertido y por estar ahí siempre que lo necesité. Muchas gracias Dani Costa por tu ayuda con la edición de imágenes.

A mi gran familia y amigos por su constante interés, apoyo y palabras de aliento. Especialmente a mis padres por ser un ejemplo para mi y porque si he llegado hasta aquí ha sido gracias a ellos.

A mi pequeña familia: Emma y Lolo. Gracias Lolo por todo tu amor, dedicación, comprensión y por haber sabido animarme cuando tanto lo he necesitado. Gracias Emma por todo tu amor y por haber llenado de luz y alegría nuestras vidas.

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

**A:** adenina

**ABTS:** 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

**ADNg:** ADN genómico

**ADNp:** ADN plasmídico

**Amp:** Ampicilina

**BLAST:** del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*

**BSA:** del inglés *Bovine Serum Albumin*

**C:** citosina

**Cm:** Cloranfenicol

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**dNTPs:** desoxirribonucleótidos trifosfato

**ECF:** libre de cloro elemental

**EDTA:** ácido etilendiaminotetracético

**EPR:** del inglés *Electron Paramagnetic Resonance*

**G:** guanina

**GC-MS:** del inglés *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*

**IDA:** del inglés *Iminodiacetic Acid*

**IMAC:** del inglés *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*

**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

**L-DOPA:** L-3,4-dihydroxyphenylalanine

**LMS:** del inglés *Laccase Mediator Sistem*

**MCO:** multicobre oxidasa

**MEGA:** del inglés *Molecular Evolutionary Genetic Analysis*

**NCBI:** del inglés *National Center for Biotechnology Information*

**NJ:** del inglés *Neighbor-Joining*

**p/v:** peso/volumen

**PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida

**PCR:** del inglés *Polymerase Chain Reaction*

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**rpm:** revoluciones por minuto

**SDS:** dodecil sulfato sódico

**SGZ:** syringaldazina

**T:** timina

**TAT:** twin arginine translocation pathway

**TCA:** del inglés *Trichloroacetic Acid*

**TCF:** totalmente libre de cloro

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametilendiamina

**Tris:** tris(hidroximetil)aminometano

**U:** unidades de actividad enzimática

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolin- $\beta$ -D-galactósido



## ESTRUCTURA DE LA TESIS

La presente tesis está organizada de la siguiente forma:

Se incluye un Resumen, seguido de una Introducción general al tema de las laccasas. Posteriormente se incluyen la Hipótesis de trabajo, y los Objetivos (general y específicos). Los resultados se presentan en tres capítulos, con sus correspondientes apartados: marco teórico, materiales y métodos, resultados y discusión. La tesis concluye con una sección de Discusión globalizadora, así como de Conclusiones y Perspectivas de futuro.

El primer capítulo trata sobre la búsqueda del gen codificante para la laccasa de *Sinorhizobium meliloti* CE52G mediante el empleo de una estrategia proteómica. Para el diseño de la estrategia se tomaron en cuenta algunas propiedades bioquímicas previamente reportadas para dicha enzima.

El segundo capítulo trata sobre la búsqueda del gen codificante para la laccasa de *S. meliloti* CE52G y *Pseudomonas* sp. AU10 mediante el empleo de una estrategia genómica. Para el diseño de esta estrategia se tomó en cuenta una propiedad general de las laccasas, la presencia de regiones conservadas que permiten el diseño de cebadores degenerados para la amplificación del gen.

El tercer capítulo trata sobre la producción heteróloga de la enzima identificada como una potencial laccasa de *Pseudomonas* sp. AU10, según los resultados presentados en el capítulo 2.

## RESUMEN

Las laccasas son enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas multicobre, que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, hongos, insectos, bacterias y arqueas. Estas enzimas están involucradas en gran variedad de procesos biológicos, como la reconstitución de la pared celular vegetal, el desarrollo de cuerpos fructíferos, la esporulación, pigmentación de esporas y resistencia a cobre, entre otros. Las laccasas tienen actividad fenoloxidasa y son capaces de oxidar una gran variedad de compuestos aromáticos en un proceso acoplado a la reducción del oxígeno molecular a agua. Esta capacidad ha atraído la atención de muchos investigadores, debido a su potencial aplicación en diversas industrias como la industria papelera, textil, farmacéutica y alimenticia, así como en otros procesos de interés medioambiental, como es la biorremediación de compuestos recalcitrantes, la síntesis química o el desarrollo de biosensores.

Durante el transcurso de esta tesis se buscó identificar una laccasa producida por *Sinorhizobium meliloti* CE52G, utilizando una estrategia proteómica diseñada en base a las propiedades bioquímicas reportadas para dicha enzima. Ante la incapacidad de identificación de la enzima mediante este abordaje, decidimos emplear una estrategia genómica para la identificación de la laccasa de CE52G y de la cepa AU10 de *Pseudomonas* sp. Mediante el empleo de cebadores degenerados y la técnica PCR inversa se pudo identificar el gen *lac458* de *Pseudomonas* sp. AU10, cuya secuencia nucleotídica codificaría para una enzima oxidasa multicobre del tipo laccasa.

El análisis *in silico* de la secuencia codificante, mediante el empleo de diversas herramientas informáticas, reveló la presencia de cuatro regiones de unión a cobre y tres dominios de tipo cupredoxina, motivos característicos de las enzimas multicobre oxidasas. Así mismo, se advirtió la presencia de un péptido señal de secreción por la vía TAT así como de múltiples regiones propensas a la agregación.

A continuación, el gen *lac458* se sobreexpresó de forma heteróloga en *Escherichia coli* utilizando un sistema de tipo pET, e incluyendo una marca de seis histidinas para su posterior purificación por cromatografía de afinidad a metales. La proteína heteróloga LAC458-H6 se obtuvo en forma insoluble en todas las condiciones de expresión ensayadas (disminución de temperatura y concentración de inductor, adición de cobre al medio de cultivo y generación de condiciones microaerofílicas), por lo cual se procedió a su solubilización mediante el empleo de un agente caotrópico (urea) y su purificación y replegamiento *in vitro* mediante cromatografía de afinidad a

metales. Fue posible solubilizar y purificar la proteína LAC458-H6 aunque la misma se obtuvo de forma inactiva.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Consideraciones generales

En los últimos años el uso de enzimas en diversas aplicaciones industriales se ha incrementado significativamente. La razón de este fenómeno ha sido, en gran medida, la búsqueda de alternativas eficientes y ambientalmente seguras al uso de procesos químicos contaminantes (Riva, 2006).

Las reacciones de oxidación son esenciales en diversos procesos industriales. El uso de las tecnologías convencionales de oxidación presenta varios inconvenientes, entre ellos, la producción de reacciones colaterales inespecíficas o indeseables y el empleo de productos químicos perjudiciales para el medio ambiente. Esto ha impulsado la búsqueda de nuevas tecnologías de oxidación basadas en sistemas biológicos, como por ejemplo la oxidación enzimática. Los sistemas biológicos presentan dos importantes ventajas sobre los químicos: 1) las enzimas son catalizadores biodegradables y presentan especificidad por sustrato y 2) las reacciones enzimáticas suelen realizarse en condiciones suaves, que preservan la calidad de los productos.

La oxidación enzimática tiene potenciales usos dentro de una gran variedad de campos industriales, incluyendo las industrias papelera, textil y alimenticia. Las enzimas capaces de utilizar el oxígeno molecular como aceptor final de electrones son las más atractivas, ya que su co-sustrato es un reactivo que está presente en el ambiente.

Las laccasa son un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de un amplio espectro de sustratos en un proceso acoplado a la reducción del oxígeno molecular a agua (Yaropolov et al., 1994; Solomon et al., 1996; Gianfreda et al. 1999; Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006; Madhavi y Lele, 2009; Giardina et al., 2010).

Como consecuencia de la versatilidad y gran número de aplicaciones industriales de las oxidasas, y más específicamente de las laccasas, en las últimas décadas se han publicado un amplio número de reportes centrados en las propiedades bioquímicas de estas enzimas, sus potenciales aplicaciones tecnológicas y su utilización en procesos de biorremediación (Mayer y Staples, 2002; Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006; Loera et al., 2006; Kunamneni et al., 2008; Madhavi y Lele, 2009; Giardina et al., 2010; Osma et al., 2010; Piscitelli et al., 2010).

## 2. Laccasas

### 2.1 Características bioquímicas

Las laccasas (benzenediol: oxígeno oxidoreductasas; EC 1.10.3.2) son polifenol-oxidasas producidas por insectos, plantas, hongos y bacterias, capaces de oxidar una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos, incluyendo mono, di- y poli-fenoles, amino fenoles, metoxi-fenoles, aminas aromáticas y ascorbato, entre otros (Yaropolov et al., 1994, Solomon et al., 1996; Gianfreda et al. 1999; Madhavi y Lele, 2009). Estas enzimas se caracterizan por poseer un sitio catalítico con cuatro átomos de cobre (Cu), en estado  $\text{Cu}^{+2}$ , y por ello pertenecen al grupo de proteínas multicobre oxidasas, al cual también pertenecen las enzimas: ascorbato oxidasa, ceruloplasmina, bilirrubina oxidasa, fenoxazinona sintasa y la hefaestina (Solomon et al., 1996; Gianfreda et al. 1999; Kosman 2010).

Las multicobre oxidasas son un grupo de enzimas involucradas en numerosas reacciones del metabolismo celular, como la fosforilación oxidativa, la homeostasis a iones metálicos, la fotosíntesis, y el catabolismo de nutrientes y compuestos químicos tóxicos (Kosman, 2010). Estas enzimas son capaces de llevar a cabo la reducción del oxígeno molecular a dos moléculas de agua en un mecanismo de transferencia de cuatro electrones acoplado a la oxidación del sustrato (Giardina et al., 2010).

En las laccasas, los átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  se organizan en tres diferentes centros de coordinación, que actuarían transfiriendo los electrones desde un sustrato reductor hasta el oxígeno molecular de manera controlada, sin la formación de intermediarios tóxicos (Solomon et al., 1996; Palmer et al., 2001; Solomon et al., 2008).

Según Solomon et al. (1996), los centros del cobre se clasifican en función de sus características espectrofotométricas y paramagnéticas, según se describe a continuación:

- i) T1 -Cobre tipo 1 o azul: confiere el color azul característico de estas enzimas, también conocidas como "oxidasas de cobre azul", y es el primer sitio de oxidación. Tiene un pico de absorción máximo de aproximadamente 600 nm y puede ser detectado por resonancia paramagnética electrónica (EPR; del inglés, *electronic paramagnetic resonance*).
- ii) T2 -Cobre tipo 2 o normal: presenta un pico de absorción débil en la región visible y es EPR activo.

- iii) T3 -Cobre tipo 3 o sitio de cobre binuclear: Presenta dos átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  asociados. Muestra un pico de absorción alrededor de los 330 nm y ausencia de señal en EPR debido al acoplamiento de los dos átomos de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Los átomos de cobre de los sitios T2 y T3 forman un agrupamiento tri-nuclear donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno molecular (Palmer et al., 2001; Claus, 2004; Octavio, 2006; Giardina et al., 2010; Singh et al., 2011) (Figura 1).

Aunque existen grandes diferencias entre las secuencias aminoacídicas de las laccasas conocidas hasta el momento, los aminoácidos que se encargan de coordinar los átomos de cobre están muy conservados en estas proteínas. Se trata de un conjunto de diez histidinas y una cisteína, que se distribuyen normalmente del mismo modo en la cadena polipeptídica de las diferentes laccasas (Thurston, 1994; Solomon et al., 2001; Claus 2004; Giardina et al., 2010). El cobre T1 se enlaza a la enzima por dos residuos de histidina y uno de cisteína, mientras que los átomos de cobre del tipo T2 y T3 se enlazan a través de ocho residuos de histidina (Solomon et al., 2001; Hakulinen et al., 2002). En la Figura 1 se muestra una representación esquemática de los sitios de cobre de la laccasa CotA de *Bacillus subtilis*.

También se han descrito laccasas denominadas "laccasas amarillas", que carecen del espectro típico de absorción para el cobre T1. Estas laccasas se encontraron en algunos ascomicetos y basidiomicetos (Edens et al., 1999; Leontievsky et al., 1997; Min et al., 2001). Más aun, Palmieri et al. (1997) describe una "laccasa blanca" en *Pleurotus ostreatus*, la cual presenta un solo átomo de cobre junto a dos átomos de zinc y uno de hierro. También se han descrito laccasas de este último tipo en *Phellinus ribis* y *Volvariella volvacea* (Min et al., 2001; Chen et al., 2004)

Las laccasas comparten una organización general basada en tres dominios del tipo cupredoxina (Nakamura y Go, 2005). Cada uno de estos dominios presenta una estructura de barril de tamaño similar y se encuentran unidos entre sí por enlace disulfuro (Giardina et al., 2010). El centro de cobre T1 se localiza en el dominio 3, mientras que el agrupamiento trinuclear formado por T2/T3 se encuentra embebido entre los dominios 1 y 3 (Solomon et al., 1996). No obstante, también se han descrito algunas laccasas formadas solamente por dos dominios tipo cupredoxina (Endo et al., 2003; Machczynski et al., 2004).

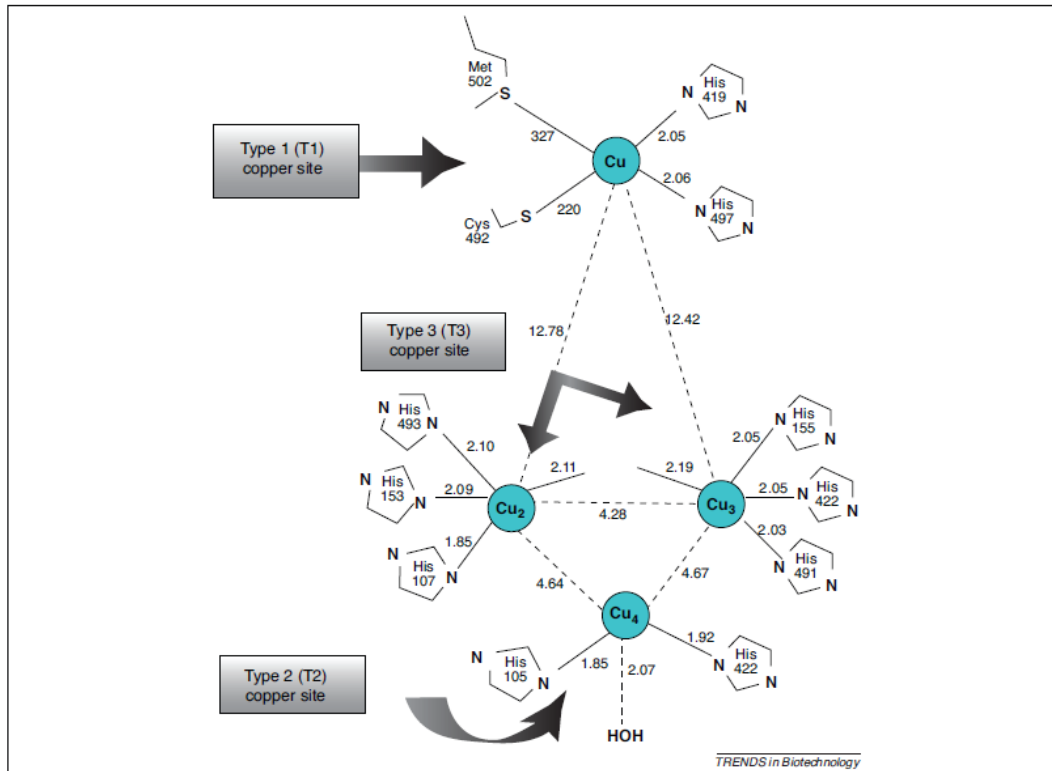


Figura 1 Representación esquemática de los sitios de coordinación del cobre de la laccasa CotA de *Bacillus subtilis*, tomada de Santhanam et al. (2011).

## 2.2 Características moleculares

Generalmente, las laccasas son proteínas glicosiladas que se encuentran en forma monomérica u homodimérica, presentando las laccasas vegetales un mayor grado de glicosilación (entre un 10 y 25%) comparadas con las laccasas de hongos y bacterias. Las glicosilaciones más frecuente están compuestas por glucosa, manosa, hexoaminas, galactosa, fucosa y arabinosas (Madhavi y Lele, 2009).

El peso molecular aparente observado por SDS-PAGE para estas enzimas varía entre 60-100 kDa, de los cuales entre el 10 y el 50% pueden atribuirse a la glicosilación (Madhavi y Lele, 2009). Esta modificación post-traduccional actúa como una marca de señalización para su secreción y susceptibilidad a proteólisis, al tiempo que es fundamental para su actividad, capacidad de retención del cobre y estabilidad térmica (Xu, 1999; Madhavi y Lele, 2009).

### 2.3 Especificidad de sustrato

Las laccasas son enzimas que se caracterizan por su poca especificidad de sustrato. Catalizan la oxidación de diversas sustancias orgánicas, incluyendo *o*- y *p*-difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, lignina, metoxifenoles, aril diaminas y algunos iones metálicos (Yaropolov et al., 1994, Hofer y Schlosser, 1999; Solomon et al., 1996; Gianfreda et al. 1999; Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006; Kunamneni et al., 2008; Madhavi y Lele, 2009; Giardina et al., 2010). Se ha observado también que aparte de compuestos orgánicos, las laccasas catalizan la oxidación de algunos iones inorgánicos como:  $\text{Mo}(\text{CN})_8^{4-}$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ,  $\text{Os}(\text{CN})_6^{4-}$  y  $\text{W}(\text{CN})_8^{4-}$ . Estas enzimas se diferencian de otras polifenoloxidasas como las tirosinasas (EC 1.14.18.1) y las catecol oxidasas (EC 1.10.3.1) en que no pueden oxidar tirosina y no se inhiben por monóxido de carbono.

Las laccasas difieren considerablemente en sus preferencias catalíticas, y pueden agruparse según su preferencia por compuestos fenólicos con sustituciones *orto*-, *meta* - o *para*-. Las laccasas de *Leptoporus litschaueri*, *Polyporus brumalis*, *Trametes versicolor*, *Podospora anserina* y *Pyricularia oryzae* presentan preferencia por compuestos con sustituciones *orto* (guayacol, fenilenediamina, ácido cafeico, catecol, L-DOPA, ácido protocatechuico, ácido gálico y pirogalol), seguidos por compuestos con sustituciones *para* (*p*-cresol, *p*-fenilenediamina, hidroquinona); mientras que las tasas enzimáticas más bajas se obtienen sobre moléculas con sustituciones en posición *meta* (*m*-fenilenediamina, orcinol y resorcinol floroglucinol) (Baldrian 2006). La oxidación del sustrato también se ve favorecida con la presencia de grupos -OH y -NH<sub>2</sub> como sustituyentes, mientras que se ve afectada con la presencia de grupos secuestradores de electrones como -Cl y -NO<sub>2</sub> (Xu, 1997).

Por otro lado, la actividad laccasa puede inhibirse interrumpiendo la transferencia electrónica por la presencia de aniones como el fluoruro, la azida y el cianuro (Baldrian, 2006). Otros compuestos, descritos como inhibidores de la actividad laccasa, son compuestos quelantes como el EDTA, y metales pesados como el Cd<sup>2+</sup> (Gianfreda et al., 1999; Lorenzo et al., 2005; Baldrian, 2006).

### 2.4 Mecanismo de reacción de las laccasas

La catálisis realizada por las laccasas se lleva a cabo de la siguiente manera: i) el sitio T1 cataliza cuatro oxidaciones monoelectrónicas del sustrato, ii) los electrones se transfieren a través del tripéptido His-Cys-His hasta el agrupamiento tri-nuclear T2/T3, y iii) reducción del oxígeno molecular a agua en el agrupamiento tri-nuclear



(Figura 2) (Solomon et al., 1996, Solomon et al. 2001, Solomon et al., 2008). El paso limitante en el proceso catalítico es la reducción del Cu T1.

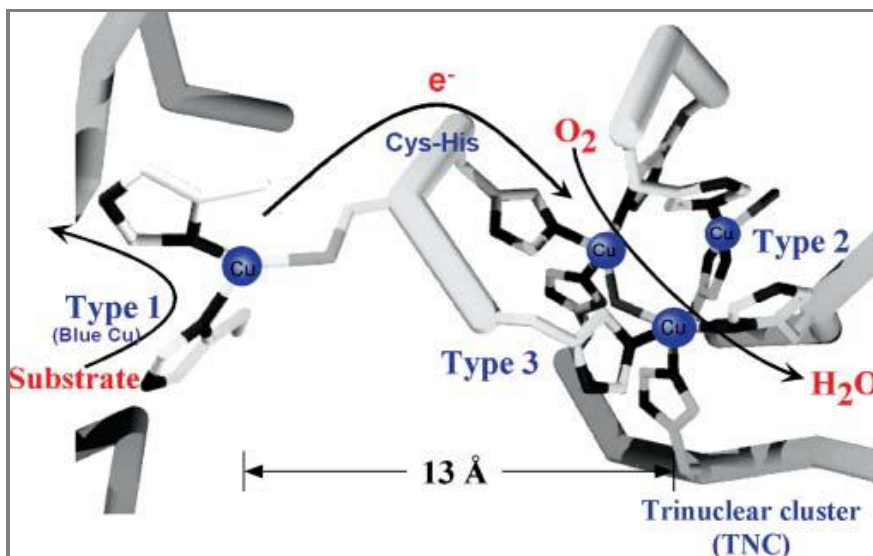


Figura 2 Representación de la secuencia de reacciones que transcurren en el sitio activo de las laccasas. Se indica mediante flechas el flujo de electrones, oxígeno y sustrato (tomado de Solomon et al., 2008).

La Figura 3 muestra el mecanismo por el cual se lleva a cabo la reducción del oxígeno molecular a agua. Dicho mecanismo se realiza en dos pasos secuenciales de transferencia de dos electrones, generando en primer lugar un intermediario peróxido (IP) y posteriormente un intermedio nativo (IN). La primera transferencia electrónica es la etapa limitante, y por lo tanto la que determina la tasa enzimática; mientras que la segunda etapa, que implica la ruptura del enlace O - O, es más rápida (Solomon et al., 2001; Solomon et al., 2008).

El centro trinuclear T2/T3, que se encuentra en estado completamente reducido, pues ha recibido los cuatro electrones del sustrato (Fig. 3 A), reacciona con el oxígeno cediéndole dos electrones y dando lugar a un intermediario tipo peróxido (IP). En este intermediario, los dos átomos de Cu T3 y el Cu T2 están unidos mediante un grupo peróxido (Fig. 3 B), y en una segunda etapa de transferencia de dos electrones, se forma un intermediario tipo nativo (IN), completamente oxidado (Fig. 3 C). El intermediario nativo, se reduce rápidamente por acción del sustrato, o, en ausencia del mismo, decae lentamente a un estado de reposo oxidado (Fig. 3 D), que contiene uno de los átomos de oxígeno enlazado como grupo hidroxilo al Cu T2.

Finalmente, el estado de reposo puede ser también reducido por el sustrato para dejar a la enzima completamente reducida (Solomon et al., 2001; Solomon et al., 2008).

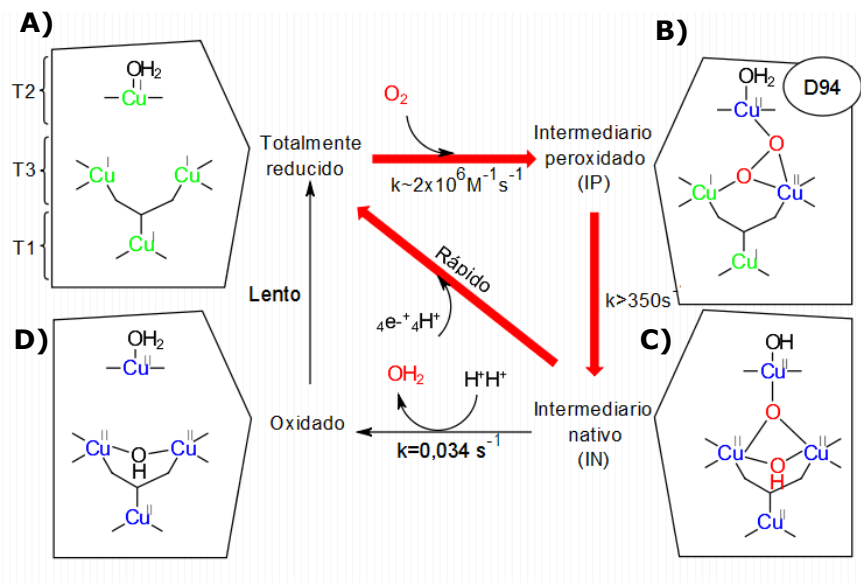


Figura 3 Mecanismo molecular de reducción del oxígeno a agua catalizado por laccasas (adaptada de Giardina et al., 2010). Las flechas rojas indican los pasos que tienen lugar en el ciclo catalítico de la enzima. Las flechas negras indican pasos que se han observado experimentalmente pero que no son parte del ciclo catalítico.

## 2.5 Localización celular

Las laccasas de plantas y hongos son de localización extracelular. Esto le permite al organismo evadir la presencia intracelular de especies reactivas generadas durante la oxidación de los sustratos aromáticos, tales como semiquinonas y quinonas, las cuales son potentes inhibidores del sistema de transporte de electrones (Sharma et al., 2007).

En el caso de las laccasas bacterianas su localización es generalmente intracelular, tal como se ha reportado en *Azospirillum lipoferum* (Diamantidis et al. 2000), *Marimonas mediterranea* (Solano et al. 1997), *Sinorhizobium meliloti* (Castro-Sowinski et al., 2002) y *Bacillus subtilis* (Martins et al. 2002). Sin embargo, también se han descrito laccasas procariotas con localización extracelular como es el caso de las laccasas de *Streptomyces ipomoea*, *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces sviveus* (Machczynski et al., 2004; Molina-Guijarro et al., 2009; Gunne y Urlacher), CueO y

PcoA de *E. coli* (Lee et al. 2002), y CuoB de *Myxococcus xanthus* (Sánchez-Sutil et al., 2007).

Una hipótesis propuesta mediante la cual las células bacterianas harían frente a la presencia intracelular de estas enzimas y las especies reactivas generadas es el reordenamiento del sistema de transporte de electrones. En ese sentido, Alexandre et al. (1999), demostraron la pérdida de actividad citocromo c-oxidasa y la adquisición de resistencia a análogos de quinona en una variante de *Azospirillum lipoferum* productora de laccasa.

## **2.6 Distribución**

La primera descripción de una laccasa fue en los exudados del árbol japonés del barniz *Toxicodendron vernicifluum* (anteriormente *Rhus vernicifera*; Yoshida, 1883), lo que dio origen a su nombre (del latín lacca= laca o barniz) (Bertrand, 1894). Más tarde se descubrió su presencia en hongos (Bertrand, 1896) y actualmente se sabe de su existencia en insectos (Dittmer et al., 2004), bacterias (Claus, 2003; Sharma et al., 2007; Singh et al., 2011) y arqueas (Sharma y Kuhad, 2009; Uthandi et al., 2010), lo que demuestra su amplia distribución en la naturaleza. Además, están implicadas en múltiples procesos biológicos.

En la Tabla 1 se describen ejemplos de organismos en los cuales se ha descrito la producción de proteínas con actividad laccasa o la presencia de genes codificantes para proteínas del tipo laccasa.

**Tabla 1** Organismos productores de proteínas con potencial actividad laccasa.

	Organismo	Cita	Organismo	Cita
INSECTOS	<i>Anopheles gambiae</i>	Dittmer et al., 2004	<i>Agaricus bisporus</i>	Bonnen et al., 1994
	<i>Bombyx mori</i>	Yamazaki, 1972	<i>Aspergillus nidulans</i>	Kurtz y Champe, 1982
	<i>Drosophila melanogaster</i>	Sugumaran et al., 1992	<i>Botryosphaeria sp.</i>	Barbosa et al., 1996
	<i>Drosophila virilis</i>	Yamazaki, 1969	<i>Botrytis cinerea</i>	Slomczynski et al., 1995
	<i>Lucilia cuprina</i>	Binnington y Barrett, 1988	<i>Cerrena maxima</i>	Gindilis et al., 1990
	<i>Manduca sexta</i>	Thomas et al., 1989	<i>Coriolus verllereus</i>	Zhou et al., 1993
	<i>Nephotettix cincticep</i>	Hattori et al., 2010	<i>Flammulina velutipes</i>	Lee and Suh, 1985
	<i>Oryctes</i>	Xu, 1999	<i>Ganoderma australe</i>	Mendonça et al., 2008
	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Coy et al., 2010	<i>Junghuhnia separabilima</i>	Vares et al., 1992
	<i>Sarcophaga bullata</i>	Barrett, 1987	<i>Lentinula edode</i>	Nagai et al., 2003
<i>Tribolium castenum</i>	Arakane et al., 2005	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	D'Souza et al. 1996	
PLANTAS	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Sterjiades et al., 1992	<i>Melanocarpus albomyces</i>	Kiiskinen et al., 2002
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Halpin et al., 1999	<i>Glomerella cingulata</i>	Walker, 1968
	<i>Gossypium arboreum</i>	Wang G et al., 2004	<i>Neurospora crassa</i>	Froehner y Eriksson, 1974
	<i>Liriodendron tulipifera</i>	LaFayette et al., 1999	<i>Panaeolus papilionaceus</i>	Heinzkill et al., 1998
	<i>Lolium perenne</i>	Gavnholt et al., 2002	<i>Phellinus ribis</i>	Min et al., 2001
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Richardson y McDougall, 1997	<i>Pleurotus eryngi</i>	Martinez et al., 1994
	<i>Oryza sativa</i>	Caparrós-Ruiz et al., 2006	<i>Podospora anserina</i>	Durrens, 1981
	<i>Pinus taeda</i>	Bao et al., 1993	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Eggert et al., 1996
	<i>Populus trichocarpa</i>	Ranocha et al., 1999	<i>Pyricularia oryzae</i>	Chivukul y Renganathan, 1995
	<i>Rhus succedanea</i>	Keilin y Mann, 1939	<i>Rhizoctonia solani</i>	Wahleithner et al., 1996
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Cai et al., 1993	<i>Trametes hirsuta</i>	Selinheimo et al., 2006
	<i>Toxicodendron vernicifluum</i>	Yoshida, 1883	<i>Trametes gibbosa</i>	Selinheimo et al., 2006
	<i>Zea mays</i>	Caparrós-Ruiz et al., 2006	<i>Trichoderma atroviride</i>	Holker et al., 2002
	<i>Zinnia elegans</i>	Liu et al., 1994	<i>Trichoderma giganteum</i>	Wang y Ng, 2004

**Tabla 1 (cont.)** Organismos productores de proteínas con potencial actividad laccasa.

	Organismo	Cita	Organismo	Cita
BACTERIAS	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Givaudan et al., 1993	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Wiethaus et al., 2006
	<i>Bacillus halodurans</i>	Ruijsenaars y Hartmans, 2004	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Castro- Sowinski et al, 2002
	<i>Bacillus licheniformes</i>	Koschorreck et al., 2008	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sitthisak et al., 2005
	<i>Bacillus pumillus</i>	Reiss et al., 2011	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Freeman et al., 1993
	<i>Bacillus</i> sp.	Van Waasbergen et al. 1996	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Machczynski et al., 2004
	<i>Bacillus sphaericus</i>	Claus y Filip, 1997	<i>Streptomyces ipomoea</i>	Molina-Guijarro et al., 2009
	<i>Bacillus subtilis</i>	Hullo et al., 2001	<i>Streptomyces griseus</i>	Endo et al., 2002
	<i>Escherichia coli</i>	Kim et al., 2001	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Suzuki et al., 2003
	<i>Leptothrix discophora</i>	Adams y Ghiorse, 1987	<i>Streptomyces psammoticus</i>	Niladevi et al., 2008
	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	Takami et al., 2002	<i>Thermus thermophilus</i>	Miyazaki, 2005
	<i>Pseudomonas fluorescences</i>	Okazaki et al., 1997	<i>Xanthomonas campestris</i>	Lee et al., 994
	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Isono y Hoshino, 1989	<i>Haloferax volcanii</i>	Uthandi et al., 2010
	<i>Pseudomonas putida</i>	Brouwers et al., 1999 McMahon et al., 2007	<i>Haloarcula marismortui</i>	Sharma y Kuhad, 2009
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Cha y Cooksey, 1991	<i>Natronomonas pharaonis</i>	Sharma y Kuhad, 2009
	ARQUEAS	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	Fitz-Gibbon et al., 2002	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>		Hernández-Romero et al., 2005	<i>Halorubrum lacusprofundi</i>	Sharma y Kuhad, 2009

## 2.7 Laccasas: enzimas con múltiples tareas

Se han sugerido múltiples roles fisiológicos para las laccasas, incluyendo la respuesta frente a heridas de las plantas, la reconstitución de la pared celular y el desarrollo de cuerpos fructíferos en hongos (Oshima et al., 1985; Leatham y Stahmann, 1981; Ranocha et al., 2002). También se ha reportado que estas enzimas desempeñan un papel en la patogénesis de ciertos hongos (factores de virulencia fúngicos), pigmentación de las esporas y morfogénesis de rizomorfos (Worrall et al.,

1986; Law y Timberlake, 1990; Viterbo et al., 1994; Temp y Eggert, 1999; Deckert et al., 1998; Pourcel et al., 2005; Waterman et al., 2007). Es por esta diversidad de funciones que las laccasas se han clasificado como enzimas "moonlight" (Sharma y Kuhad, 2008). Este término proviene del verbo "to moonlight" (estar pluriempleado, o tener más de un trabajo) y se utiliza para referir a proteínas que tienen múltiples funciones y que no son consecuencia de fusiones génicas, procesamiento alternativo de ARN o fragmentación proteolítica múltiple. Estas proteínas pueden variar su función en respuesta a cambios en la concentración de sus ligando o sustratos, localización diferencial y/o expresión diferencial.

Una de las funciones biológicas más polémicas y más estudiadas de las laccasas se relaciona con el proceso de lignificación de las paredes celulares y la degradación de la lignina por acción de los hongos de podredumbre blanca (Ander y Eriksson; 1976; Bao et al., 1993; Eggert et al., 1996; Bermek et al., 1998; Mendonça et al., 2008). En la Tabla 2 se describen éstas y otras posibles funciones biológicas reportadas para algunas enzimas tipo laccasas.

**Tabla 2.** Posibles funciones biológicas de las multicobre oxidasas del tipo laccasa. Tabla adaptada y ampliada de Sharma et al. (2007). En esta tabla se incluyeron las funciones actualmente conocidas de las laccasas producidas por bacterias (B), hongos (H), plantas (P) e insectos (I).

Organismo		Posible función	Referencia
<i>Aquifex aelicus</i>	B	Proteína de división celular	Deckert et al., 1998
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P	Pigmentación de semillas	Pourcel et al., 2005
<i>Armillaria mellea</i>	H	Desarrollo de rizomorfos	Worrall et al., 1986
<i>Aspergillus fumigatus</i>	H	Pigmentación de conidios	Sugareva et al., 2006
<i>Aspergillus nidulans</i>	H	Pigmentación de conidios	Law y Timberlake, 1990
<i>Azospirillum lipoferum</i>	B	Pigmentación	Givaudan et al., 1993
		Oxidación de compuestos fenólicos Transporte de electrones	Diamantidis et al., 2000 Alexandre et al., 1999
<i>Bacillus halodurans</i>	B	Resistencia al Cu <sup>2+</sup>	Ruijsenaars y Hartmans, 2004
<i>Bacillus licheniformes</i>	B	Pigmentación de esporas	Koschorreck et al., 2008
		Resistencia a UV y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
<i>Bacillus pumilus</i>	B	Pigmentación de esporas	Reiss et al., 2011
		Resistencia a UV y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
<i>Bacillus sp.</i>	B	Esporulación	Van Waasbergen et al., 1996
		Oxidación Mn <sup>2+</sup>	
<i>Bacillus sphaericus</i>	B	Esporulación	Claus y Filip, 1997
		Pigmentación de esporas	
<i>Bacillus subtilis</i>	B	Pigmentación de esporas	Hullo et al., 2001 Martins et al., 2002
		Resistencia a UV y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
<i>Botrytis cinerea</i>	H	Factor de virulencia	Viterbo et al., 1994
<i>Cryptococcus neoformans</i>	H	Pigmentación	Williamson et al., 1997 Eisenman et al., 2007 Waterman et al., 2007
		Factor de virulencia	
<i>Escherichia coli</i>	B	Flujo de Cu <sup>2+</sup>	Kim et al., 2001 Roberts et al., 2002 Huffman et al., 2002
		Oxidación de fenolatos-sideróforos	
		Actividad ferroxidasa	
		Resistencia al Cu <sup>2+</sup>	
<i>Fusarium proliferatum</i>	H	Factor de virulencia	Regalado et al., 1999
<i>Heterobasidion annosum</i>	B	Factor de virulencia	Johansson et al., 1999
	H		Leatham y Stahmann, 1981
<i>Lentinus edodes</i>		Degradación de Lignina	Goodell et al., 1998
		Desarrollo de cuerpos fructíferos	Crestini et al., 1998
			Ohga et al., 2000
<i>Leptothrix discophora</i>	B	Destoxificación de Mn <sup>2+</sup>	Adams y Ghiorse, 1987
		Eliminación de especies tóxicas O <sub>2</sub>	
<i>Liriodendron tulipifera</i>	P	oxidación de Fe <sup>2+</sup>	Hoopes y Dean, 2004
<i>Marinomonas mediterránea</i>	B		Sánchez-Amat y Solano, 1997
		Pigmentación	Sánchez-Amat et al., 2001

Organismo		Posible función	Referencia
<i>Nephotettix cincticeps</i>	I	Detoxificación de compuestos fenólicos	Hattori et al., 2010
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	B	Esporulación	Takami et al., 2002
<i>Pinus tadea</i>	P	Síntesis de Lignina	Bao et al., 1993
<i>Populus trichocarpa</i>	P	Integridad de la pared celular	Ranocha et al., 2002
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	B	Oxidación de Mn <sup>2+</sup> Eliminación de especies tóxicas O <sub>2</sub>	Okazaki et al., 1997
<i>Pseudomonas maltophila</i>	B	Actividad nucleósido oxidasa	Isono y Hoshino, 1989
<i>Pseudomonas putida</i>	B	Oxidación de Mn <sup>2+</sup>	Brouwers et al., 1999
<i>Pseudomonas sp.</i>	B	Oxidación de Mn <sup>2+</sup>	Francis y Tebo, 2001
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	B	Resistencia al Cu <sup>2+</sup>	Cha y Cooksey, 1991
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	H	Biosíntesis de ácido cinnabarinico Pigmentación Degradación de Lignina	Eggert, 1997 Temp y Eggert, 1999 Bermek et al., 1998
<i>Ralstonia solanacearum</i>	B	Resistencia a compuestos fenólicos	Hernández-Romero et al., 2005
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	B	Resistencia al Cu <sup>2+</sup>	Wiethaus et al., 2006
<i>Rhus vernicifera</i>	P	Protección frente a lesiones	Oshima et al., 1985
<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	H	Degradación de Lignina	Ander y Eriksson, 1976
<i>Staphylococcus aureus</i>	B	Homeostasis del cobre Respuesta a estrés oxidativo	Sitthisak et al., 2005
<i>Streptomyces antibioticus</i>	B	Síntesis de fenoxacinonas Pigmentación	Hsieh y Jones, 1995 Jones, 2000
<i>Streptomyces cyaneus</i>	B	Degradación de Lignina	Arias et al., 2003
<i>Streptomyces griseus</i>	B	Pigmentación Morfogénesis	Endo et al., 2003
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	H	Oxidación del Mn <sup>2+</sup>	Schlosser et al., 2002
<i>Trametes versicolor</i>	H	Degradación de Lignina	Crestini et al., 1998
<i>Tribolium castaneum</i>	I	Pigmentación de la cutícula	Arakane et al., 2005
<i>Volvariella volvacea</i>	H	Desarrollo de cuerpos fructíferos	Chen et al., 2004
<i>Xanthomonas campestris</i>	B	Resistencia al Cu <sup>2+</sup>	Lee et al., 1994
<i>Zinnia elegans</i>	P	Síntesis de Lignina	Liu et al., 1994



## 2.8 Sistemas laccasa-Mediador (*LMS* en inglés)

Se ha reportado que el empleo de mediadores redox puede ampliar el rango de sustratos sobre los cuales estas enzimas presentan actividad. Los mediadores son moléculas de bajo peso molecular que pueden oxidarse por acción de las laccasas, formando radicales catiónicos altamente activos capaces de oxidar compuestos no fenólicos.

En un sistema ideal (en ausencia de reacciones secundarias), un mediador redox podría llevar a cabo múltiples ciclos de oxidación - reducción sin ocurrir degradación del mismo. La forma oxidada del mediador, producida en el curso de la reacción enzimática, puede oxidar de manera no enzimática a otros compuestos con potenciales de ionización superiores a los potenciales de las laccasas (Morozoba et al., 2007).

El primer compuesto descrito capaz de mediar de manera eficiente la oxidación de compuestos no fenólicos por la acción de laccasas fue el ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)], un sustrato artificial de la enzima (Bourbonnais y Paice, 1990). Posteriormente, se emplearon otros mediadores sintéticos como 1-hidroxibenzotriazol (HBT), ácido violúrico (Call y Mücke, 1997), N-hidroxiftalimida (Galli y Gentili, 2004), fenilpirazolonas (Shleev et al., 2004) y el radical de tipo nitroxilo TEMPO (2,2', 6,6'-tetrametil-piperidina-N-oxil) (Fabbrini et al., 2002). Estos mediadores se han utilizado de manera eficiente en procesos tales como la decoloración de colorantes textiles (Couto y Sanromán, 2007; Claus et al., 2002), la degradación de la lignina (Srebotnik y Hammel, 2000) y el bioblanqueo de la pulpa de papel (García et al., 2003). Sin embargo, debido al elevado costo y toxicidad de los mediadores sintéticos, en los últimos años se ha incrementado la búsqueda y selección de compuestos fenólicos derivados de la despolimerización de lignina, para su utilización como mediadores naturales (Johannes y Majcherczyk, 2000; Santhanam et al., 2011).

La Figura 4 muestra una representación esquemática de los ciclos redox catalizados por las enzimas laccasas para la oxidación de sustratos en ausencia y en presencia de mediadores redox.

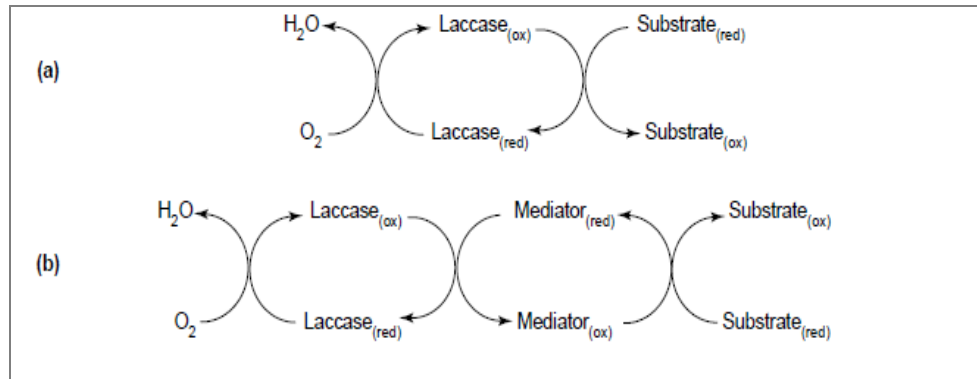


Figura 4 Ciclos redox catalizados por las laccasas en ausencia (a) y en presencia de mediadores redox (b). Figura tomada de Riva, 2006.

## 2.9 Laccasas: enzimas con diversas aplicaciones biotecnológicas

Debido a su amplio espectro de sustratos, las laccasas se consideran enzimas de gran interés industrial. Entre otras aplicaciones biotecnológicas, estas enzimas se utilizan en las industrias textil, alimenticia, papelera, farmacéutica y cosmética.

A continuación, se presenta un resumen ampliado de algunas aplicaciones biotecnológicas propuestas para las laccasas.

### 2.9.1 Industria textil

En los últimos años la industria textil ha registrado un incremento en el volumen de su producción debido a la creciente demanda de productos textiles. Este incremento también se ve reflejado en el volumen de sus efluentes (aguas residuales), convirtiendo a esta industria en una de las principales fuentes de contaminación a nivel mundial (Pearce et al., 2003).

La industria textil utiliza grandes volúmenes de agua y productos químicos, en particular colorantes. La composición de estos productos es muy diversa e incluyen tanto compuestos inorgánicos como compuestos orgánicos.

Debido a su estructura química los colorantes son resistentes a la acción de la luz, agua y otros productos químicos, siendo muchos difíciles de decolorar a causa de su estructura química tan estable (Zollinger, 2002; Ramirez y Toca-Herrera, 2006; Desai y Nityanand, 2011).

Durante el proceso de teñido, entre el 10 y el 20% del colorante utilizado no se adhiere firmemente a las fibras textiles y se descarta con los efluentes industriales. La

liberación de efluentes coloreados en el medio ambiente es indeseable, no sólo a causa de su color, sino también debido a que muchos de estos colorantes (así como sus productos de degradación) son tóxicos o cancerígenos (Dos Santos et al., 2007). La remoción de estos compuestos por métodos físicos y químicos, tales como adsorción, oxidación, coagulación-floculación, filtración y métodos electroquímicos es altamente costosa y no siempre efectiva (Couto y Toca-Herrera, 2006; Dos Santos et al., 2007, Madhavi y Lele, 2009). Por otro lado, las laccasas ofrecen una alternativa interesante para la degradación enzimática de estos compuestos, puesto que al presentar baja especificidad de sustrato, pueden actuar sobre colorantes de diversa estructura, ya sea de forma directa o indirecta a través del empleo de mediadores.

Numerosos trabajos reportan la capacidad de estas enzimas para degradar diversos colorantes textiles (Chivukul y Renganathan, 1995; Abadulla et al., 2000; Hao et al., 2000; Campos et al., 2001; Claus et al., 2002; Blánquez et al., 2004, Pazarlioglu et al., 2005; Lu et al., 2007; Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006; Dayaram y Dasgupta, 2008; Yamak et al., 2009; Fang et al., 2011; Kumar et al., 2011).

Campos et al. (2001) describen el uso de laccasas purificadas de *Trametes hirsuta* y *Sclerotium rolfsii*, en combinación con mediadores redox, para la degradación del colorante índigo, tanto en tejido como en efluentes. Pazarlioglu et al., (2005) también reportan el uso efectivo de la laccasa producida por *Trametes versicolor* para simular el efecto desgastado en los tejidos conocidos como *jeans*, y en este caso sin el empleo de mediadores redox.

Más aun, también se ha reportado el empleo de laccasas en la industria textil con otros fines, como lo son: blanqueo del algodón (Tzanov et al., 2003; Basto et al., 2006), síntesis de nuevos colorantes (Setti et al., 1999; Mustafa et al., 2005) y tratamiento anti-encogimiento de lana (Yoon 1998; Lantto et al., 2004). La utilización de laccasas en estos procesos tiene como beneficios la reducción del tiempo de procesamiento, la reducción del consumo de agua, y la reproductibilidad de los rendimientos obtenidos (Mueller y Shi 2001).

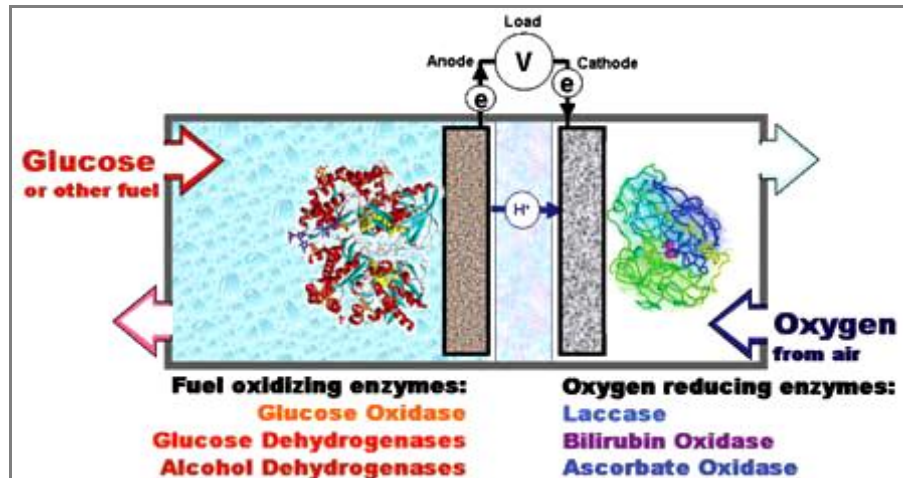
Hoy en día se dispone de algunos productos comerciales formulados en base a laccasas, especialmente diseñados para su aplicación en la industria textil. Algunos ejemplos son: DeniLite® (Novozyme), DeniLite II® (Novozyme) y ZyLite® (Zytex). Estos productos están recomendados para la degradación del colorante azul índigo y simulación del efecto desgastado en *jeans* (Rodríguez- Couto y Toca- Herrera, 2006).

### 2.9.2 Nanobiotecnología

Dentro de esta área biotecnológica, se ha descrito el uso de laccasas para el desarrollo de biosensores y celdas de biocombustible.

Los biosensores, como su nombre lo indica, son sensores que contienen un componente biológico (enzimas, anticuerpos, receptores o microorganismos) capaz de convertir una señal bioquímica en una respuesta eléctrica cuantificable, a través de un transductor electrónico (Thévenot et al., 2001). En las últimas décadas se han desarrollado biosensores que utilizan laccasas para la identificación de diversos compuestos. Algunos ejemplos de los compuestos detectados son: oxígeno (Gardiol et al., 1996; Gutierrez-Sanchez et al., 2014), paracetamol (Odaci et al., 2006), azida (Leech y Daigle, 1998; Leech y Feerick, 2000; Mousty et al., 2007), compuestos fenólicos (Ghindilis et al. 1992; Gomes y Rebelo 2003; Roy et al., 2005; Jarosz-Wilkolazka et al., 2005; Abdullah et al., 2007; Fernandes et al., 2008; Montereali et al., 2010; Akyilmaz et al., 2014; Qu et al., 2015), catecolaminas (Szeponi et al., 1997; Ferry y Leech, 2005; Huang et al., 2008; Shervedani y Amini, 2012; Zhao et al., 2014), flavonoides producidos por plantas (Jarosz-Wilkolazka et al., 2004; Franzoi et al., 2009; Litescu et al., 2010), lignina (Shleev et al., 2006) y herbicidas (Sezgintürk et al., 2010).

Las celdas de biocombustible utilizan biocatalizadores para generar energía eléctrica a partir de una amplia gama de sustratos biodegradables. Las celdas de biocombustible enzimáticas generan energía a través de una electrocatálisis enzimática (Palmore y Whitesides, 1994). Estos dispositivos son una alternativa atractiva para la generación de energía a partir de diferentes tipos de sustratos orgánicos, convirtiendo la energía química contenida en éstos en energía eléctrica, de forma eficiente y no contaminante. Una celda de biocombustible enzimática básica contiene muchos de los componentes que están presentes en las celdas de combustible no enzimáticas: un ánodo, un cátodo y un separador. Sin embargo, en lugar de emplear electrocatalizadores metálicos se utilizan enzimas del tipo oxidorreductasas adheridas a los electrodos. La Figura 5 muestra un diagrama esquemático de una celda de biocombustible enzimática genérica donde se da la oxidación de glucosa (combustible) en el bioánodo y la reducción de oxígeno a agua en el biocátodo.



**Figura 4** Diagrama esquemático de una celda de biocombustible enzimática. Compuesta por un ánodo, conteniendo enzimas oxidadas adecuadas para la conversión del biocombustible de elección y un cátodo que incluye generalmente una enzima oxidorreductasa que cataliza la reducción de agua empleando oxígeno molecular como aceptor final de electrones. Figura tomada de Atanassov et al., (2007).

Son numerosos los reportes que describen la utilización de laccasas para la reducción electro-enzimática en diversas celdas de biocombustible (Palmore y Kim, 1999; Chen et al., 2001; Calabrese et al., 2002; Barrière et al., 2006; Brunel et al., 2007; Beneyton et al., 2011).

Recientemente las celdas de biocombustible han despertado el interés de muchos investigadores, ya que podrían ser utilizadas en numerosos dispositivos de la medicina moderna, para el suministro de medicamentos o la monitorización de una función corporal. A diferencia de las celdas de combustible convencionales, que requieren la recarga periódica del combustible, las micro celdas enzimáticas implantadas podrían continuar produciendo electricidad mientras exista actividad metabólica en el hospedero (Heller, 2004; Rodríguez-Couto y Toca-Herrera, 2006; Ivanov et al., 2010).

### 2.9.3 Síntesis química

La síntesis química es el proceso por el cual se producen compuestos químicos a partir de sustancias más simples. Su rama más amplia es la síntesis de moléculas orgánicas (síntesis orgánica).

La utilización de laccasas para la síntesis orgánica es una aplicación que está recibiendo mucho interés en los últimos años (Mayer y Staples, 2002). Estas enzimas participan en la producción de polímeros sin la formación de intermediarios tóxicos,

tales como el peróxido de hidrógeno (Kunamneni et al., 2008). Por ejemplo, Ikeda et al. (1998; 2001) reportaron el empleo de laccasas para el desarrollo de películas poliméricas artificiales de urushi (laca tradicional japonesa que se utiliza para recubrir artesanías) a partir de nuevos análogos de urushiol. Estos autores también describen la utilización de estas enzimas para la polimerización de acrilamida.

La preparación enzimática de polifenoles poliméricos por la acción de laccasas es también una alternativa viable y no tóxica a su síntesis química tradicional en base a formaldehído (Kunamneni et al., 2008).

Otras aplicaciones en síntesis química descritas para las laccasas son: polimerización de compuestos aminoacídicos y fenólicos (Aktas et al., 2003; Karamyshev et al., 2003; Gureir et al., 2005), síntesis de polímeros con propiedades mecánicas/eléctricas/ópticas específicas (Mai et al., 2000; Uyama y Kobayashi, 2002), síntesis de colorantes textiles (Mustafa et al., 2005), síntesis de pigmentos cosméticos y síntesis de agentes terapéuticos (Mikolasch et al., 2006; Xu, 2005).

#### *2.9.4 Industria farmacéutica*

Debido a su especificidad, las laccasas se han convertido en un campo de interés para el sector farmacéutico. Muchos productos generados por estas enzimas tienen propiedades antimicrobianas, antioxidantes, destoxificantes, anestésicas y antiinflamatorias (Pilz et al., 2003; Nicotra et al., 2004). Entre otros, las laccasas se emplean para la generación *in situ* de yodo (Xu, 1996), así como para la producción de dactinomicina, vinblastina, mitomicina, penicilina X, cefalosporinas, vindolina y catequinas (Yaropolov et al., 1994; Burton 2003; Kurisawa et al., 2003; Kunamneni et al., 2008). Cabe mencionar que la dactinomicina y vinblacina son agentes terapéuticos con acción anticancerígena empleados actualmente para el tratamiento de diversos tipos de cánceres. Además, se ha descrito la capacidad de algunas laccasas para inhibir la actividad transcriptasa reversa del virus HIV-1 (Wang y Ng, 2004) o combatir la aceruloplasminemia (Harris et al., 2004).

El sector de los cosméticos no ha sido indiferente a la aplicación de las laccasas. Actualmente se comercializan tintas capilares que contienen en su formulación estas enzimas como agente oxidante en lugar de peróxido de hidrógeno, haciéndolas menos irritantes al cuero cabelludo. También se han desarrollado preparaciones cosméticas y dermatológicas a base de laccasas para el aclarado de la piel (Lang y Cotteret, 1999; Golz-Berner et al., 2004; Kunamneni et al., 2008; Arora y Sharma 2010). Numerosas patentes hacen referencia al uso de laccasas como desodorantes para productos de

higiene personal, incluyendo pasta de dientes, enjuague bucal, detergente, jabón y pañales (Kunamneni et al., 2008).

#### 9.2.5 Biorremediación

La biorremediación es la aplicación de procesos biológicos para estimular la degradación de contaminantes o la recuperación del ecosistema (Baker et al., 1994). De forma general, los procesos de biorremediación de residuos se pueden realizar a través de plantas (fitorremediación), microorganismos o directamente mediante degradación enzimática (Gianfreda y Rao 2004).

Las laccasas se emplean para la degradación de colorantes textiles presentes en los efluentes de dicha industria, así como también para el tratamiento de efluentes derivados de algunas industrias alimenticias como las fábricas de aceite (d'Annibale et al., 2000; Berrio et al., 2007; Minussi et al. 2007; Iamarino et al., 2009; Sampedro et al., 2009) o las destilerías (Strong y Burgess, 2008).

Las laccasas son también capaces de degradar un gran número de compuestos xenobióticos presentes en aguas o suelos contaminados, tales como carbazol, etilcarbazol, fluoreno y dibenzotiofeno, en combinación con mediadores redox (Bressler et al., 2000; Niku y Viikari, 2000).

Otros compuestos contaminantes degradados por estas enzimas son: pesticidas (Amitai et al., 1998; Kang et al., 2002), hidrocarburos aromáticos policíclicos (Pointing, 2001; Cañas et al., 2007), clorofenoles (Leontievsky et al., 2001; Gaitán et al., 2011), residuos plásticos (Kunamneni et al., 2008), triclosan (Murugesan et al., 2010) y medicamentos como el naproxeno (Marco-Urrea et al., 2010), entre otros.

#### 2.9.6 Industria alimenticia

Anteriormente se creía que las laccasas jugaban un rol indeseado en el procesamiento de ciertos alimentos, ya que su actividad junto con otras oxidasas de fenoles podría causar un oscurecimiento de los alimentos enlatados o verduras. No obstante, Minussi et al. (2002) describen un amplio rango de aplicaciones de estas enzimas en diferentes aspectos de la industria alimenticia, tales como: el procesamiento de bebidas, determinación de ácido ascórbico, gelificación de pectina, panificación, etc. Estas enzimas se aplican también en diversos procesos para la mejora o modificación de las características sensoriales de ciertos alimentos y bebidas. Por ejemplo, el sabor de los aceites vegetales puede mejorarse eliminando el oxígeno

disuelto mediante el empleo de laccasas, pudiéndose aplicar también esta enzima para la desoxigenación de alimentos derivados de extractos vegetales (Mathiasen y Petersen, 1996).

Takemori et al. (1992) reportan el uso de laccasa de *Coriolus versicolor* para mejorar el sabor y gusto de granos descortezados de cacao y sus subproductos. Tanto el amargor como otros sabores desagradables pueden reducirse realizando un tratamiento con estas enzimas.

Las laccasas se emplean también para la estabilización de los jugos de frutas, cervezas y vinos (Giovanelli, 1989; Alper y Acar, 2004; Kunamneni et al., 2008). Los mostos y los vinos son mezclas complejas de compuestos químicos, tales como etanol, ácidos orgánicos (generadores de aroma), sales y compuestos fenólicos (generadores de color y sabor). La eliminación selectiva de polifenoles, mediante el empleo de laccasas, mejora las características organolépticas del vino y evita la aparición de turbidez, produciendo también intensificación del color o alteraciones del aroma y sabor (Servili et al., 2000).

Por otra parte, se ha descrito que el uso de laccasas en productos de panificación aumenta la fuerza y estabilidad de la masa, y disminuye su viscosidad, mejorando su manipulación. Además, producen un aumento del volumen y mayor suavidad del producto (Osma et al., 2010).

### 2.9.7 Industria papelera

El papel resulta fundamental para la vida moderna, es uno de los medios más utilizado como soporte para la producción y difusión de conocimientos e información al tiempo que se utiliza para el comercio y transporte de mercancías. La fabricación de pasta, papel y derivados alcanza cifras que sitúan esta industria entre las más grandes del mundo.

El procesamiento básico para obtener papel consta principalmente de dos etapas: i) fabricación de pulpa o pasta de celulosa a partir de la madera; y ii) elaboración de papel a partir de la pulpa. Las principales materias primas utilizadas para la elaboración de pasta de celulosa son madera y restos de lino o algodón que se reciclan.

Para la fabricación de pulpa de papel debe realizarse la separación de lignina de las fibras de celulosa (deslignificación o pulpaje). Esta separación puede ser de dos



tipos: mecánica o química. No obstante, sin importar cuál proceso de deslignificación se realice, las fibras de celulosa poseen siempre una cantidad de lignina residual que le confiere a la pulpa un color marrón debido a la presencia de grupos cromóforos. Esta lignina residual, debe eliminarse total o parcialmente, para el uso posterior de la pulpa en la fabricación de papel. Los procesos posteriores al pulpeo, que contribuyen a la eliminación de esta lignina, se denominan procesos de *blanqueo* (Casey, 1990).

El proceso de blanqueo implica el consumo de enormes cantidades de productos químicos, mayormente compuestos derivados del cloro ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{ClO}_2$  e  $\text{NaOCl}$ ). Estos compuestos son altamente reactivos y reaccionan con la lignina formando diversos compuestos conocidos como organoclorados (dioxinas, clorofenoles, furanos, bencenos clorados, entre otros), los cuales son altamente tóxicos y bioacumulables.

En los últimos años se han desarrollado alternativas de blanqueo enzimático o *bioblanqueo* en las cuales se emplean diversas enzimas lignolíticas. Se ha visto que el empleo de "Sistemas Laccasas-Medidor" (LMS) en comparación con otras enzimas utilizadas, como las xilanasas, presenta mayor especificidad sobre las fracciones fenólicas y no fenólicas de la lignina, disminuyendo así las pérdidas de rendimiento (Cadena, 2010). Varios estudios reportan la efectividad del sistema laccasa-mediador, para disminuir el número kappa, indicativo de la cantidad de lignina en la pulpa de papel (Sigoillot et al., 2005; Ibarra et al., 2006; Arana-Cuenca et al., 2010; Fillat y Roncero, 2010). Más aun, se ha descrito que el empleo de estos sistemas (LMS) durante el procesamiento de la pulpa de papel mejorar sus propiedades físicas, químicas y mecánicas (Moldes y Viral, 2011; Virk et al., 2012).

Otros usos reportados para las laccasas son en procesos de decoloración durante el reciclaje de papel (Selvam et al., 2005) o en el tratamiento de efluentes de la industria papelera (Widsten y Kandelbauer, 2008).

## **2.10 Productos comerciales actualmente disponibles**

En la actualidad algunas empresas de diversos orígenes elaboran productos comerciales formulados en base a laccasas para su utilización en la industria alimenticia, papelera y textil. En la Tabla 3 se resumen dichos productos así como su aplicación recomendada.

**Tabla 3** Productos comerciales formulados en base a enzimas laccasas. Tabla adaptada y ampliada de Osma et al. (2010) y Piscitelli et al. (2014).

	Aplicación	Nombre	Empresa
Industria Alimenticia	Elaboración de cerveza	Flavourstar	Advanced Enzyme (India)
	Mejora del color (té)	LACCASE Y120	Amano Enzyme Co. Ltd. (USA)
	Modificación del corcho	Suberase	Novozymes
Industria papelera	Bioblanqueo	Lignozym-process	Lignozym GmbH (Alemania)
	Deslignificación de pulpa de papel	Novozym 51003	Novozymes (Dinamarca)
Industria textil	Tratamiento de tela vaquera	Bleach Cut 3-S	Season Chemicals
		Cololacc BB	Colotex Biotechnology Co. Ltd.
		DeniLite/ DeniLite II	Novozymes (Dinamarca)
		Ecostone® LCC10 AB	AB Enzymes GmbH (Alemania)
		IndiStar™	Genencor (USA)
		Novoprime® Base 268	Novozyme (Dinamarca)
		Primagreen® Ecofade LT100	Genencor (USA)
		ZyLite	Zytext Pvt. Ltd. (India)
		Americos Laccase P y Americos Laccase LTC	Americos Industries Inc. (India)
		APCOZYME II-S	Apollo Chemical Company (USA)
		DENIMCOL LAC	CHT/BEZEMA (Italia)
		Prozyme LAC	Sunson Industry Group (China)
		Hipozyme	Condor Speciality Products (USA)
		Decoloración de colorante Indigo	Lava ® Zyme LITE
Trilite II/ Trilite Plus	Tri-Tex Co. Inc. (Canada)		

### 3. Antecedentes de trabajo

En el año 2002, Castro-Sowinski et al. reportaron la capacidad de algunos aislamientos nativos de *Sinorhizobium meliloti* de producir la enzima laccasa (aislamiento CE52G entre otros). Dicha enzima se produce durante la fase estacionaria del crecimiento de CE52G, cuando al medio de cultivo se le agrega cobre como inductor. Durante el transcurso de ese trabajo, se logró la purificación parcial de la enzima por intercambio

iónico y se caracterizaron sus constantes cinéticas y algunas propiedades bioquímicas. Posteriormente, se realizó la purificación parcial de la enzima por IMAC (cromatografía de afinidad a metales) en columnas de IDA-sepharosa con cobre inmovilizado y se efectuó una caracterización bioquímica más profunda de la laccasa obtenida (temperatura y pH óptimo, inhibidores, activadores, peso molecular aparente, etc.) (Rosconi et al., 2005). Se demostró, entre otras cosas, que la enzima se activa por el agregado de SDS y que presenta un peso molecular aparente de 95kDa y punto isoeléctrico de 6.2 (Rosconi et al, 2005). Además, la actividad de esta enzima parece estar regulada por el estado redox de la célula, ya que mutantes en la tiorredoxina de CE52G tienen afectada la actividad laccasa (Castro-Sowinski et al., 2007).

Así mismo, nuestro grupo de trabajo cuenta también con una colección de aislamientos bacterianos productores de enzimas con potencial uso en diferentes industrias, provenientes de diversos ambientes naturales. Dentro de estos aislamientos, y en el contexto de este trabajo de tesis, se encontró que la cepa *Pseudomonas* sp. AU10 proveniente de la Antártida, aislada por su capacidad de producir una proteasa extracelular activa a baja temperatura (Martinez-Rosales y Castro-Sowinski y, 2011), presentaba la capacidad de oxidar 2,6-dimetoxifenol, sustrato de la enzima laccasa.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

La hipótesis de trabajo de esta tesis propone que: a través de una estrategia proteómica y/o genómica es posible identificar la secuencia codificante de una laccasa bacteriana, para su producción recombinante.

### Objetivos

Objetivo General:

Identificar la secuencia codificante de una laccasa bacteriana para su producción heteróloga y estudio de sus potenciales aplicaciones tecnológicas.

### Objetivos específicos:

- I. Identificar la laccasa producida por *S. meliloti* CE52G utilizando una estrategia proteómica y genómica.
- II. Identificar la laccasa producida por *Pseudomonas* sp. AU10 utilizando una estrategia genómica.
- III. Producir de forma heteróloga una de las laccasas bacterianas.
- IV. Estudiar las potenciales aplicaciones tecnológicas de la enzima recombinante.

# CAPÍTULO 1

*"Son los problemas sin resolver, no los resueltos, los que mantienen activa la mente."*  
Erwin Guido Kolbenheyer.

## **CAPITULO 1- "Búsqueda de la laccasa producida por *S. meliloti* CE52G mediante un abordaje proteómico"**

### **MARCO TEÓRICO Y ESTRATEGIA DE TRABAJO**

En base a los antecedentes reportados para la laccasa de *Sinorhizobium meliloti* (Sm) CE52G se diseñó una estrategia proteómica para su identificación.

Castro-Sowinski et al. (2002) y Rosconi et al. (2005) reportaron a la enzima laccasa de Sm CE52G como una proteína homodimérica de aproximadamente 95 kDa, con un punto isoeléctrico de 6,2 y cuya producción se induce por la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  en el medio de cultivo.

La estrategia consistió en la extracción de proteínas totales de Sm CE52G cultivada en presencia o ausencia del inductor de la producción de la laccasa ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Teniendo en cuenta las propiedades bioquímicas de la enzima (pI y Masa) y comparando los perfiles de proteínas producidas en las distintas condiciones, se buscó purificar e identificar un polipéptido que tuviera homología con enzimas del tipo laccasa.

Dado que este tipo de enzimas presenta sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  coordinados por la presencia de residuos de histidina (ver Introducción), la purificación se realizó por cromatografía de afinidad a metales (IMAC) utilizando columnas de sepharosa-IDA- $\text{Cu}^{+2}$  (ácido iminodiacético, IDA). Posteriormente, los eluidos con actividad laccasa, así como su contraparte (purificación con IMAC del extracto celular producido en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$ ), se sometieron a una electroforesis bidimensional y se realizó una búsqueda de proteínas de expresión diferencial con peso molecular y punto isoeléctrico acordes a lo ya reportado para la enzima en estudio.

Con el mismo objetivo, también se realizó una purificación de la enzima siguiendo una serie de pasos, constituidos por diferentes tipos de cromatografías, según se describe a continuación.

## MATERIALES Y METODOS

### 1.1 Microorganismo

Para la realización del Capítulo 1 de esta tesis se trabajó con el aislamiento de *Sinorhizobium meliloti* (Sm) CE52G (Castro-Sowinski et al., 2002) perteneciente a nuestra colección de microorganismos. Su crecimiento y mantenimiento se realizó en medio TY suplementado con  $\text{CaCl}_2$  (Anexo 1). Sm CE52G se almacenó en glicerol 20%, a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 1.2 Preparación del extracto enzimático. Determinación de la actividad laccasa, concentración proteica y controles electroforéticos

#### 1.2.1. Cultivo de células de Sm CE52G

Se trabajó con células de Sm CE52G crecidas tanto en presencia como ausencia del inductor,  $\text{Cu}^{2+}$ . Para ello se inoculó 1 L de medio TY y 1 L de medio TY suplementado con  $\text{CuSO}_4$  16 mM, con 5 mL de un cultivo fresco de CE52G, también crecido en TY. Los cultivos se incubaron en agitación (200 rpm) a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 h.

#### 1.2.2. Obtención del extracto celular

Una vez alcanzada la fase estacionaria, las células se recuperaron por centrifugación a 10000g a temperatura ambiente, durante 10 min. Los "pellets" celulares se lavaron tres veces con buffer fosfato 50 mM (pH 7) y se suspendieron en 7 mL de idéntico buffer. Las suspensiones celulares se mantuvieron en hielo y el contenido celular se obtuvo por sonicación a pulsos de 50% durante 1 min y con potencia relativa igual a 5 en el equipo Ultrasonic Homogeneizer 4710 Series, de Cole-Parmer. En total las suspensiones se sonicaron durante 12 min, siempre en hielo, con pausas de 2 min para evitar el sobrecalentamiento de la muestra y la consecuente desnaturalización de las proteínas. Las muestras sonicadas se centrifugaron a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 min a 30000g. Ambos sobrenadantes se fraccionaron y almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 1.2.3. Determinación de la actividad laccasa

La actividad laccasa se determinó siguiendo el protocolo reportado por Sowinski et al. (2002) y Rosconi et al. (2005). Las medidas se realizaron a temperatura ambiente utilizando Syringaldazina (SGZ,  $\epsilon=65000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ), como sustrato donador

de electrones, siguiendo la oxidación del sustrato a 525 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. La mezcla de reacción (volumen final igual a 1 mL) contenía: buffer acetato 45 mM (pH 5), SDS 1.7 mM, SGZ 50  $\mu$ M y una cantidad apropiada de extracto celular o enzimático, según se indique en cada caso. Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1  $\mu$ mol de SGZ por minuto, en las condiciones del ensayo.

#### 1.2.4. Cuantificación proteica de los extractos enzimáticos

La determinación proteica de los extractos se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo de Bradford de Amresco (código M172). Se realizó una curva de calibración empleando seroalbúmina bovina (BSA, por su sigla en inglés) como proteína estándar. El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 1.2.5. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se prepararon geles de poliacrilamida con una concentración de acrilamida-bisacrilamida del 5% en el gel concentrador y de 12% para el gel separador (Anexo 2). Las muestras se diluyeron en buffer de carga (Anexo 2), se incubaron a 95 °C durante 5 min y se enfriaron en hielo. Se sembraron entre 5 y 20  $\mu$ L de muestra según el ensayo. La corrida electroforética se realizó a 70V en buffer de corrida Tris-glicina-SDS pH 8.3 (Anexo 2) hasta que el frente de corrida alcanzó el gel separador y luego se aumentó el voltaje a 100V. Las bandas proteicas se visualizaron por tinción con una solución colorante de Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0.1% y decoloración con solución decolorante (Anexo 2).

#### 1.2.6. Actividad enzimática en gel de poliacrilamida - zymogramas

Para detectar actividad laccasa en gel se siguió el protocolo reportado por Castro-Sowinski et al. (2002). Se prepararon geles de SDS-poliacrilamida como se indica en el punto anterior, ya que la presencia de SDS incrementa la actividad laccasa (Castro-Sowinski et al., 2002), y las muestras se sembraron diluidas en buffer de carga (sin el agregado de  $\beta$ -mercaptoetanol; y sin calentamiento de las mismas) (20  $\mu$ L por pocillo). La corrida se realizó en idénticas condiciones a las mencionadas anteriormente. Para evidenciar la actividad laccasa *in situ*, los geles se equilibraron a temperatura ambiente en buffer MES 0,1 M (pH 5) durante 10 min y luego se incubaron con Siringaldazina 70  $\mu$ M y SDS 1.7 mM, en Buffer MES 0,1 M a pH 5. La



presencia de bandas proteicas de actividad se evidenció por la aparición de color rosado intenso sobre las mismas.

### **1.3 Purificación e identificación de la enzima laccasa de Sm CE52G**

Se utilizaron dos estrategias para identificar y purificar en forma parcial la laccasa producida por Sm CE52G:

i- cromatografía de afinidad a metales (IMAC) de extractos celulares obtenidos de células crecidas en presencia y ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , seguido de una electroforesis bidimensional (identificación de proteínas expresadas en forma diferencial en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ ).

ii- secuencia de métodos cromatográficos – se realizaron dos intercambios iónicos, seguido de una IMAC, y controles electroforéticos, en una sola dimensión.

#### *1.3.1. Estrategia i - Purificación por IMAC y análisis por electroforesis bidimensional*

La IMAC se realizó utilizando IDA-sepharosa como matriz, saturada con una solución de  $\text{CuSO}_4$  25 mM. La columna (1 x 4 cm) se lavó con agua y se equilibró en buffer PBS, pH 7,2. Se aplicaron 0,6 mL extracto celular (3,5 mg proteína), y se incubó con agitación por 10 min a 4 °C. Luego, se realizaron sucesivos lavados con 1 mL de PBS (pH 7,2) hasta obtener fracciones con una absorbancia a 280 nm menor de 0,05. Las proteínas de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  se eluyeron empleando PBS con imidazol 50 mM, y se colectaron fracciones de 1 mL. Todas las fracciones se controlaron midiendo su actividad laccasa y concentración proteica, así como por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). Se calculó el factor de purificación y recuperación del proceso de purificación.

Para el análisis de la expresión diferencial mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D), se seleccionaron: la fracción eluída con mayor factor de recuperación proveniente de células crecidas en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y la misma fracción correspondiente al cultivo sin inductor. Estas fracciones se enviaron a la Unidad de Bioquímica Analítica y Proteómica (UBYP) del Instituto Pasteur para la realización de las electroforesis 2D. Se realizaron tres repeticiones biológicas para cada condición ensayada. Para la selección de los "spots" de expresión diferencial en los gels bidimensionales y posterior identificación mediante mapeo peptídico por MALDI-TOF, se tomaron en cuenta los datos de tamaño y punto isoeléctrico previamente reportados para la laccasa producida por Sm CE52G (Rosconi et al. 2005). En la Figura 1.1 se esquematizan los pasos realizados.

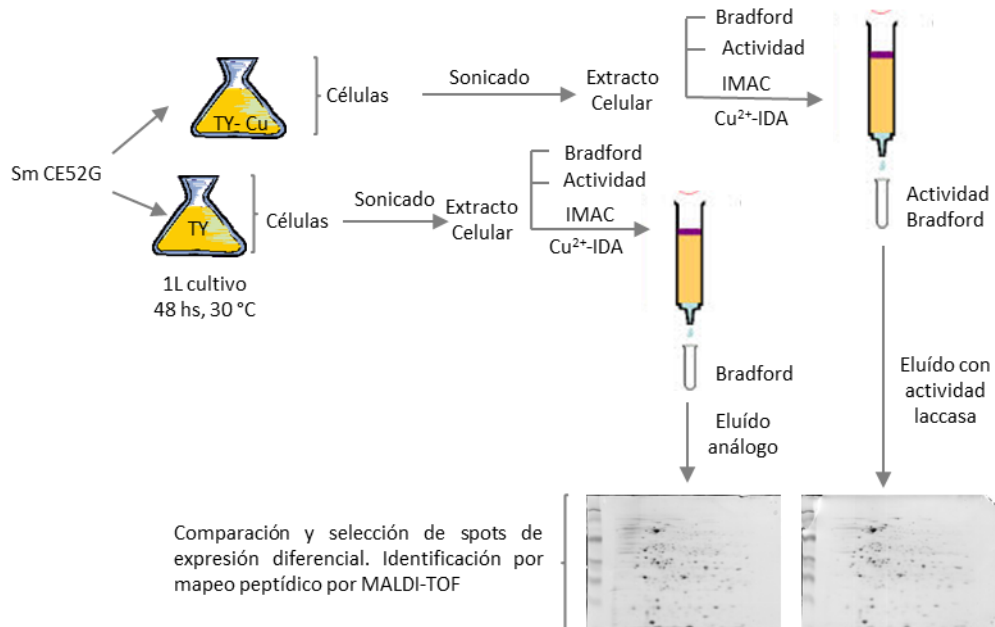


Figura 1.1 Representación esquemática de la estrategia de purificación e identificación de la laccasa de Sm CE52G. Primera estrategia empleada.

### 1.3.2. Estrategia ii - Purificación por cromatografía de intercambio iónico seguido de IMAC y control por SDS-PAGE

El extracto celular de Sm CE52G, obtenido de células crecidas en presencia de Cu<sup>2+</sup>, se sometió a dos intercambio iónicos (II) seguidos: un II negativo seguido de un II positivo y finalmente una IMAC de la fracción eluída con mayor actividad laccasa.

Con el objetivo de adecuar el pH del extracto celular para el primer II (cambio de pH), el mismo se equilibró en buffer MES 0.1 M (pH 6,0), utilizando una columna PD-10 (GE), según las instrucciones del fabricante (se aplican 2 mL de extracto y se recogen 3 mL; se aplicaron 10 mg de proteínas). La elución se realizó con Buffer MES 0.1M (pH 6).

Para el II negativo (primer II) se utilizó una columna cargada con 3.5 mL del intercambiador catiónico, CM-Sephadex C-25 equilibrada en buffer MES 0,1 M (pH 6). En dicha columna se aplicó el eluido proveniente de la PD-10 y se dejó agitando en vaivén durante 20 min a 4 °C de forma de asegurar la adsorción de las moléculas cargadas positivamente. Posteriormente, se recogió el percolado y se determinó la actividad laccasa presente en el mismo.

A continuación, se realizó un cambio de pH del percolado, empleando una columna PD-10 equilibrada en buffer acetato 0.1 M (pH 5), tal cual se describió más arriba. El eluido resultante se sometió a una cromatografía de II positivo (segundo II de la estrategia) utilizando una columna de DEAE-Sephadex A-25 equilibrada en buffer acetato 0,1M (pH 5). El percolado se almacenó a -20 °C para su posterior control y la columna se lavó con buffer acetato 0.1 M (pH 5) hasta obtener una absorbancia a 280 nm menor a 0,05. La elución se realizó con el mismo buffer suplementado con NaCl 0,5 M. Los eluidos (1 mL) se colectaron sobre 0.5 mL de Buffer fosfato 0.2 M (pH 7), ya que al enzima es inestable a pHs más bajos (Rosconi et al., 2005). Por último, las fracciones eluidas con actividad laccasa se sometieron a una IMAC en las mismas condiciones que se describió en el punto anterior.

Todas las fracciones se controlaron midiendo su actividad laccasa, concentración proteica y por SDS-PAGE. Se calculó el factor de purificación y recuperación del proceso de purificación.

Se seleccionaron para su identificación, las bandas proteicas presentes en la SDS-PAGE de la fracción eluída de la IMAC con actividad laccasa. El criterio de selección se basó en el tamaño molecular (de acuerdo a lo informado por Castro-Sowinski et al., 2002). Dichas bandas se recortaron y se mandaron a la Unidad de Bioquímica Analítica y Proteómica (UBYPA) del Instituto Pasteur para su identificación por mapeo peptídico mediante MALDI-TOF, según las instrucciones del servicio. En la Figura 1.2 se esquematizan los pasos realizados durante esta segunda estrategia.

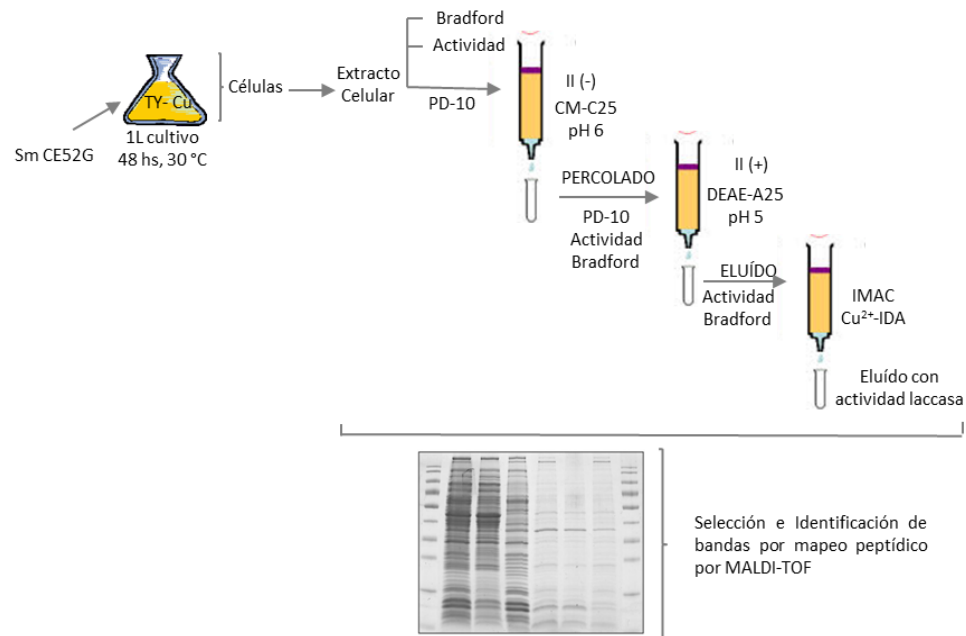


Figura 1.2 Representación esquemática de la segunda estrategia empleada. Donde, PD-10: cambio de buffer, II (-): intercambio iónico negativo, II (+): intercambio iónico positivo, IMAC: cromatografía de afinidad a metales.

### 1.3.3. Tinción de proteínas en gel SDS-PAGE con Nitrato de Plata

En algunos casos, las bandas proteicas se visualizaron por tinción con nitrato de plata, según se indica en la sección de Resultados.

Para la tinción de las proteínas utilizando nitrato de plata se siguieron las instrucciones de Sambrook (1989). Las proteínas se fijaron al gel por inmersión en solución de fijado (etanol: ác. acético: agua en relación 30:10:60) y se incubó durante 4 a 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó el gel en una solución de etanol al 30% durante 1 h a temperatura ambiente, se lavó cuatro veces con 10 volúmenes de agua y las proteínas se revelaron por el agregado de cinco volúmenes de una solución de nitrato de plata al 0.1% (preparada en el momento) e incubación durante 4 a 12 h. Finalmente, se descartó el nitrato de plata, se lavó ambos lados del gel bajo agua desionizada y se adicionaron cinco volúmenes de la solución de revelado (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5%, formaldehído 0.02%). Se incubó el gel, con agitación, hasta observar la aparición de bandas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.1 Purificación e identificación de la enzima laccasa producida por Sm CE52G

#### 1.1.1. Estrategia i - Purificación por IMAC y análisis por electroforesis bidimensional

Con el objetivo de identificar la enzima laccasa se obtuvieron extractos celulares de Sm CE52G crecida en presencia y ausencia de cobre. Dichos extractos se sometieron a una etapa de purificación por IMAC y finalmente se realizó (en el servicio de UBYPa del Instituto Pasteur de Montevideo) una electroforesis 2D con fracciones seleccionadas y comparación visual de la presencia de "spots" de proteínas.

En la Figura 1.3 se muestra el perfil de elución obtenido para la IMAC realizada con el extracto celular producido en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ . Las fracciones de elución con actividad laccasa coincidieron con las tres fracciones conteniendo la mayor concentración proteica (E3, E4 y E5), las cuales fueron seleccionadas para su posterior análisis.

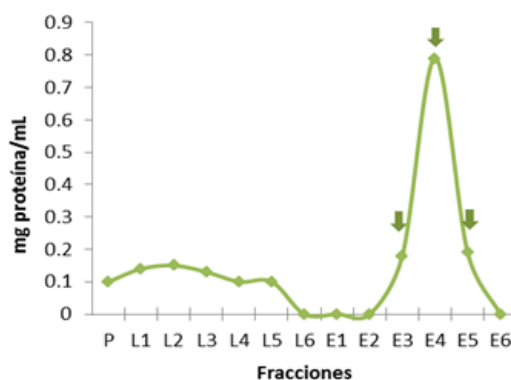


Figura 1.3 Perfil de elución del extracto celular producido en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  sometido a IMAC. Donde, P: percolado, Ln: lavados, En: eluidos, numerados según su orden de elución. Las flechas indican las fracciones que presentaron actividad laccasa.

En la Tabla 1.1 se muestra el grado de purificación alcanzado para la laccasa producida por CE52G, cultivada en presencia del inductor,  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Tabla 1.1** Evaluación de la purificación de la laccasa presente en el extracto enzimático producido en presencia de Cu, realizada por IMAC

Fracción	Vol (mL)	Proteína (mg/mL)	Ue (U/mL)	Ut	A.E (Ut/mg)	Factor de Purificación	Factor de Recuperación
<b>Extracto</b>	0,5	7,32	564,1	282,0	77,1	1	100%
<b>Percolado</b>	2,6	0,1	-	-	-	-	-
<b>Lavados</b>	1	0,62*	-	-	-	-	-
<b>Eluido 3</b>	1	0,18	17,6	17,6	97,7	1,3	6,2%
<b>Eluido 4</b>	1	0,79	126,3	126,3	159,9	2,0	44,8%
<b>Eluido 5</b>	1	0,19	54,7	54,7	287,7	3,7	19,3%

\*Resultado acumulado de todos los lavados realizados hasta obtener una absorbancia a 280 nm menor a 0.05

Respecto al balance de masa, se recuperó en total (percolado, lavados y eluidos) un 56% de la proteína sembrada en la columna indicando que el resto de la proteína sembrada permanecería aun adsorbida a la columna. Por otro lado, en relación a la enzima, se logró recuperar (suma de los eluidos) un 70% de las unidades totales. Según el eluido número 5, la enzima se purificó aproximadamente cuatro veces (Tabla 1.1).

Con el extracto celular obtenido de células que crecieron en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$  (extracto sin actividad laccasa) se realizó un procedimiento similar al descrito hasta ahora. Se determinó la concentración proteica de todas las fracciones obtenidas.

En la Figura 1.4 se muestra el perfil electroforético (SDS-PAGE) de los extractos celulares y las fracciones de elución obtenidas luego de las cromatografías, utilizando tanto extractos producidos con células crecidas en presencia (A) como en ausencia (B) de  $\text{Cu}^{2+}$ . Como se puede observar, las fracciones obtenidas para ambas condiciones de estudio presentaron un perfil electroforético similar, no pudiéndose evidenciar la presencia de una banda proteica de expresión diferencial entre ambas condiciones.

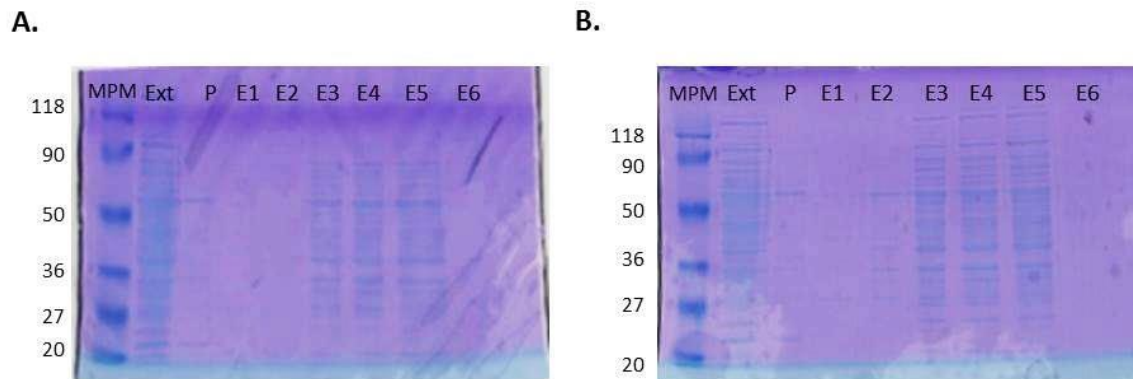


Figura 1.4 Control por SDS-PAGE del extracto enzimático y fracciones de elución de la IMAC A. Muestras obtenidas a partir de células crecidas en presencia de Cu y B. Muestras obtenidas a partir de células crecidas sin Cu agregado. Ext: extracto enzimático, P: percolado y E: eluidos, numerados según su orden de elución. Se indican los tamaños moleculares de las bandas del marcador en kDa.

La fracción que presentó mayor factor de recuperación, el Eluido 4, se seleccionó para su estudio por electroforesis bidimensional. El perfil de proteínas obtenido se comparó con una electroforesis bidimensional realizada con el Eluido 4 de la IMAC del extracto de células crecidas en ausencia del inductor. Si bien el eluido escogido no fue el que presentó mayor actividad específica (Tabla 1.1), el contenido proteico del mismo era satisfactorio para su posterior análisis por electroforesis 2D e identificación de “spots” por espectrometría de masa.

En la Figura 1.5 se muestran los geles de electroforesis 2D. Como se observa, al igual que para la SDS-PAGE, no existirían proteínas de expresión diferencial evidentes por análisis visual en la región seleccionada del gel (de acuerdo al tamaño molecular y pI reportados previamente para la enzima; Castro-Sowinski et al. 2002; Rosconi et al. 2005). Igualmente, algunos posibles “spots” presentes en la región seleccionada (y de dudosa presencia en los extractos obtenidos de células no inducidas) se identificaron por espectrometría de masa y búsqueda en las bases de datos.

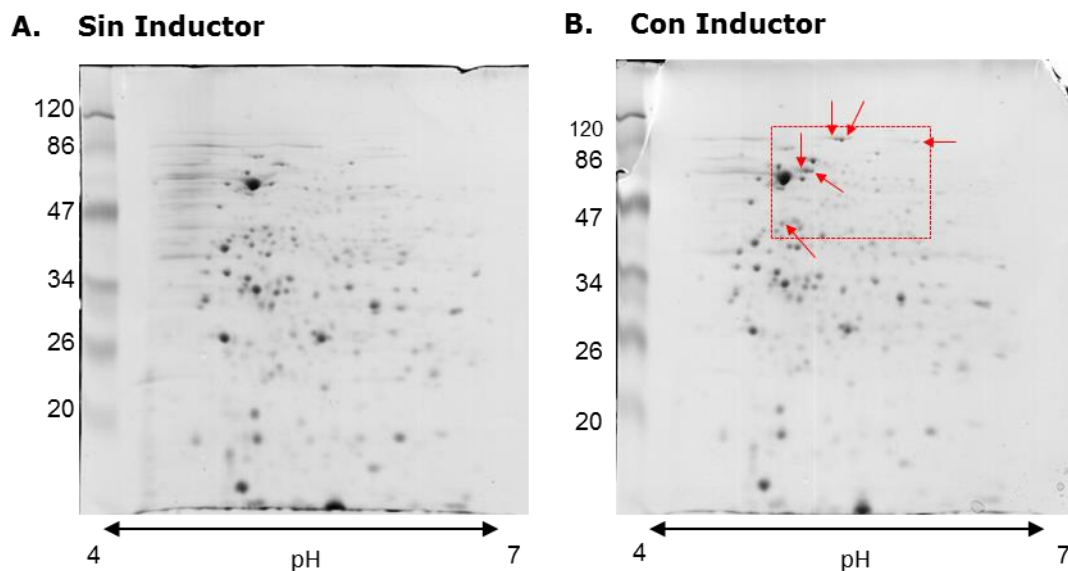


Figura 1.5 Electroforesis bidimensional de la fracción de purificación (eluido 4), obtenida mediante IMAC. Se utilizaron extractos celulares crecidos en presencia (B) o ausencia (A) de Cu. Se indican los tamaños moleculares de las proteínas del marcador en kDa, el gradiente de pH empleado y en rojo algunos de los “spots” seleccionados para su identificación por mapeo peptídico, por MALDI TOF. En un recuadro rojo se indica la región de interés del gel.

La Tabla 1.2 resume el resultado de la identificación de los “spots” seleccionados. Si bien la mayoría de las proteínas identificadas presentan sitios de unión para iones metálicos, ninguna mostró identidad con proteínas del tipo multicobre oxidasas. Entre las proteínas identificadas se encontró una catalasa/peroxidasa. Las peroxidadas son enzimas capaces de oxidar la siringaldazina, el sustrato característico de laccasas que fue empleado para determinar la actividad laccasa durante este capítulo de la tesis. Aunque las peroxidadas tienen la capacidad de oxidar siringaldazina, lo hacen en presencia de peróxido de hidrógeno. La estrategia utilizada para descartar la posibilidad de que la oxidación de la siringaldazina se deba a la presencia de una peroxidada es el agregado de catalasa durante los ensayos de actividad. Este tipo de ensayos ya había sido realizado por Castro-Sowinski et al. (2002) y Rosconi et al. (2005), quienes trabajando con la enzima producida por Sm CE52G observaron que la adición de catalasa a la mezcla de reacción no alteraba la actividad laccasa, indicando que para la oxidación de siringaldazina no se requería la presencia de peróxido de hidrogeno, y por lo tanto demostrando que la actividad observada no se debería a una enzima siringaldazina peroxidada, sino una laccasa en el sentido estricto de su definición.



El análisis de los motivos presentes en la proteína catalasa/peroxidasas HDI de *S. meliloti* identificada, realizado mediante las herramientas Prosite (<http://prosite.expasy.org/prosite.html>) y Pfam (<http://pfam.xfam.org/search/sequence>), demostró que dicha proteína no presentaría los sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  característicos de las enzimas multicobre oxidasa, sugiriendo que esta proteína no sería la laccasa buscada.

**Tabla 1.2** Proteínas identificadas por Espectrometría de Masa (EM) a partir de los spots seleccionados.

Proteína identificada por EM	Masa teórica (kDa)
"Catalasa/Peroxidasa HPI" de <i>S. meliloti</i> (WP_013845176)	80
"Polinucleotido fosforilasa/poliadenilasa" de <i>S. meliloti</i> (YP_001329099)	77.5
"Chaperona molecular DnaK" de <i>S. meliloti</i> (AAA64925)	69.9
"Proteína ribosomal 30S S1" <i>S. meliloti</i> (CAA30404)	62.6
"Producto del gen groEL6" de <i>S. meliloti</i> (AAA26285)	57
"Fosfopiruvato hidratasa" de <i>S. meliloti</i> (NP_385549)	44.9
"Subunidad beta de Succinyl-CoA sintetasa" de <i>S. meliloti</i> (NP_387161)	42.1
"Subunidad alfa de RNA polimerasa" de <i>S. meliloti</i> (NP_385486)	37.1
"Proteína de unión a sustrato del transportador de azúcar tipo ABC" de <i>S. meliloti</i> (NP_436842)	35.5

La estrategia para la purificación de la enzima se basó en la presencia en la misma de sitios de unión a cobre, empleándose por tal motivo una cromatografía de afinidad a metales con una matriz de  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA. Al tratarse de una enzima nativa de estructura desconocida las condiciones de trabajo empleadas durante la cromatografía fueron suaves, evitando el uso de competidores fuertes durante los pasos de lavado, así como empleando bajas concentraciones de imidazol (50 mM) a la hora de realizar la elución. Esto explicaría la presencia y posterior identificación de proteínas presentes en los eluidos sin sitios de unión a metales. La presencia de estas proteínas en el eluido se explicaría por interacciones con la matriz del tipo inespecíficas.

El análisis visual directo no permitió detectar proteínas de expresión diferencial en los cultivos crecidos en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , pero al tratarse de una enzima podría explicarse si la concentración de la misma no permitiera su detección por revelado con Coomassie. Por otro lado, sería conveniente la utilización de programas para el análisis de geles, tales como ImageQuant™ TL y ImageMaster 2D Platinum 7.0, para la detección de diferencias.

Otra posibilidad es que la enzima se expresara tanto en presencia como en ausencia del inductor, pero que en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , permaneciera inactiva. En este caso no se observaría una banda de expresión diferencial en los geles de poliacrilamida. Interessantemente, al realizar un zymograma de las fracciones eluidas de la IMAC utilizando extractos producidos en ambas condiciones, se observó una banda con actividad laccasa también en aquellos eluidos obtenidos a partir del extracto producido en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 1.6). Este resultado indica que la enzima se produciría en ambas condiciones de cultivo. El hecho de que no se pudiera detectar actividad laccasa en los extractos provenientes de células crecidas en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y que luego de la cromatografía de afinidad, sí se observara actividad, sugiere que la misma se activaría luego de ser sometida a la IMAC. Esto podría deberse a: i) la enzima se activa por las condiciones a la que se somete durante la IMAC (presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y/o imidazol) o ii) durante dicha cromatografía se elimina algún inhibidor de la enzima.

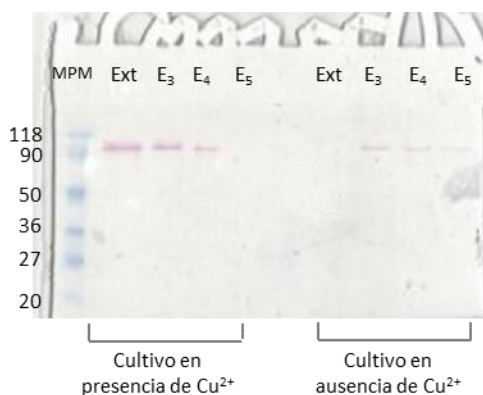


Figura 1.6 Zymograma - Detección de actividad enzimática en gel de poliacrilamida. Se sembró el extracto celular (Ext) y los eluidos ( $E_n$ ) recogidos durante la IMAC, de extractos obtenidos en ambas condiciones ensayadas: cultivo en presencia y ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Con el objetivo de estudiar si la presencia de cobre y/o imidazol era capaz de activar la enzima producida en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , se incubó al extracto celular obtenido a partir de dicha condición de cultivo con cantidades variables de cobre e imidazol y con la combinación de ambos. Para ello, se agregó a la mezcla de reacción sulfato de cobre y/o imidazol y luego de 20 min de incubación a temperatura ambiente se observó si había desarrollo de color por adición de sustrato (siringaldazina). Las concentraciones de cobre evaluadas fueron: 0.1, 1, 2.5 y 5 mM, mientras que las de imidazol fueron 2, 20, 30 y 50 mM.

Se observó actividad laccasa (desarrollo de color) cuando el extracto celular producido en ausencia de cobre (sin actividad laccasa corroborada) se incubó con una mezcla de  $\text{Cu}^{2+}$  e imidazol. No se observó actividad laccasa cuando se incubó con los compuestos por separado. Este efecto se vio para todas las concentraciones de cobre estudiadas, pero sólo en presencia de imidazol 20 y 30 mM. Estos resultados sugieren que para la activación de la enzima producida en ausencia de cobre es necesaria la presencia tanto de cobre como de imidazol en determinadas concentraciones. Dado que las laccasas son metaloproteínas con cuatro átomos de  $\text{Cu}^{2+}$ , no sorprende el requerimiento de cobre para su activación. Es sabido que los grupos imidazol se unen a metales, por lo que es posible que estos grupos interactúen con algunos átomos de cobre de la laccasa causando un cambio en su conformación que expusiera nuevos ligandos para la unión a  $\text{Cu}^{2+}$  o bien desplazar algún ion metálico diferente de cobre unido a las histidinas del sitio de unión (lo cual mantendría a la enzima inactiva), permitiendo luego que el cobre se una y active a la enzima. Concentraciones elevadas de imidazol podrían interferir con la adecuada incorporación de los átomos de cobre en la enzima, lo que explicaría la falta de activación al emplear concentraciones mayores a 30 mM.

El incremento en la actividad de laccasas por incubación con imidazol o cobre se ha reportado por algunos autores (Baldrian y Gabriel, 2002; Arias et al., 2003; Chen et al., 2004; Miyazaki, 2005; Rosconi et al., 2005; Niladevi et al., 2008; Mukhopadhyay et al., 2013; Mollania et al., 2013; Suzuki et al., 2014). Sin embargo, según Rosconi et al. (2005) la laccasa producida por CE52G se inhibiría por la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  10 mM. Hasta donde sabemos, este sería el primer reporte de activación de una enzima laccasa por la presencia combinada de cobre e imidazol.

### 1.1.2. Estrategia ii - Purificación por cromatografía de intercambio iónico seguido de IMAC y control por SDS-PAGE

Dado que la estrategia ensayada anteriormente no permitió identificar la enzima de interés, se decidió cambiar la estrategia de purificación. En ésta, el extracto celular (obtenido en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ ) se fraccionaría en primer lugar mediante cromatografía de intercambio iónico y luego, las fracciones parcialmente purificadas, se someterían a una IMAC.

Para esto, se sometió el extracto celular a dos intercambios iónicos (II) seguidos. Un primer II negativo con el fin de separar aquellas proteínas con punto isoeléctrico (pI) mayor al de la laccasa de CE52G, y un segundo II, en este caso positivo, donde la enzima de interés quedara retenida a la columna por interacción electrostática. Finalmente a la fracción eluída con mayor actividad laccasa se le realizó una IMAC.

La Tabla 1.3 muestra los valores de los diferentes parámetros que indican el grado de purificación obtenidos durante esta segunda estrategia de purificación.

**Tabla 1.3** Evaluación de la purificación de la laccasa presente en el extracto enzimático producido en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  a través de dos intercambios iónicos sucesivos y una IMAC.

Fracción	Vol (mL)	Proteína (mg)	Ue (U/mL)	Ut	A.E (Ut/mg)	Factor de Purificación	Factor de Recuperación
Extracto	0,6	3,37	752,9	451,7	136,8	1	100%
PD-10 pH6	3,4	2,95	192,2	653,5	221,2	-	-
Perc. CM	2,5	1,44	125,2	312,9	217,3	1,6	69%
PD-10 pH5	3,1	1,07	66,0	204,6	191,2	-	-
Eluído DEAE	1,3	0,21	48,6	63,2	300,1	2,2	14%
Eluído IMAC	1	0,16	70,4	70,4	440,0	3,3	16%

\*Donde, Perc. CM: Percolado de la Cromatografía de Intercambio catiónico, PD-10 pH6: Eluído de PD-10 pH6, Eluído DEAE: Eluído con actividad laccasa de la cromatografía de intercambio aniónico, PD-10 pH5: Eluído de PD-10 pH5 y Eluído IMAC: Eluído con la actividad laccasa de la cromatografía de afinidad a metales.

De la Tabla 1.3 se desprende que el grado de purificación obtenido al final de la estrategia fue similar al obtenido en la estrategia anterior (Tabla 1.1), sugiriendo que el agregado de una nueva etapa de purificación no contribuiría a mejorar la recuperación y purificación de la enzima.

La Figura 1.7 muestra el perfil electroforético de las fracciones proteicas obtenidas durante los distintos pasos de purificación realizados. Debido a la baja concentración proteica alcanzada en el último paso de purificación, fue necesaria la tinción del gel utilizando nitrato de plata en lugar de Coomassie. La fracción de elución con actividad laccasa obtenida de la IMAC mostró un perfil de pocas bandas proteicas, la mayoría muy tenues. La banda mayoritaria presentó un tamaño molecular similar al reportado previamente para la laccasa (95kDa) y fue por este motivo seleccionada para su identificación por mapeo peptídico por MALDI-TOF. Esta proteína se identificó como una Polinucleótido fosforilasa/poliadenilasa de *S. meliloti*, coincidiendo con una de las proteínas ya identificadas a partir de los gels bi-dimensionales.

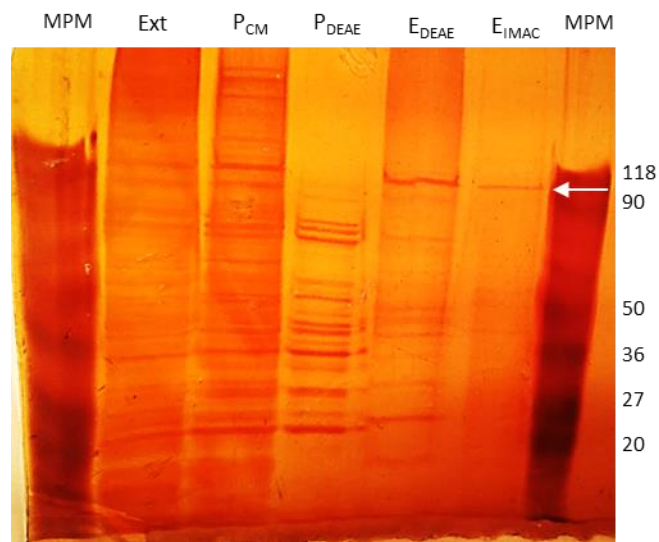


Figura 1.7 SDS-PAGE del extracto enzimático y las distintas fracciones de purificación. Donde, Ext: extracto enzimático, P<sub>CM</sub>: Percolado de la Cromatografía de Intercambio Catiónico, P<sub>DEAE</sub>: Percolado de la Cromatografía de Intercambio Aniónico, E<sub>DEAE</sub>: Eluido con actividad laccasa de la Cromatografía de Intercambio Aniónico y E<sub>IMAC</sub>: Eluido con la actividad laccasa de la cromatografía de afinidad a metales. Se indican los tamaños moleculares en kDa de las bandas del marcador de peso molecular. Se indica también con una flecha la banda proteica seleccionada para su identificación por espectrometría de masa.

Mediante este abordaje proteómico no fue posible identificar la proteína de *Sinorhizobium meliloti* CE52G capaz de oxidar al sustrato típico de las laccasas, la siringaldazina. Como se mencionó anteriormente dicho sustrato puede ser oxidado también por enzimas peroxidadas, sin embargo trabajos previos con Sm CE52G demostraron que la enzima responsable de la oxidación de la siringaldazina no sería una peroxidasa (Castro-Sowinski et al., 2002 y Rosconi et al., 2005). Hasta donde

sabemos, no se han encontrado reportes de otras enzimas capaces de oxidar siringaldazina.

Por último, no se puede descartar la posibilidad de que la laccasa de Sm CE52G sea una proteína bifuncional, que en determinadas condiciones presenta actividad secundaria polifenol oxidasa. En el Capítulo 2 se discute con mayor profundidad sobre esta posibilidad. En forma de adelanto, se han descrito catalasas con actividad polifenol oxidasa adicional (Kocabas et al., 2008).

En conjunto, los resultados permiten obtener nueva información sobre la enzima capaz de oxidar siringaldazina producida por CE52G. Los resultados sugieren que dicha enzima se produce bajo las dos condiciones ensayadas, presencia y ausencia de cobre, y que la misma se activa en presencia de cobre e imidazol.

A continuación, se empleó un abordaje genómico con el fin de identificar el gen codificante de la laccasa en estudio. La metodología empleada y los resultados obtenidos se describen en el siguiente capítulo de la tesis.

## CAPÍTULO 2

*“No hay enigmas, si un problema puede plantearse, es que puede resolverse.”*  
Ludwig Wittgenstein

## **CAPITULO 2 - Identificación de las laccasas producidas por *S. meliloti* CE52G y *Pseudomonas* sp. AU10 mediante un abordaje genómico**

### **MARCO TEÓRICO Y ESTRATEGIA DE TRABAJO**

Este capítulo describe el abordaje genómico empleado con el fin de identificar el o los genes codificante(s) para las enzimas laccasas de *Sinorhizobium meliloti* CE52G, y de *Pseudomonas* sp. AU10. AU10 es un aislamiento antártico capaz de producir una proteasa extracelular activa a baja temperatura (Martinez-Rosales y Castro-Sowinski, 2011). Durante la realización de esta tesis, observamos que esta cepa tiene además la capacidad de oxidar 2,6-dimetoxifenol, un sustrato típico de las enzimas laccasas.

Basados en la existencia de sitios conservados de unión a cobre presentes en las enzimas laccasas, se emplearon cebadores degenerados dirigidos a las secuencias conservadas presentes en los sitios de unión a cobre de laccasas de origen bacteriano. Por amplificación, estos cebadores nos permitieron obtener parte del gen codificante para la laccasa. A partir de esa secuencia y mediante el empleo de la metodología de PCR inversa, se logró determinar la secuencia codificante completa para una de estas enzimas, así como parte de su contexto genómico.

Con la finalidad de caracterizar algunas propiedades de esta enzima, se realizó el análisis *in silico* de la secuencia codificante obtenida, empleando diversas herramientas bioinformáticas tales como "Compute pI/Mw" del portal ExpASY, pSORTb, SignalP 4.1, Aggrescan y BPRM. Estas herramientas nos permitieron conocer el tamaño y punto isoeléctrico teórico de la enzima, así como la posible localización subcelular, presencia de péptido señal y puntos calientes de agregación, entre otras propiedades.



## MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Durante este capítulo se trabajó con el aislamiento *Sinorhizobium meliloti* (Sm) CE52G (Castro-Sowinski et al, 2002) y con el aislamiento *Pseudomonas* sp. AU10 (Martinez-Rosales y Castro-Sowinski, 2011). El crecimiento y mantenimiento de CE52G se realizó en medio TY suplementado con CaCl<sub>2</sub> (Anexo 1), mientras que AU10 se creció y mantuvo en el medio LB (Anexo 1). Ambas cepas se almacenaron en glicerol 20%, a -80 °C.

### 2.2 Amplificación de genes codificantes para laccasas utilizando cebadores degenerados

#### 2.2.1. Extracción de ADN genómico

El siguiente protocolo fue adaptado de Sambrook et al. (1989). Se tomaron 3 mL de cultivos frescos (24 h) de los microorganismos (CE52G y AU10) en estudio y las células se separaron mediante centrifugación (9000 g, 2 min). Las mismas se lavaron con 1,5 mL de NaCl 1M y posteriormente con 1,5 mL de buffer T<sub>10</sub>E<sub>25</sub> (Tris-HCl 10 mM, EDTA 25 mM) (pH 8,0). Una vez lavadas, las células se suspendieron en 0,7 mL de T<sub>10</sub>E<sub>25</sub> (pH 8,0) con agitación fuerte. Para romper la pared celular se adicionaron 2,8 µL de una solución de lisozima 100 mg/mL y para digerir el ARN se agregaron 30 µL de una solución de ARNasa 10 mg/mL. Se mezcló por inversión y se incubó 30 min a 37 °C. Se agregaron 125 µL de una solución conteniendo sarkosyl 10% (p/v) y proteinasa K 5 mg/mL. Se mezcló por inversión y se incubó 1 h a 37 °C. Las impurezas del ADN se extrajeron con igual volumen de fenol teniendo la precaución de mezclar bien las fases hasta obtener una emulsión. Las fases se separaron por centrifugación durante 5 min a 12000 g y se extrajo la fase acuosa conteniendo el ADN. Posteriormente, se realizaron dos extracciones con cloroformo de igual forma que se hizo con el fenol. Por último, se precipitó el ADN contenido en la fase acuosa adicionando 0.1 volúmenes de acetato de amonio 3 M y 0.6 volúmenes de isopropanol. Se dejó precipitando entre 12 y 16 h a -20 °C. Se centrifugó durante 10 min a 10000 g, se descartó el sobrenadante y se lavó el ADN con etanol 70% frío. Finalmente, el ADN se secó por vacío durante 10 min. El "pellet" de ADN se suspendió en 50 µL de buffer T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Tris-Hcl 10 mM, EDTA 1mM). La integridad y concentración del ADN genómico se estimaron por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE (Tris acetato 40mM, EDTA 1mM), a 90 V. El ADN

se visualizó por tinción con Goodview y exposición a luz UV. Se agregaron 1,2 µL del colorante directamente a 50 mL de solución del gel de agarosa.

### 2.2.2. Amplificación mediante PCR

Con el objetivo de identificar el gen codificante para la enzima con actividad laccasa de CE52G y AU10 se utilizaron cebadores degenerados reportados previamente por Fang et al. (2011). Estos cebadores se diseñaron en base a secuencias relativamente conservadas de los sitios de unión a cobre de laccasas bacterianas, y permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 1100 pb. La secuencia de los cebadores empleados se indica en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Cebadores empleados para la amplificación de fragmentos conservados de genes que codifican para laccasas bacterianas.

Cebadores degenerados:		
Nombre	Secuencia 5´-3´	Tm (°C)
<b>Cu1F</b>	ACM WCK GTT CAY TGG CAC GG *	58.4
<b>Cu4R</b>	TGN TCN AGN AWG TGR CAR TG *	52.3

\*En el Anexo 3 se encuentran las equivalencias de las bases degeneradas.

La mezcla de reacción de PCR, para un volumen final de 25 µL, fue la siguiente: 2,5 µL de buffer 10X (Tris-HCl 100 mM, KCl 400mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, pH 9.0); 2,5 µL de dNTP´s 2 mM; 2,5 µL de cada cebador 10 µM; y 0,3 µL de U-Taq DNA polimerasa 5U/µL (SBS Genetech). Se completó el volumen con agua apirógena estéril para inyectables. Se utilizaron 2 µL de una solución de ADN genómico diluido 1/100 (o agua en el caso del control negativo). Todos los reactivos fueron preparados en agua estéril.

El ciclado consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C, durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación de cebadores a 48-63 °C (gradiente) durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min. Por último, se realizó un ciclo final de extensión a 72 °C durante 5 min.

Se verificó la presencia y el tamaño del fragmento amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE. Se utilizó 1 µL del marcador de tamaño molecular GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas, #SM1332) para confirmar el tamaño del fragmento de amplificación. La corrida electroforética se

realizó a 90V, durante 1 h. Los fragmentos se visualizaron por tinción con Goodview y exposición a luz UV como se describió anteriormente.

### 2.2.3. Purificación de los productos de amplificación

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa y se purificaron utilizando el Kit comercial de extracción marca Bioline "Isolate PCR and Gel kit" (BIO-52029) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para estimar la calidad y concentración del ADN purificado.

### 2.2.4. Clonado de los productos de amplificación

Los productos de amplificación aislados se clonaron en el vector pTZ57R/T utilizando el kit "Ins T/A clone" (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.2.5. Preparación de células quimio-competentes

Se prepararon células quimio-competentes de *E. coli* DH5a siguiendo el protocolo de Inoue et al. (1990).

### 2.2.6. Transformación a células quimio-competentes

La transformación se llevó a cabo mediante choque térmico, empleando células de *E. coli* DH5a quimio-competentes.

Se incubó en hielo por 30 min una mezcla conteniendo 5  $\mu$ L del producto de ligación y 50  $\mu$ L de células competentes de *E. coli* DH5a, seguido del siguiente choque térmico: 90 seg a 42 °C y 2 min en hielo; el procedimiento se repitió dos veces. Se adicionaron 350  $\mu$ L de medio LB y las células se incubaron a 37 °C, en agitación, durante 90 min para su recuperación. El producto de transformación se plaqueó en LB conteniendo Amp (0.1 mg/mL), XGal (0.4 mg/mL) y IPTG (0.8 mg/mL) y se dejó incubando a 37 °C toda la noche.

Se seleccionaron un número representativo de clones conteniendo el vector con el inserto (colonias blancas) y se verificó la presencia de inserto por PCR utilizando como templado el ADN plasmídico extraído de los clones. Se empleó el ciclado y los cebadores degenerados descritos anteriormente, con la excepción que la temperatura de hibridación elegida fue 60 °C.

### 2.2.7 Extracción del ADN plasmídico y secuenciación del inserto

Para la extracción del ADN plasmídico, las células se crecieron en 5 mL de medio líquido LB-Amp (0.1 mg/mL) durante toda la noche a 37 °C. Las células se recuperaron por centrifugación durante 1 min a 10000 g, el "pellet" se suspendió en 300 µL de Solución I fría (Anexo 4) y se incubó 5 min en hielo. A continuación se adicionaron 300 µL de Solución II (Anexo 4) recién preparada y se mezcló por inversión del tubo, se dejó reposar en hielo durante 5 min. Se agregaron 300 µL de cloroformo y 300 µL de Solución III (Anexo 4) y se mezcló mediante el empleo de vórtex. Se centrifugó a 17000 g durante 10 min y se recuperó el sobrenadante al cual se le adicionaron 660 µL de isopropanol. Se centrifugó nuevamente a 5000 g durante 30 min y se descartó el sobrenadante. El ADN plasmídico así obtenido se lavó con etanol 70 % y se secó en vacío durante 10 min para evaporar los restos de alcohol. El ADN se resuspendió en 100 µL de agua milliQ estéril. Para digerir el ARN contaminante se realizó una incubación durante 15 min a 37 °C con 1 µL de una solución de ARNasa 10 mg/mL mL libre de ADNasa (Anexo 4).

El estado y la concentración del ADN plasmídico se estimó por electroforesis en gel de agarosa 1 %. Los insertos se enviaron al servicio del Instituto Pasteur Montevideo para su secuenciación utilizando los cebadores universales M13F y M13R-pUC(-40) (Tabla 2.2).

Una vez obtenida la secuencia, la misma se corroboró re-secuenciando un fragmento de amplificación obtenido utilizando cebadores específicos.

### 2.2.8. Diseño de cebadores específicos y amplificación

Para el diseño de cebadores específicos dirigidos hacia regiones conocidas del gen se empleó la herramienta Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). La ausencia de estructuras secundarias y la posibilidad de la formación de dímeros entre cebadores se analizaron utilizando el programa GenRunner (<http://www.generunner.net/>). En la Tabla 2.2 se describen los cebadores empleados para la dilucidación de la secuencia codificante.

La amplificación se realizó utilizando la misma mezcla de reacción que se utilizó con los cebadores degenerados. El ciclado consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C, durante 5 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación de cebadores a 55 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 80 seg. Por último, se realizó un ciclo final de extensión a 72 °C durante 5 min.

**Tabla 2.2** Cebadores empleados para la dilucidación de la secuencia codificante

<b>Cebadores específicos: amplificación de una región interna de la CDS</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5´-3´</b>	<b>Tm (°C)</b>
<b>LacAU10f</b>	GTG CCT TAC GTC TCG CAA T	57.3
<b>LacAU10r</b>	AGT ACG GGA TCA CCT TGT GG	60.5
<b>Cebadores para la amplificación por PCR inversa</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5´-3´</b>	<b>Tm (°C)</b>
<b>LacAU10_Out_f</b>	CCA CAA GGT GAT CCC GTA CT	60.5
<b>LacAU10_Out_r</b>	ATT GCG AGA CGT AAG GCA C	57.3
<b>Cebadores para la amplificación de la CDS</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5´-3´</b>	<b>Tm (°C)</b>
<b>PNP_GTPf</b>	AAC GAA CTG AAC ATC GGC CA	58.4
<b>PNP_GTPr</b>	CAG CGT TGT TTG CGG GTT GAA TC	60.5
<b>Cebadores universales para la secuenciación de los fragmentos clonados</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5´-3´</b>	<b>Tm (°C)</b>
<b>T7 promotor</b>	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	51
<b>T7 terminador</b>	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	46
<b>M13F</b>	GTA AAA CGA CGG CCA GT	52
<b>M13R-pUC(-40)</b>	CAG GAA ACA GCT ATG AC	50

### 2.3 Obtención de la secuencia completa del gen codificante para la laccasa

La secuencia completa del gen codificante para la enzima con actividad laccasa de AU10 se completó empleando la metodología de PCR inversa (PCRi) (Figura 2.1). La técnica consiste en la amplificación de un fragmento de ADN utilizando como ADN molde fragmentos de ADN genómico ligados sobre sí mismos y generados a partir de una digestión del mismo con enzimas de restricción que no cortan el segmento de ADN cuya secuencia ya se conoce. Para la amplificación se utilizan cebadores que hibridan

sobre una región interna de secuencia conocida, pero dirigidos hacia fuera de la misma (Figura 2.1).

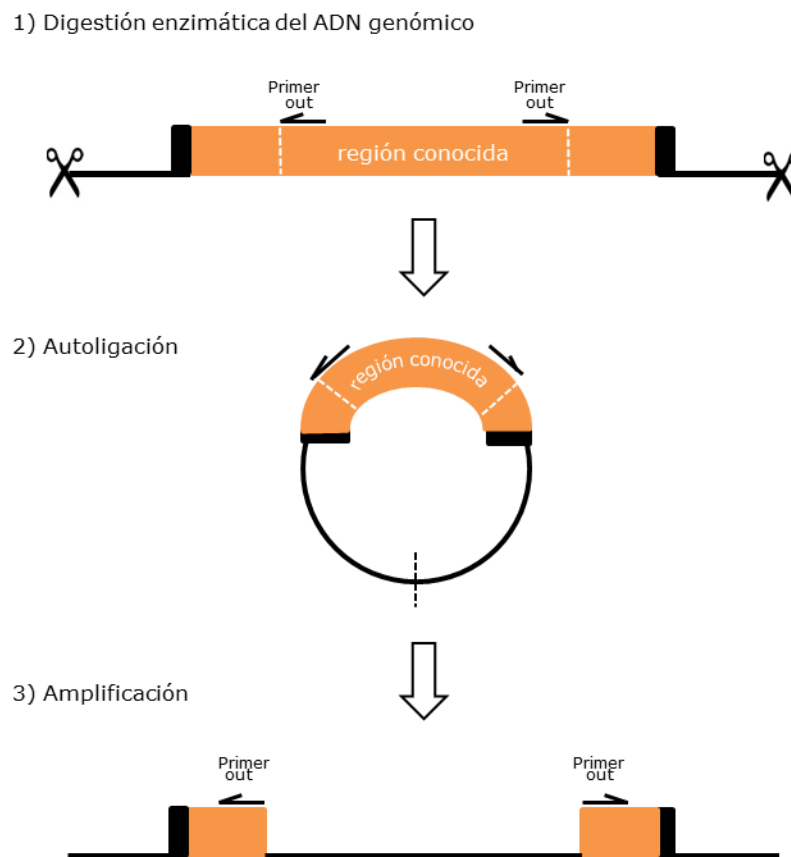


Figura 2.1 Representación esquemática de la metodología PCR inversa empleada para la obtención completa de la secuencia codificante para la laccasa

El ADN genómico (ADNg) de *Pseudomonas sp.* AU10 se digirió con las enzimas de restricción *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuI*, *SacI*, *XbaI* y *XhoI* (Fermentas), ninguna con sitios de corte dentro de la secuencia parcial del gen ya dilucidada. Las digestiones se realizaron en un volumen final de 15  $\mu\text{l}$ , conteniendo 5  $\mu\text{l}$  de ADNg (aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de ADNg), 1  $\mu\text{l}$  de la enzima de restricción correspondiente (10U), 1.5  $\mu\text{l}$  del buffer de reacción 10X suministrado por el proveedor y 7.5  $\mu\text{l}$  de agua, y se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 16 h. La calidad de la digestión se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las enzimas de restricción se inactivaron calentado a 65  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 min, a excepción de *XhoI* que se inactivó por incubación a 80  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 min.

Para favorecer la autoligación de los fragmentos de ADN, se utilizó un volumen final de reacción de 200  $\mu\text{l}$ . Se mezclaron en forma independiente, 10  $\mu\text{l}$  de las

digestiones, 20 µl de buffer de ligación 10X, 2 µl de T4 DNA Ligasa (Thermo Scientific, Cat. EL0014) y agua milliQ hasta el volumen deseado. Las reacciones se incubaron 16 hs a 4 °C. Posteriormente la ligasa se inactivó por calentamiento a 65 °C durante 10 min y las autoligaciones se utilizaron como molde para la reacción de PCR inversa.

El diseño de los cebadores utilizados se realizó tomando los cebadores específicos (LacAU10f y LacAU10r) pero cambiando la orientación de los extremos (5' por 3'), obteniendo cebadores dirigidos hacia afuera de la secuencia conocida (LacAU10\_Out\_f y LacAU10\_Out\_r) (Tabla 2.2).

La amplificación se realizó utilizando el "RANGER Mix" de BIOLINE (Cat. BIO-25051). Este mix contiene una polimerasa de alta procesividad y con actividad correctora de prueba, específicamente diseñada para la amplificación de fragmentos largos de ADN. Se preparó la reacción en un volumen final de 25 µl, conteniendo 12.5 µl del mix Ranger 2X (contiene: polimerasa, dNTPs y MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 1.5 mM), 1.25 µl de una solución 10 µM de cada cebador, 2 µl de autoligación y agua milliQ hasta completar 25 µl. Se realizaron controles negativos conteniendo ADNg sin digerir o agua, en lugar de la mezcla de autoligación. El ciclado consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación de cebadores a 56 °C durante 1 min y extensión a 68 °C durante 6 min. Por último, se realizó un ciclo final de extensión a 68 °C durante 6 min. La temperatura de extensión óptima se determinó previamente realizando un gradiente de temperaturas.

La presencia de productos de amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1%. Los fragmentos amplificados se purificaron, clonaron en el plásmido pTZ57R/T y secuenciaron siguiendo el mismo procedimiento que se indicó anteriormente (puntos 2.4-2.7). La secuencia nucleotídica se analizó utilizando la herramienta informática BLAST del servidor NCBI y se construyó la secuencia codificante (CDS) completa del gen utilizando el programa DNA Baser Sequence Assembler ([www.DnaBaser.com](http://www.DnaBaser.com)) y la herramienta bl2seq ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=blast2seq&LINK\\_LOC=align2seq](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq)).

Por último, para confirmar la secuencia obtenida así como su contexto genómico se diseñaron cebadores para el reconocimiento de secuencias corriente arriba y corriente abajo del gen (PNP\_GTPf y PNP\_GTPr) (Tabla 2.2). La amplificación se realizó utilizando el producto "RANGER Mix" de BIOLINE, la mezcla de reacción fue idéntica a

la descrita anteriormente con la excepción de que se utilizó como molde ADN genómico de AU10. El ciclado consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación de cebadores a 56 °C durante 1 min y extensión a 68 °C durante 1:30 min. Por último, se realizó un ciclo final de extensión a 68 °C durante 5 min. El fragmento amplificado se purificó, se clonó en el plásmido pTZ57R/T y se secuenció siguiendo el mismo procedimiento que se indicó anteriormente (puntos 2.4-2.7).

### *2.3.1. Análisis filogenético de la secuencia codificante*

Se construyó un árbol filogenético para evaluar la relación entre la secuencia codificante obtenida y secuencias representativas de diferentes laccasas y multicobre oxidasas de origen bacteriano obtenidas de la base de datos NCBI.

Se realizó un alineamiento de las secuencias empleando la herramienta CLUSTAL W y posteriormente se empleó los algoritmos Neighbour Joining (NJ) y Maximum Parsimonia (MP) para la construcción del árbol filogenético usando el programa MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013). Se utilizó un bootstrap de 1000 réplicas.

### *2.3.2. Análisis in silico de la secuencia codificante*

Se analizó la secuencia codificante de la laccasa de AU10 empleando diferentes herramientas informáticas. Se calculó el tamaño molecular y punto isoeléctrico teóricos empleando la herramienta "Compute pI/Mw" del portal ExpASY (<http://www.expasy.org/>).

Conjuntamente, se estudió la potencial localización subcelular de la proteína empleando las herramientas SPL-Local (Matsuda, et al., 2005) (<http://sunflower.kuicr.kyoto-u.ac.jp/~smatsuda/slplocal.html>) y pSORTb 3.0 (Yu et al., 2010) ([www.psort.org/psortb](http://www.psort.org/psortb)). La presencia de péptidos señal que dirigieran su localización se evaluó mediante la herramienta SignalP 4.1 (Peterson et al., 2011) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

La búsqueda de posibles dominios conservados dentro de la secuencia de la proteína se llevó a cabo con la herramienta PROSITE de EXPASY, PFAM e INTERPROSCAN.

Se predijo también la presencia de puntos calientes de agregación (o "hot spots") mediante el empleo de la herramienta Aggrescan (<http://bioinf.uab.es/aggrescan/>).



Por último, se utilizó la herramienta BPROM del servidor Softberry (Solovyev y Salamov, 2011) para analizar la secuencia nucleotídica corriente arriba del sitio de inicio de la traducción en búsqueda de posibles promotores.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1 Amplificación de genes codificantes para laccasas utilizando cebadores degenerados

Para poner a punto la amplificación de los fragmentos de ADN, se utilizó como molde el ADN genómico de CE52G y se probaron diferentes temperaturas de hibridación de los cebadores degenerados. Se observó que, para todas las temperaturas ensayadas, se amplificaba una banda del tamaño esperado, aproximadamente 1100 pb. No obstante, para alguna de las temperaturas se obtuvo más de un producto de amplificación.

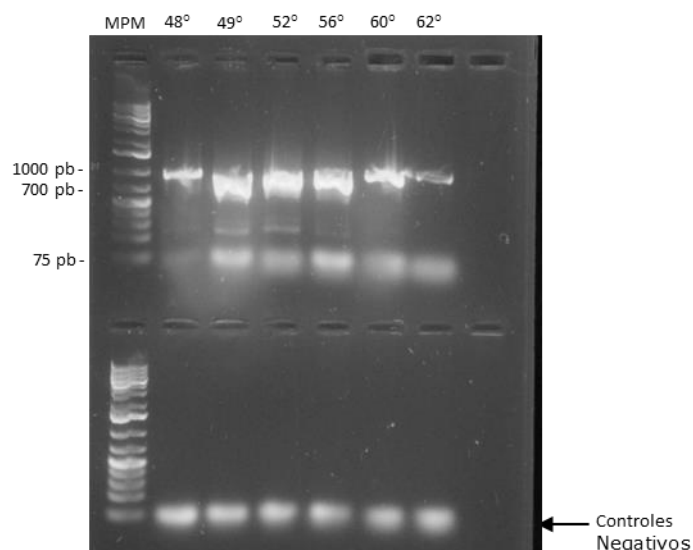


Figura 2.2 Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos obtenidos al realizar la amplificación con cebadores degenerados, empleando como molde ADN genómico de CE52G. Sobre el gel se indican: las diferentes temperaturas de hibridación utilizadas durante la PCR (en °C); el marcador de tamaño molecular (MPM): GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder y los controles negativos (-), utilizando agua estéril en sustitución del ADN.

Si bien la temperatura de fusión ("melting":  $T_m$ ) promedio de los cebadores es 55,3 °C, y se debería trabajar con una temperatura de hibridación menor a ella, se optó por continuar trabajando con una temperatura de hibridación de 60 °C para evitar amplificación inespecífica. En la Figura 2.3 se muestran los productos de amplificación obtenidos al emplear ADNg proveniente de las cepas CE52G y AU10. Se logró amplificar una banda para cada ADNg analizado, aunque ambas bandas mostraron

diferente tamaño molecular. En el caso de que los cebadores empleados efectivamente hibridaran con regiones codificantes para enzimas laccasas, la diferencia de tamaño del fragmento amplificado sugiere la posibilidad de diferencias en el tamaño de ambas enzimas. La diversidad de tamaño entre laccasas bacterianas ha sido previamente reportada (Sharma et al., 2007; Singh et al., 2011).

La purificación de fragmentos se realizó mediante el uso del Kit de Bionline; los fragmentos se clonaron y los plásmidos se transformaron como se indica en Materiales y Métodos del presente capítulo.

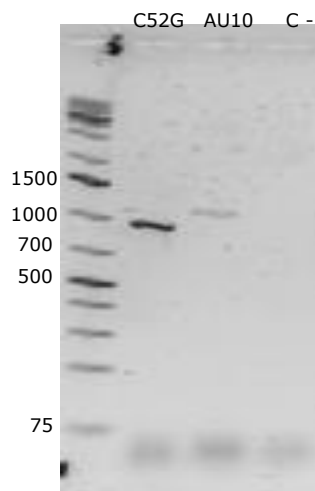


Figura 2.3 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos al amplificar con cebadores degenerados, empleando como molde ADN genómico de Sm CE52G y *Pseudomonas* sp. AU10. Sobre el gel se indican los tamaños moleculares de algunas de las bandas del marcador en pb (GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder) y el control negativo (C-) utilizando agua estéril en sustitución del ADN.

De cada producto clonado se seleccionaron ocho clones conteniendo el vector con el inserto (colonias blancas) y se corroboró la presencia del inserto realizando una nueva ronda de amplificación a partir del ADN plásmidico. En la Figura 2.4 se muestran los resultados obtenidos para los fragmentos clonados de ADN de CE52G y AU10. En todos los casos, excepto uno (carril 7 de la Figura 2.4), se observó un producto de amplificación del tamaño esperado, indicando la presencia del inserto.

A continuación se seleccionaron múltiples clones de cada transformación (conteniendo el inserto) y su ADN plasmídico se envió a Macrogen (Corea) para la secuenciación del inserto a partir de las regiones del vector que hibridan con los cebadores universales M13F y M13R-pUC(-40) (Tabla 2.2). En la Tabla 2.3 se indican los resultados obtenidos luego del análisis de las secuencias.

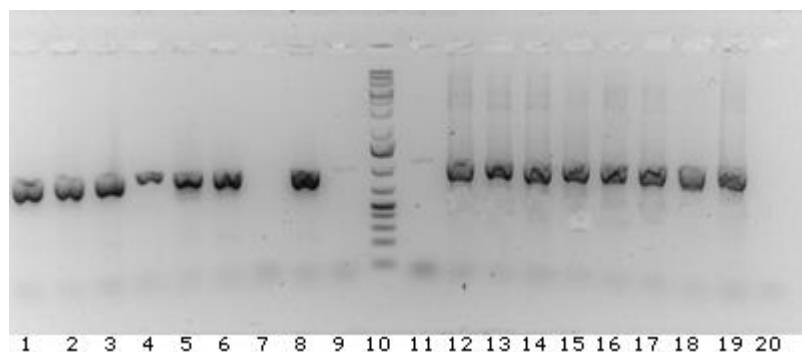


Figura 2.4 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos obtenidos en la PCR, usando ADNp de los clones seleccionados como molde. Carriles 1-8: fragmentos amplificados a partir del ADNp de los clones conteniendo al inserto proveniente de Sm CE52G, carril 9: fragmento amplificado a partir de ADNg de CE52G, carril 10: Marcador molecular (GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder: 20, 10, 7, 5, 4, 3, 2, 1.5, 1, 0.7, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.075 kb), carril 11: fragmento amplificado a partir de ADNg de *Pseudomonas* sp. AU10, carriles 12-19: fragmentos amplificados a partir del ADNp de los clones conteniendo al inserto proveniente de AU10, carril 20: control negativo empleando agua como templado.

**Tabla 2.3** Resultado de la comparación de las secuencias obtenidas de los clones con las secuencias depositadas en la base de datos NCBI, empleando la herramienta Blastx.

Clon	Descripción de la secuencia identificada	% de Identidad	Nº de acceso
Sm CE52	1 Integrasa de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	95	WP_028055526
	2 Integrasa de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	94	WP_028055526
	3 Integrasa de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	97	WP_046067040
	4 Transposasa de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	99	WP_003538006
	5 Catalasa de <i>Campylobacter jejuni</i>	90	Q59296
	6 SocE de <i>Bacillus cereus</i>	99	EDX54372
Pseudomonas sp. AU10	1 Multicobre oxidasa de <i>Pseudomonas</i> sp.	99	WP_033902503
	2 Multicobre oxidasa asociada a la oxidación de Mn de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	96	AAL04023
	3 Multicobre oxidasa asociada a la oxidación de Mn de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	96	AAL04023
	4 Multicobre oxidasa, <i>Pseudomonas syringae</i>	95	ZP_17664669
	5 Multicobre oxidasa <i>Pseudomonas fluorescens</i>	96	ZP_11110115

Los genes identificados en Sm CE52G corresponde a genes codificantes para enzimas integrasa, transposasa y catalasa de *S. meliloti* y para la proteína SocE de *Bacillus cereus* (función desconocida). Tales enzimas están involucradas en diferentes procesos como lo son: recombinación génica (integrasa), transposición (transposasa) y descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (catalasa).

Estos resultados muestran que, para Sm CE52G, el empleo de cebadores degenerados dirigidos hacia las regiones conservadas de los sitios de unión a cobre no permitiría identificar un gen claramente relacionado con la actividad laccasa.

Curiosamente, al igual que como fuera observado al utilizar la aproximación proteómica, mediante la presente estrategia, se amplificó una región de ADN que codificaría para una enzima catalasa en Sm CE52G, aunque no se trataría de la misma CDS en ambos casos. Las catalasas son enzimas antioxidantes que catalizan la conversión de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a agua y oxígeno molecular, protegiendo a las células de su efecto tóxico (Bai y Cederbaum, 2001).

En este sentido, algunos autores han descrito la presencia de catalasas con actividad fenol oxidasa adicional en mamíferos y hongos. Kokabas et al. (2008) reportan la purificación y caracterización de una enzima bifuncional catalasa-fenol oxidasa (CATPO) del hongo termófilo *Scytalidium thermophilum*. Dicha enzima había sido descrita previamente como una enzima extracelular con actividad fenol oxidasa (Ogel et al. 2006), pero luego de su purificación, caracterización, secuenciación aminoacídica y clonado se vio que la misma presentaba una secuencia aminoacídica idéntica a la de una enzima catalasa de *S. thermophilus* y fue por ello redefinida como una catalasa bifuncional con actividad fenol oxidasa adicional. Más aun, durante el mismo trabajo los investigadores realizaron la búsqueda de actividad fenol oxidasa adicional en catalasas provenientes de diferentes orígenes. Para ello, evaluaron la actividad fenol oxidasa de tres catalasas disponibles comercialmente (producidas por *A. niger*, eritrocitos humanos y hígado bovino) y encontraron que todas presentan actividad fenol oxidasa adicional, en mayor o menor medida.

Aunque la identificación de la laccasa producida por CE52G es aún incierta, esta estrategia permitió identificar un gen relacionado con la actividad laccasa (de la familia multicobre oxidasa) en la cepa AU10. Se encontró que el producto de traducir el fragmento amplificado para AU10, presentaría un elevado grado de similitud con parte de una multicobre oxidasa asociada a la oxidación de manganeso de *Pseudomonas fluorescens* (Tabla 2.3). Como se describió anteriormente, las enzimas laccasas forman

parte del grupo de enzimas multicobre oxidasas, junto con las enzimas ascorbato oxidasa, ceruloplasmina, bilirrubina oxidasa, fenoxazinona sintasa y hefaestina (Kosman 2010).

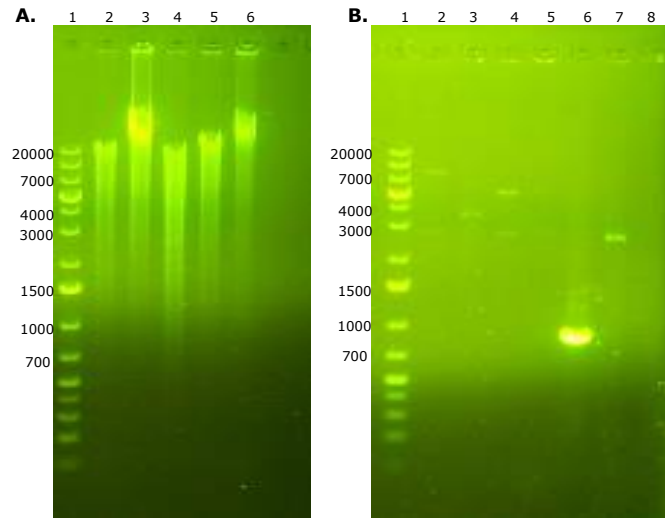
Debido a que no fue posible identificar en forma certera la laccasa de Sm CE52G, al emplear las aproximaciones proteómica y genómica (Capítulos 1 y 2 de esta tesis), sumado al hallazgo del gen codificante para una multicobre oxidasa de *Pseudomonas* sp. AU10, se decidió continuar este trabajo con este gen.

En base a la secuencia nucleotídica parcial de la posible laccasa de AU10, se diseñaron cebadores específicos (LacAU10f y LacAU10r; Tabla 2.2) y se confirmó la secuencia parcial del gen codificante por PCR y posterior secuenciación del producto obtenido.

## **2.2 Obtención de la secuencia completa del gen codificante para la multicobre oxidasa de *Pseudomonas* sp. AU10 y su contexto genómico**

La secuencia codificante (CDS) completa del gen se obtuvo empleando la metodología de PCR inversa (PCRI), como se describió en la sección Materiales y Métodos.

En la Figura 2.5 se muestra la calidad de las digestiones del ADN genómico de AU10 con algunas de las enzimas de restricción empleadas (Fig. 2.5A), así como los fragmentos de amplificación obtenidos empleando como molde las diferentes autoligaciones de los productos de digestión (Fig. 2.5B). Se observa que la técnica de PCRI permitió la amplificación de múltiples fragmentos con tamaños variables.



**Figura 2.5 A.** Restricciones enzimáticas del ADN genómico de AU10 con algunas de las enzimas empleadas para la metodología de PCR inversa, en orden (de izquierda a derecha): marcador molecular (GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder), *EcoRV*, *EcoRI*, *BamHI*, *SacI*, ADNg AU10 sin digerir. **B.** Fragmentos de ADN amplificados por PCRi. Carril 1: marcador de molecular (GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder), carriles 2-5, en orden: fragmentos amplificados utilizando como molde las autoligaciones provenientes de las digestiones con *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* y *SacI*, carriles 6-8: Diferentes controles, en orden: PCR con cebadores específicos de la restricción con *SacI*, PCRi del ADN genómico de AU10 sin digerir, PCRi usando agua como templado (control negativo). Se indican para ambos geles algunas de las bandas del marcador de peso molecular (MM) en pb.

De la observación de la Figura 2.5B surge que los cebadores hibridan con el ADNg sin digerir (Fig. 2.5B, carril 7), amplificando un fragmento inespecífico de 2.8 kpb aproximadamente. Este fragmento también se observa en las PCR donde se utilizó el ADN digerido y autoligado como templado, pero en estos casos, además se observan otros fragmentos de amplificación de mayor tamaño (Fig. 2.5B, carriles 2-5). Se decidió continuar trabajando con el fragmento, mayor a 3 Kpb, obtenido durante la PCRi con el ADN genómico digerido con *EcoRV* (Fig. 2.5B, carril 3). El mismo se purificó desde el gel de electroforesis, se clonó en el vector pTZ57R/T y se transformó a células quimio-competentes de DH5 $\alpha$ . Se seleccionaron algunos clones conteniendo el vector con inserto y se enviaron para su secuenciación a partir de las regiones del vector que hibridan con los cebadores universales M13F y M13R-pUC(-40) (Tabla 2.2).

Con las secuencias obtenidas, editadas y empalmadas se reconstruyó un fragmento genómico de 2738 pb. Del análisis informático de dicho fragmento se pudo identificar la secuencia codificante completa para la multicobre oxidasa, así como información de las regiones flanqueantes al gen. Se determinó que la secuencia

codificante de dicho gen, de ahora en adelante "*lac458*", tendría un codón de inicio inusual GTG (que codifica para valina) y un total de 1377 pb, que se traducirían en una multicobre oxidasa de 458 aminoácidos, de ahora en adelante "LAC458".

En la misma hebra en la que se encuentra el gen *lac458* se encontró, corriente arriba, parte de la secuencia codificante para una Piridoxina 5'-fosfato sintasa (PNP sintasa) de *Pseudomonas fluorescens*. Mientras que corriente abajo del gen y separada por una región intergénica (284 nucleótidos) se identificó el comienzo de la secuencia codificante para una proteína de unión a GTP (GTPasa) de *Pseudomonas fluorescens*, denominada Era (Apendice 1). La Fig. 2.6 muestra un esquema general del contexto genómico en cual se encuentra el gen *lac458*.

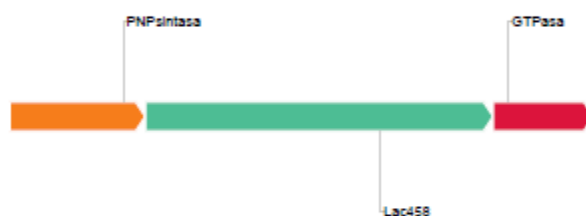


Figura 2.6 Esquema general de la ubicación y contexto genómico del gen *lac458*

Es de destacar que una organización similar se observa también en el genoma de la cepa PAMC26793 de *Pseudomonas* sp.. En dicho genoma se observa corriente arriba del gen codificante para una multicobre oxidasa un gen codificante para una PNP sintasa. Más aun, ésta no sería la única coincidencia entre AU10 y PAMC26793, ya que la secuencia codificante para la multicobre oxidasa de éste último también comenzaría con el codón de inicio inusual GTG. La cepa PAMC26793 fue aislada de una pradera subártica de Alaska (Park et al. 2013).

### 2.2.1. Análisis filogenético de la secuencia codificante

En la Figura 2.7 se muestra el árbol filogenético construido a partir de la secuencia codificante de LAC458 y de secuencias de enzimas laccasas y multicobre oxidasas de origen bacteriano extraídas de la base de datos NCBI. Se emplearon los algoritmos NJ y MP, obteniéndose una topología similar entre ambos árboles, por lo que solo se muestra uno de ellos. Así mismo, en la Tabla 2.4 se muestran los



porcentajes de identidad y similitud entre LAC458 y las diferentes proteínas empleadas.

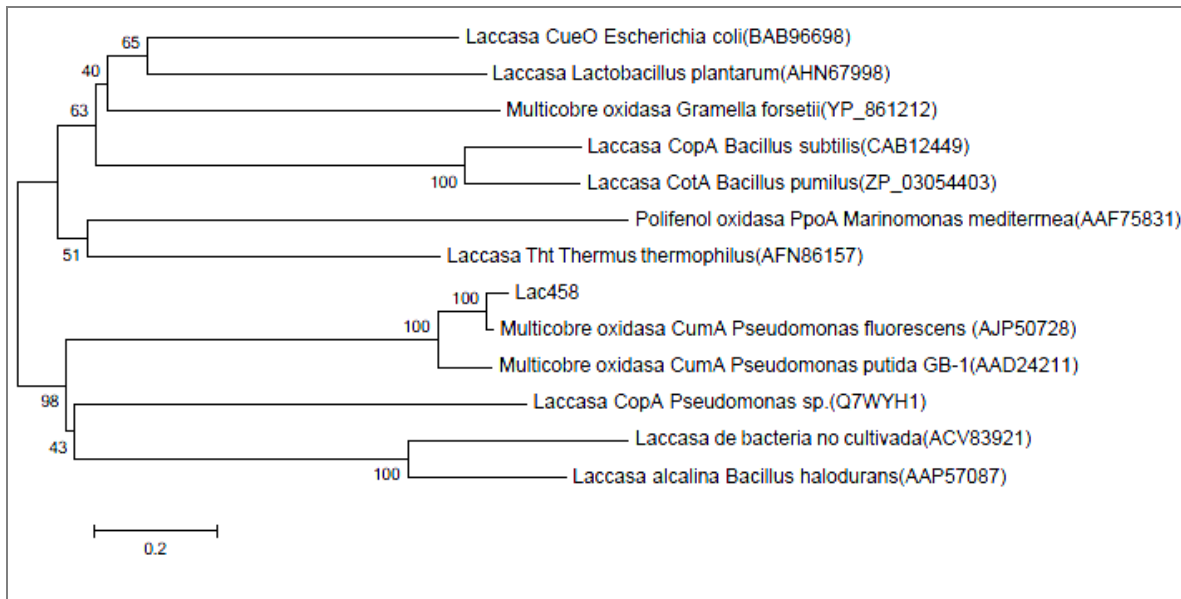


Figura 2.7 Estudio filogenético de la proteína LAC458. Las secuencias de las proteínas laccasas y multicobre oxidasas de origen bacteriano se obtuvieron a partir de la base de datos NCBI, en paréntesis se indica el n° de acceso. El árbol filogenético se construyó utilizando el algoritmo Neighbor Joining del programa Mega 6.06. Se empleó un bootstrap de 1000 réplicas. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de bootstrap.

Del análisis filogenético se observa que LAC458 se agrupa fuertemente (bootstrap=100) con la multicobre oxidasa CumA de *Pseudomonas fluorescens* (n° acceso: AJP50728), proveniente de una anotación genómica y con la misma proteína de *Pseudomonas putida* GB-1 (n° acceso: AAD24211). El porcentaje de identidad observado entre LAC458 y CumA de *Pseudomonas fluorescens* es de 95% reflejando la gran similitud que hay entre ambas proteínas, esto se evidencia claramente también en el alineamiento sus secuencias (Figura 2.8).

CumA se describió por primera vez en *Pseudomonas putida* GB-1 por Brouwers et al. (1999) como una proteína multicobre oxidasa del tipo laccasa, involucrada en la oxidación de  $Mn^{2+}$ . Francis y Tebo (2001) reportan la presencia del gen codificante para CumA en diversas cepas de *Pseudomonas*, incluidas cepas oxidantes de  $Mn^{2+}$  como cepas carentes de esa capacidad, sugiriendo que dicho gen no sería suficiente para conferir la habilidad de oxidar  $Mn^{2+}$  o que pudiera tener una función alternativa en esos organismos.

```

AJP50728      VSQSFRRQILGGLAGLAVVGVGAGGAYRYWLKGVADANAGSDYQLIAPLDVELVPGHK 60
LAC458       VSQTFRRQILGGLAGLAVVGVGAGGAYRYWLKVAEAEAGHDYELIAPLDVELVPGHK 60
              *.:*****:.*:*****

AJP50728      TEANAFGPSAPGTELRVRQGENLRVRFINHLPVATTIHWGIRLPLEMDGVPYVSQLPVL 120
LAC458       TQANAFGPSAPGTELRVRQGENLRVRFINHLPVATTIHWGIRLPLEMDGVPYVSQLPVL 120
              *.:*****

AJP50728      PGEYFDYKFRVPDAGSYWYHPVNSSEELGRGLVGPLIEEREPTGFKYERTLSLKSWHV 180
LAC458       PGEYFDYKFRVPDAGSYWYHPVNSSEELGRGLVGPLIEEREPTGFKHERTLSLKSWHV 180
              *****

AJP50728      DEEGAFVAFSIPREAARGGTAGRLSTINGVSQAVIDLPAQITRVRLNLDNTLYRINI 240
LAC458       DEEGAFVAFSVPREAARGGTAGRLSTINGVSQAVVDLPAQITRVRLNLDNTLYRINI 240
              *****

AJP50728      PDVEAQIYALDGNPIEPRPLGKEYWLGPMRICALKAPPAGEELSIRNGPVRLGTFRSV 300
LAC458       PGVEAQIYALDGNPIEPRPMGKEYWLGPMRICALKAPPAGEELSIRNGPVRLGTFRSV 300
              *.:*****

AJP50728      ANSDAPTAMPALPANPISEPDLANAEKLNFNFEWVGTVSVDDGKPPSLWQINGKAWDIT 360
LAC458       VNTDAPNEWPPALPANPIAEPDLANAEKLNFNFEWVGTVSVDDGKPPSLWQINGQAWDIT 360
              *.:*****

AJP50728      DKTCDRPIAKLEKGSYIFELKNMTQYQHPHILHGMSFKVIASNRHKVIPYFTDTYLLG 420
LAC458       DKTCDRPIAKLEKGSYIFELKNMTQYQHPHILHGMSFKVIASNRHKVIPYFTDTYLLG 420
              *****

AJP50728      KNERARVALVADNPGVIMFHCHVIDHMETGLMAAIEVA 458
LAC458       KNERARVALVADNPGVIMFHCHVIDHMETGLMAAIEVA 458
              *****

```

Figura 2.8 Alineamiento entre LAC458 y CumA de *Pseudomonas fluorescens* (nº acceso AJP50728).

Los porcentaje de identidad y similitud obtenidos entre LAC458 y el resto de las secuencias empleadas para la construcción del árbol filogenético (Tabla 2.4) concuerdan con reportes previos en los cuales las similitudes reportadas entre diferentes laccasas bacterianas son bajas (Miyazaki 2005, Fang et al. 2011 y Callejón et al., 2015). Esto podría estar relacionado con la diversidad de funciones atribuidas para las laccasas bacterianas. Por otro lado, mientras que las similitudes encontradas entre las diferentes secuencias fueron bajas, los cuatro dominios de unión a cobre, ricos en histidinas, se encuentran altamente conservados en todas las secuencias analizadas (Figura 2.9).

**Tabla 2.4** Porcentaje de identidad entre LAC458 y proteínas laccasas y multicobre oxidasas de origen bacteriano

Proteína	N° acceso	% de Identidad	% de Similaridad
<b>Multicobre oxidasa CumA <i>Pseudomonas fluorescens</i></b>	AJP50728	95%	98%
<b>Multicobre oxidasa CumA <i>Pseudomonas putida</i> GB1</b>	AAD24211	81%	89%
<b>Laccasa CotA <i>Bacillus subtilis</i></b>	CAB12449	46%	71%
<b>Polifenol oxidasa PpoA <i>Marinomonas mediterránea</i></b>	AAF75831	41%	60%
<b>Laccasa CopA <i>Pseudomonas</i> sp.</b>	Q7WYH1	38%	54%
<b>Laccasa de bacteria no cultivada</b>	ACV83921	33%	52%
<b>Laccasa CueO <i>Escherichia coli</i></b>	BAB96698	30%	51%
<b>Laccasa CotA <i>Bacillus pumilus</i></b>	ZP03054403	30%	60%
<b>Multicobre oxidasa <i>Gramella forsetii</i></b>	YP_861212	27%	48%
<b>Laccasa Tht <i>Thermus thermophilus</i></b>	AFN86157	25%	41%
<b>Laccasa <i>Lactobacillus plantarum</i></b>	AHN67998	25%	44%
<b>Laccasa alcalina <i>Bacillus halodurans</i></b>	AAP57087	24%	41%

```

Lac458          PVA-----TIIHWGI  LPLEMDGVPYVSQLPVL----PGEY
AJP50728       PVA-----TIIHWGI  LPLEMDGVPYVSQLPVL----PGEY
ACV83921       NHP-----KTLVHGE  VVPHMDGLPGNTQEAIID----PGNN
AAP57087       NVP-----TALHLHG  VVPHMDGVPVGTQNAIM----PGEE
CAB12449       PSTHFLPIDHTIHSDSQHEEPEVKT  VVHLHGG  /TPDSDGYPEAWFSKDFEQTGPYFKR
ZP_03054403    PLKHFLPVDHTIHEG--HHDEPEVKT  VVHLHGG  /TPASSDGYPEAWFSRDFEATGPFPER
YP_861212      PA-----ESIVHWGL  VVSHENDGHPAHVIG----EGDT
WP_013454223   PE-----ESLVHWGM  VVPERYDGHGPDVID----SGET
BAB96698      TEE-----TTLHWHGL  VVPGEVDDGGPGIIP----PGGK
AHN67998      PEL-----TTFHWHGL  VVPGITDGGCHAPVY----PGET
AFN86157      PEP-----TTLHWHGL  VVSPKVDPPLEIPP----GES
Q7WYH1        TAD-----TSIHWGI  LPAWMDGVGSEFHAIE----PGGV
AAF75831      AAQMNTPHNFN-----VTNFHTHGL  VVSPKNSDNLLELQ----PGYA
                . * * * .

Lac458          FDYKFRVP---DAGSYWYHPHVSSE--ELGRGLVGLPIIE--EREPTGFKHERTL--SL
AJP50728       FDYKFRVP---DAGSYWYHPHVSSE--ELGRGLVGLPIIE--EREPTGFKYERTL--SL
ACV83921       ETYEANNI---LPGTYWYHSHQDPHT--WIDRGLYGHDIIVE--PWDKEOYDTDFNP--VG
AAP57087       FTYEYQAN---VPGTYWYHSHQDPHT--QVDRGLYGVFIVE--PVDPESYDTDVAI--VI
CAB12449       EVYHYPNQ---RGAILWYHDHANALTRLNVYAGLVGAYIIE--DPKEKRLKLPSE--YD
ZP_03054403    EVYEPNHQ---QACTLWYHDHANALTRLNVYAGLAGFYIIS--DAFEKSLLEPKGE--YD
YP_861212      YVEFEVMN---RAGTYWFHPPHPRHTGEQVYQGLAGLFIIVS--DKEEKLNLPGQE--YD
WP_013454223   YIYEYVMN---RAGTYWFHPPHPRGTGPQVYVYAGLGLLVT--DEEQQLNLPGQE--FD
BAB96698      RSVTLNVDQ---PAATCNCFHPPHQRGTGRQVAMGLAGLVIE--DDEILKMLPKQVIGDD
AHN67998      NHIDFKVHQ---PAATTLWLAHPQPSSTATQVWKGLATHVIEI--DDVEDQLPLRNVYVDD
AFN86157      WTYEFAVPKE--LAGTFWYHPHLGRVAPQLFAGLGLAVVE--SSLDAIPELREAE---E
Q7WYH1        WYVQFKVRQ---HGTWYHSHS---GLQEAGVYVGLVIE--AKEPEPFHYDRDYVVM
AAF75831      FDYEIRIPEDHPQCTFWYHAHVHGSTALQVSSGAGAGIIEGGDPAKDVGGQPGIKGVD
                . * * * .

Lac458          -----QIQHPHILHG  VVSKVIAISN--RHKVIP---
AJP50728       -----QIQHPHILHG  VVSKVIAISN--RHKVIP---
ACV83921       -----DIDHPMHLHG  VVFRVPSDDGKNIPGSP---
AAP57087       -----DIDHPMHLHG  VVFFHVISKGGKAIQGGSP---
CAB12449       -----TRGTHPIHLHL  VVSRVLDRRRPFDIARYQESGE
ZP_03054403    -----TRGTHPIHLHL  VVQFRVIDRRRPFDEYVYQSTGD
YP_861212      -----MHGNGGMMGGGGMMGMMVQVPHPVHILH  VVQFNILNRN--ADKVDKLLWE
WP_013454223   DNG-----GMMRGDDGMMGGGMMGMMVQVPHPIHILH  VVQFNILERN--VTDVDPQLWD
BAB96698      MNK-----PMFAAAKQYERWVVISGVDMLHPPFHILH  VVQFRILSENGKPPAAHR---
AHN67998      -----STENGIVHFFHVG  VVQFRVLRANDGPPVYPN---
AFN86157      -----DIDHPHFLH  VVHPFQVLSVGGRPFPYRA---
Q7WYH1        SFNGIKFSDAEPLRLKYGERIRLVLVNDTMTHTPIHLHG  VVMSDLEENGMFQVRKH---
AAF75831      -----QMQRWNLCTRGLA  VVHPHYIHL  VVHPFYAYRTGDGPEQQGVNRDT
                . * * * .

Lac458          -----YFTDTYLLGK--NERARVALVAD--NPGVWV  VVHCHVIDHMETGLM
AJP50728       -----YFTDTYLLGK--NERARVALVAD--NPGVWV  VVHCHVIDHMETGLM
ACV83921       -----WKKDTLNIIDP--GESYEWLFDRT--NPGIWM  VVHCHDIHHASNTMVD
AAP57087       -----VLKDTLNVRP--GETYEIVFEAK--NPGNM  VVHCHDFHHASGGMVA
CAB12449       LSYTGPAVPPPPSEKWKDTIQAHA--GEVLRIAATFGPYSGRYV  VVHCHLEHEDYDMMP
ZP_03054403    IVYTGPNAPPLHEQGYKDTIQAHA--GEVIRIARFVYPSGRYV  VVHCHLEHEDYDMMP
YP_861212      ATKDG-----FINEGRQDSVYLLP--GMQMDLIMRFEDFKGLFL  VVHCHNLEHEDGMMP
WP_013454223   AVKDG-----FVDEGNHDTVLLMP--GMSAKVINQFKDFKGLFV  VVHCHNLEHEDGMMP
BAB96698      -----AGWKDTVKGVEGNVSEVLVKFNHDPAPKEHAYM  VVHCHLEHEDTGMMP
AHN67998      -----EHGLKDTVGVNP--GETVRIKVKFELTGVYV  VVHCHIEHEDGGMMP
AFN86157      -----WKDVVNLKAG--EVARLLVPLREKGRTV  VVHCHIVEHEDRGMMP
Q7WYH1        -----TIDMPP--GSRRSYRVTDALGRWAV  VVHCHLLYHMKRACSA
AAF75831      LAIEIGDKNAPSNTVAYSENRYPTT--LPGIDDLTVKQMYTGA  VVHCHILDHEDQGMMP
                . * * * .

```

Figura 2.9 Alineamiento de la secuencia aminoacídica de LAC458 con otras secuencias de multicobre oxidasas bacterianas. Las secuencias obtenidas de la base de datos NCBI fueron: multicobre oxidasa CumA de *Pseudomonas fluorescens* (AJP50728), laccasa CopA de *Pseudomonas* sp. (Q7WYH1), laccasa CotA de *Bacillus subtilis* (CAB12449), laccasa CotA de *Bacillus pumilus* (ZP\_03054403), laccasa CueO de *E. coli* (BAB96698), polifenol oxidasa de *Marinomonas mediterranea* (AAF75831), laccasa de bacteria no cultivada (ACV83921), multicobre oxidasa de *Gramella forsetii* (YP\_861212), laccasa alcalina de *Bacillus halodurans* (AAP57087), laccasa de *Thermus thermophilus* (AFN86157) y laccasa de *Lactobacillus plantarum* (AHN67998). El alineamiento se realizó empleando el programa MEGA 6.06. Se indican en un recuadro rojo los cuatro dominios de unión a cobre, ricos en histidinas (secuencia conservada: HXHG, HXH, HXXHXH y HCHXXXHXXXM/L/F; Reiss et al., 2013).

### 2.2.2. *Análisis in silico de la secuencia codificante*

En la Figura 2.10 se muestra la secuencia codificante completa, así como las regiones nucleotídicas posiblemente involucradas en los procesos de regulación de la expresión y las regiones aminoacídicas conservadas, como los sitios de unión a cobre.

Mediante el empleo de la herramienta BPROM del servidor Softberry, corriente arriba del gen *lac458* se identificaron dos potenciales secuencias promotoras consenso, cajas -35 y -10 (para  $\sigma 70$ ), así como una probable secuencia Shine-Dalgarno (Figura 2.10).

```

ccacaacttatggtcagcgggcttgccac aagacc caatgaaatc gcaagt gcggc aatg
cgaagccttactgttttagc cgggtcaggtgtatcgtatctgc cctttgcgggccta tggc
tcgcggcagatacgtgaggttgtgtg tccaaact tttttcccgctcgacaaatcctgggt
12
          V S Q T F S R R Q I L G
ggctctgc aggcc tggccg tagtgggcgtcgggtgc cgggtggcgcctaccgc tactggctg
32
G L A G L A V V G V G A G G A Y R Y W L
ggaaaagtgcggaggccgaagcgggtcacgattacgagc tgatc gccgcggcggctcgac
52
G K V A E A E A G H D Y E L I A A P L D
gtggaactggtgc cggggc ataaaacccaagcctggcgt tggcccatcggcggcgggc
72
V E L V P G H K T Q A W A F G P S A P G
accgagttgcgtgtgcgtc agggagaatggctgcgggtgc gctttatcaac cacctgccg
92
T E L R V R Q G E W L R V R F I N H L P
gtcgccaccaccatccactggcacggcatccgcctgccgc tggaaatggacggcgtgct
112
V A T T I H W H G I R L P L E M D G V P
tacgtctc gcaattgcccgtgctgcctggcgaatacttcgactacaaattc cgcgtgccg
132
Y V S Q L P V L P G E Y F D Y K F R V P
gacgccggcagctactggatcacccgc atgtgaacagcagcgaagaactcggccgtggc
152
D A G S Y W Y H P H V N S S E E L G R G
ctggctggcccggttgatcatcgaagagcgtgaacc caccggtttc aaacac gaacgcacc
172
L V G P L I I E E R E P T G F K H E R T
ctgagcctgaaaagctggc atgtggacgaagagggcgcctttgtc gcctc agcgtgcc
192
L S L K S W H V D E E G A F V A F S V P
cgagaagcgcgcgtggcggcacggcggggcggctgtcgcacgatc aatggcgtgtc ccag
212
R E A A R G G T A G R L S T I N G V S Q
gcggtcgtcgatttgccctgcccggcagatcacccgcgtgcgcctgctcaacctcgacaac
232
A V V D L P A G Q I T R V R L L N L D N
acgctgacttatcgcacacattcccggcgtcgaagcgc agatc tatgcgctggacggc
252
T L T Y R I N I P G V E A Q I Y A L D G
aaccccatcgagcgcgcgcc caatgggcaaggaatactggc tgggc cgggc atggcatt
272
N P I E P R P M G K E Y W L G P G M R I
tgc ccgac gatca aagcgc cgcggcgggtgaaga actgtcgatc cgcaatggccc ggtg
292
C P T I K A P P A G E E L S I R N G P V
cgcctgggcacctttcgtctgtgtgtaacaccgacgcgc ccaac gaatggccacc ggcg
312
R L G T F R S V V N T D A P N E W P P A
ctgcccgc caaccgattgcccagccggacctggc caatgcccgagaaactc aacttcaat
332
L P A N P I A E P D L A N A E K L N F N
ttcgagtgggtggcactgtatcagtggaacaacggcaagc cgccaagccta tggcagatc
352
F V V G T V S V D N G K P P S L W Q I
aacggccaggcctgggacatcaccgacaagacctgcgcggaccgc ccgattgccaagctt
372
N G Q A W D I T D K T C A D R P I A K L
gagaagggcaagagctacattttgaattgaagaacatgacccagttaccaacacccgatc
392
E K G K S Y I F E L K N M T Q Y Q H P I
cacctgcaaggcatgagcttcaaggtgatcgcctc gaacc gccac aaggtgatccc gtac
412
H L H G M S F K V I A S N R H K V I P Y
ttcaccgacacctacctgc tgggc aagaacgagcgcgcctc gcgtggcgttgggtggc ggat
432
F T D T Y L L G K N E R A R V A L V A D
aacccaggggtgtggatgtccac tggcacgtgatcgacc acatggaaaccggcctgatg
452
N P G V W M F H C H V I D H M E T G L M
gccgccatcgaggtggcatga
458
A A I E V A -

```

Figura 2.10 Secuencia nucleotídica del gen *lac458* y secuencia aminoacídica de la proteína LAC458. En naranja se muestran las potenciales secuencias promotoras consenso, cajas -35 y -10 (para  $\sigma 70$ , utilizando BPR0M); en subrayado: probable secuencia Shine-Dalgarno; en violeta: posible codón de inicio (codón inusual, GTG, Valina) y en verde: las regiones involucradas en la unión a cobre. El recuadro rosado indica la secuencia señal para la vía de secreción TAT.

Del análisis de la secuencia aminoacídica de LAC458, se deduce que la proteína presentaría una masa molecular y punto isoeléctrico teóricos de 50.699 kDa y 6.37, respectivamente. Así mismo, se observó que dicha secuencia presenta tres residuos de cisteína, previéndose la formación de un enlace disulfuro entre los residuos Cys384 y Cys461.

La secuencia de LAC458 se examinó en búsqueda de las regiones conservadas características de las proteínas multicobre oxidas. Dichas regiones corresponden a los dominios de unión a cobre, y se caracterizan por la abundancia de residuos de histidina. Para ello se realizó una búsqueda manual de los cuatro dominios característicos involucrados en la unión a cobre, a la vez que se emplearon las herramientas PROSITE, PFAM e INTERPROSCAN para la localización de otros posibles motivos conservados (Tabla 2.5).

Como era de esperarse para una laccasa, y tal como se infería del alineamiento de las secuencias (Figura 2.9), se pudo identificar manualmente las regiones de unión a cobre. Dichas secuencias contienen los 10 residuos de histidina y las cisteínas encargadas de coordinar los cuatro átomos de cobre, y que en LAC458 están comprendidas entre los siguientes aminoácidos: 98-100, 138-143, 390-397 y 440-451 (Figura 2.10). Conjuntamente, se identificaron tres dominios conservados de tipo cupredoxina, como se ha descrito para la gran mayoría de las laccasas conocidas hasta el momento (ver Introducción). Se identificó además (PROSITE) la presencia de una secuencia señal para la vía de translocación TAT (del inglés, Twin-Arginine-Translocation). Este resultado se confirmó mediante la herramienta PRED-TAT (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/>) que combina la predicción de péptidos señal del tipo Sec y TAT.

**Tabla 2.5** Regiones conservadas identificadas en la secuencia de aminoácidos de LAC458 con las herramientas PFAM, PROSITE e INTERPROSCAN

Herramienta	Aminoácidos	Motivo conservado	N° de acceso
<b>PFAM</b>	49-164	Cu oxidase 3	PF07731
<b>PFAM</b>	340-458	Cu_oxidase_2	PF07732
<b>PROSITE</b>	435-455	Multicopper_oxidase1	PS00079
<b>PROSITE</b>	440-451	Multicopper_oxidase2	PS00080
<b>INTERPROSCAN</b>	1-38	TAT pathway signal	IPR006311
<b>INTERPROSCAN</b>	31-163	Cupredoxin	IPR008972
<b>INTERPROSCAN</b>	164-282	Cupredoxin	IPR008972
<b>INTERPROSCAN</b>	328-457	Cupredoxin	IPR008972

El sistema TAT reconoce proteínas que presentan péptidos señales con una secuencia muy conservada [(S/T)RRxFLK] caracterizada por la presencia de dos argininas (Berks et al., 2000; Stanley et al., 2000). Otra característica importante de este sistema, que lo diferencia con el sistema de secreción Sec, es su capacidad de transportar proteínas en conformación plegada, a través de la membrana citoplásmica y de manera independiente de ATP (Stanley et al., 2000; Yahr y Wikner 2001; DeLisa et al., 2003). En muchos casos las proteínas translocadas por el sistema TAT llevan cofactores específicos que se incorpora en el citoplasma previo a su plegamiento y exportación (Bogsch et al., 1998; Santini et al., 1998; Berks et al., 2000).

Dilks et al. (2003) describen la ocurrencia de secuencias TAT en el 50% de los genomas procariotas secuenciados hasta la fecha de publicación de su trabajo. Se han encontrado genes que codifican para este sistema de transporte tanto en procariotas como en cloroplastos y mitocondrias vegetales. En bacterias, la vía TAT cataliza la exportación de proteínas desde el citoplasma a través de la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática. En los cloroplastos, los componentes de la vía TAT se encuentran en la membrana de los tilacoides y dirigen la importación de proteínas desde el estroma (Palmer y Berks, 2012).

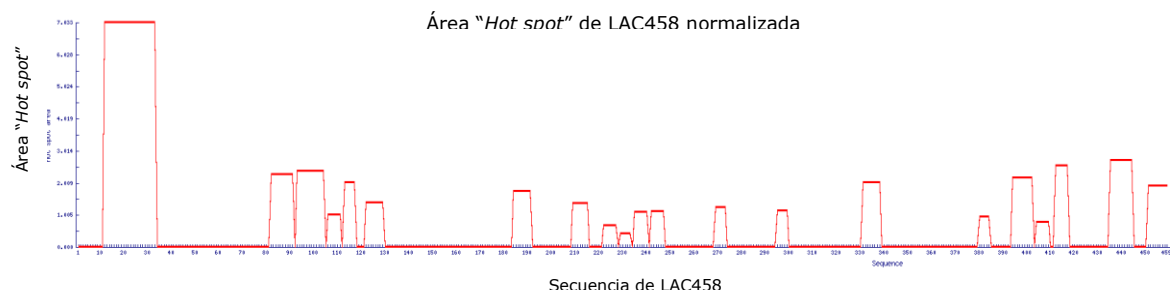
Si bien varias de las laccasas bacterianas reportadas hasta el momento se localizan de forma intracelular, como es el caso de las producidas por *Azospirillum lipoferum* (Diamantidis et al., 2000), *Marinomonas mediterranea* (Sánchez-Amat y Solano, 1997), *Bacillus subtilis* (Martins et al., 2002),  $\gamma$ -*proteobacterium* JB (Singh et al., 2007), entre otras, existen varios informes de laccasas bacterianas con péptidos señal del tipo TAT. Algunos ejemplos son las proteínas CueO y PcoA de *E. coli* (Lee et al. 2002), SLAC de *S. coelicolor*, SilA de *S. ipomoea* (Molina-Guijarro et al., 2009), Ssl1 de *S. sviceps* (Gunne y Urlacher, 2012) y CuoB de *Myxococcus xanthus* (Sánchez-Sutil et al., 2007). Se desconoce si la presencia de este tipo de péptido señal está relacionada con la función biológica de dichas enzimas.

Por último, se analizó la secuencia aminoacídica de la proteína LAC458 empleando el software AGGRESKAN. Este programa permite la identificación de segmentos proteicos propensos a la agregación, determinando valores de propensión a la agregación de los aminoácidos naturales, derivados de experimentos *in vivo*, y en el supuesto de que los tramos cortos y específicos de la secuencia aminoacídica modulan la agregación de la proteína (Conchillo-Solé et al., 2007). Se encontró que en la secuencia proteica de LAC458 existen 21 posibles regiones propensas a la agregación.



En la Figura 2.11 se muestra el gráfico de área de LAC458, indicando las regiones “hot spot”, o propensas a formar agregados, así como los aminoácidos que conformarían estas regiones. Teniendo en cuenta que la próxima etapa del trabajo implica la producción recombinante de la enzima, este resultado permitiría anticipar la ocurrencia de posibles fenómenos de agregación.

**A.**



**B.**

VSQTFSSRRQILGGLAGLAVVGVGAGGAYRYWLGKVAEAEAGHDYELIAAPLDVELVPGHKTQAWAFGPSAPGTELRRVQGE  
 E~~WLRVRFINHL~~P~~VATTIHWGIRL~~L~~EMDGV~~P~~VVSQ~~L~~PVLP~~~~GEYFDYKF~~RVPDAGSYWYHPHVNSSEELGRGLVGPLIEER  
 EPTGFKHERTSLKSWHVDEE~~GAFVAFSV~~PREAARGGTAGRLSTIN~~GVSQAVV~~DLPAGQ~~ITRVRL~~~~NLDNTL~~~~TYRINI~~~~P~~~~GVE~~  
~~AQI~~YALDGNPIEPRPMGKEYWLGP~~GMRIC~~PTIKAPPAGEELSIRNGPVRL~~GTFRS~~VVNTDAPNEWPPALPANPIAEPDLANAE  
 KLNF~~NFEWVGT~~VSDNKGPPSLWQINGQAWDITDKTCADRPIAKLEKGSYI~~FELKN~~MTQYQHPIH~~LHGMSFKVI~~~~ASNRH~~  
~~KVIP~~~~YFTDTY~~LLGKNERARVALVADNP~~GVWMFHCHV~~DMET~~GLMAAIEVA~~

Figura 2.11 Regiones aminoacídicas propensas a la agregación en la proteína LAC458. A. Gráfico de área mostrando la ocurrencia de puntos “hot spot” de agregación. Se representa el perfil de agregación por encima del umbral para un determinado “hot spot” respecto a la secuenciaminoacídica. B. Secuencia aminoacídica de la proteína LAC458, en letras rojas y fondo gris los aminoácidos que forman parte de las 21 regiones propensas a la agregación “hot spot”.

La estrategia genómica planteada durante este capítulo de la tesis fue parcialmente exitosa, ya que permitió la identificación de una CDS de AU10 con probable actividad laccasa, pero no permitió identificar la CDS de la laccasa de CE52G.

Una estrategia alternativa para la identificación de la CDS de la laccasa de SmCE52G podría ser la realización de una mutagénesis al azar, empleando transposones del tipo Tn5 o miniTn5, seguido de una búsqueda de los mutantes carentes de actividad laccasa. La selección de mutantes sería relativamente sencilla, ya que implicaría la búsqueda de transconjugantes que no oxidaran el 2,6-dimetoxifenol,

los cuales se evidenciarían como colonias incapaces de producir el color naranja característico de la oxidación del producto. Sin embargo, actualmente la forma más racional de encontrar la CDS sería la secuenciación, armado y notación del genoma.

Ya que se pudo identificar la CDS de una posible laccasa en el microorganismo psicrotolerante *Pseudomonas* sp. AU10, se decidió continuar trabajando con AU10. Esta cepa fue aislada de muestras de agua provenientes de la Antártida y su caracterización fue objeto de estudio de trabajos anteriores (Martinez-Rosales y Castro-Sowinski, 2011).

Los microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes se caracterizan por producir enzimas activas a bajas temperaturas las cuales ofrecen un gran potencial industrial y biotecnológico por ser capaces de catalizar reacciones a temperaturas bajas o moderadas (Cavicchioli et al., 2002; Georlette et al., 2004). En comparación con las enzimas producidas por microorganismos mesófilos, las enzimas activas a bajas temperaturas presentan una temperatura óptima más baja, al tiempo que exhiben una mayor actividad específica ( $K_{cat}$ ) a bajas temperaturas (D'Amico et al. 2003; Joshi y Satyanarayana, 2013). La alta actividad a bajas temperaturas permite la aplicación de estas enzimas en procesos industriales que pueden ser llevados a cabo a temperatura ambiente, implicando un ahorro en el consumo energético. Por otra parte, estas enzimas presentan una menor estabilidad térmica y por lo tanto pueden ser inactivadas rápidamente por aumento de la temperatura. Otra ventaja referente al empleo de este tipo de enzimas es que al trabajar a bajas temperaturas se permite la preservación de ciertos productos sensibles a temperaturas mayores (Marx et al, 2007).

Una vez obtenida la secuencia completa del gen de la laccasa de *Pseudomonas* sp. AU10, en la siguiente etapa de esta tesis nos enfocamos en la producción recombinante de dicha enzima con el objetivo de realizar su caracterización bioquímica, así como estudiar sus potenciales aplicaciones biotecnológicas.

## CAPÍTULO 3

*"...no tenía miedo a las dificultades: lo que la asustaba era la obligación de tener que escoger un camino. Escoger un camino significaba abandonar otros."*  
Paulo Coelho en "Brida"

### **CAPITULO 3: “Producción heteróloga de LAC458, una potencial laccasa de *Pseudomonas* sp. AU10”**

#### **MARCO TEÓRICO Y ESTRATEGIA DE TRABAJO**

Una vez identificado el gen para una potencial laccasa de *Pseudomonas* sp. AU10, nos propusimos su sobreexpresión en un hospedador heterólogo que nos permitiera obtener cantidades suficientes de la proteína LAC458, para luego realizar su caracterización y el estudio de sus potenciales aplicaciones industriales.

Se eligió el sistema pET, que utiliza *Escherichia coli* como microorganismo productor, basándonos en la eficacia que este sistema ha demostrado para la producción de numerosas proteínas a lo largo de los años. En particular, este sistema se ha utilizado con resultados exitosos en la sobreexpresión de las laccasas de *Bacillus subtilis*, *Gramella Forsetti* (Ihssen et al., 2015), *Bacillus holodurans* (Ruijssenaars y Hartmans 2004), *Bacillus licheniformis* (Koschorreck et al., 2008), *Thermus thermophilus* (Miyazaki 2005), *Lactobacillus plantarum* (Callejón et al., 2015), *Marinomonas mediterránea* (Sanchez-Amat et al., 2001), *Aeromonas hydrophila* (Wu et al., 2010; Ng et al., 2013), *Streptomyces lavendulae* (Suzuki et al., 2003), *Streptomyces griseus* (Endo et al., 2003), *Streptomyces coelicolor* (Machczynski et al., 2004), *Streptomyces ipomoeae* (Molina-Guijarro et al., 2009) y de laccasas identificadas durante el análisis de metagenomas (Beloqui et al., 2006; Ye et al., 2010; Fang et al., 2011). En el sistema pET los genes de interés se clonan bajo el control del promotor del bacteriófago T7. La acción del promotor T7 depende de la RNA polimerasa del fago T7, cuyo gen se encuentra inserto en el genoma de las células hospederas *E. coli* BL21(DE3). A su vez, la T7 RNA polimerasa se encuentra bajo el control de un promotor inducible por IPTG, el promotor *lac*. En la Figura 3.1 se muestra un esquema del funcionamiento de este sistema de expresión de proteínas recombinantes.

Durante esta parte del trabajo, se eligió como hospederos las cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS y C41(DE3)pLysS, y además se evaluó el efecto de la temperatura, la presencia de oxígeno y de sulfato de cobre en la expresión y solubilidad de la enzima recombinante teniendo en cuenta reportes previos acerca de la influencia de estos factores en la producción de laccasas recombinantes (Duraó et al., 2008; Mohammadian et al., 2010).

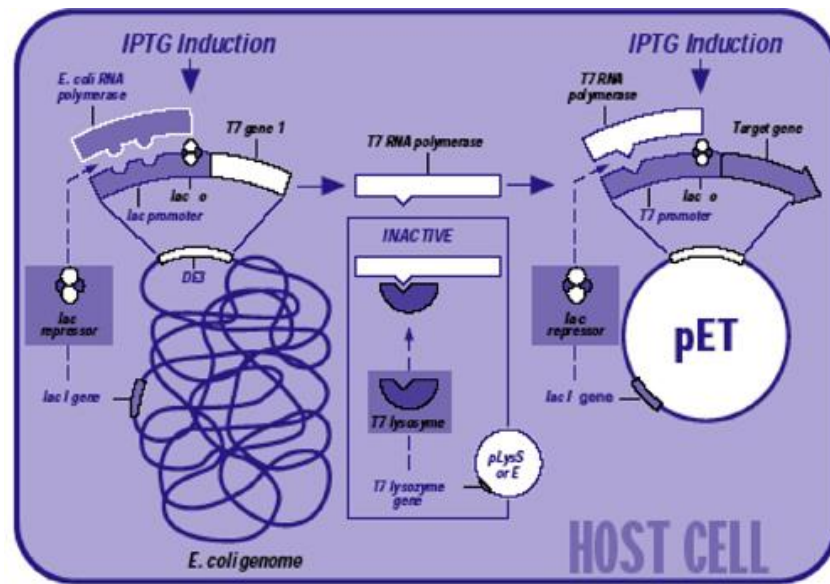


Figura 3.1 Esquema del sistema de expresión de proteínas recombinantes, empleando vectores de la serie pET. El IPTG, en una célula hospedera, induce la síntesis de la ARN polimerasa T7 al liberar la represión por lacI. La ARN polimerasa T7 posee alta afinidad por el promotor en el plásmido pET. Figura tomada del Manual del sistema de expresión pET (Fermentas).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Microorganismos, condiciones de cultivo y plásmidos utilizados

Para la producción heteróloga de la proteína LAC458 se empleó el vector de expresión pET14b y las cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS y C41(DE3)pDIA17. Las cepas sin transformar se crecieron en medio LB (Anexo 1), suplementado con 0.034 mg/ml de cloranfenicol (Cm). Mientras que los cultivos de dichas cepas transformadas con el vector de expresión se realizaron en medio 2XYT (Anexo 1) suplementado con igual cantidad de Cm y 0.1 mg/ml de ampicilina (Amp). Los diferentes plásmidos utilizados en este capítulo, así como sus características se muestran en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Plásmidos empleados

Plásmido	Característica	Resistencia	Fuente / Referencia
<b>pET14b(+)</b>	Vector de expresión, conteniendo promotor y terminador T7. Posee una secuencia N-terminal His•Tag seguida de un sitio de corte para trombina, tres sitios de clonación y el origen de replicación de pBR322.	Amp <sup>R</sup>	Promega
<b>pLAC458-H6</b>	pET14b (+) portando la región codificante para la proteína LAC458	Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pLysS</b>	Contiene un origen p15A y el gen codificante para la lisozima T7 encargada de disminuir el nivel de expresión basal del gen de interés (bajo el control del promotor T7).	Cm <sup>R</sup>	Studier 1991
<b>pDIA17</b>	Derivado de pACYC184, porta el gen <i>lacI</i> actuando bajo el control del promotor del gen de tetraciclina. Esto refuerza la represión de la ARN polimerasa T7 en ausencia del inductor evitando cualquier nivel basal de expresión que pudiera afectar el crecimiento del cultivo.	Cm <sup>R</sup>	Munier et al, 1991

### 3.2 Producción de LAC458 en *E. coli*

#### 3.2.1. Construcción del vector de expresión

Para la expresión de LAC458 se utilizó el vector de expresión pET14b (Novagen). Este vector lleva una secuencia N-terminal His•Tag<sup>®</sup> seguida de un sitio de corte para trombina, permitiendo obtener la proteína recombinante con el agregado de

seis histidinas que facilitan la purificación de la proteína de expresión mediante una cromatografía de afinidad a metales, donde se utiliza una columna de Ni-NTA agarosa. El vector contiene también el gen codificante para la resistencia al antibiótico ampicilina, posibilitando la selección de los transformantes.

La secuencia codificante entera de LAC458 se amplificó utilizando cebadores diseñados específicamente. Debido a que la secuencia codificante presentaba un codón de inicio inusual (GTG), en el cebador de avance se reemplazó dicho codón por el codón de inicio usual, ATG. La secuencia de ambos cebadores se muestra en la Tabla 3.2. A cada cebador se le incorporó el sitio de restricción para una de las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* de forma de posibilitar el clonado en el vector de expresión en forma direccional. Previamente se comprobó que en la secuencia codificante no existieran sitios de corte para estas enzimas.

**Tabla 3.2** Cebadores empleados para la amplificación de la secuencia codificante de LAC458. Se indican subrayados los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción empleadas.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Tm (°C)
<b>Lac458_p14F</b>	GGGAATTCCATATG <u>TCCCAA</u> ACTTTTTCCCGTCG	70.2
<b>Lac458_p14R</b>	ATCCGCTCGAGTCATGCCACCTCGATGGCG	71.8

Para la amplificación se utilizó la polimerasa "RANGER Mix" de BIOLINE que, como se mencionó anteriormente, posee una polimerasa de alta posesividad con actividad correctora de prueba. Se preparó la reacción en un volumen final de 25 µl, conteniendo 12.5 µl del mix Ranger 2X (contiene: polimerasa, dNTPs y MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 1.5 mM), 1.25 µl de una solución 10 µM de cada cebador, 1.25 µl de ADNg de *Pseudomonas* sp. AU10 y agua milliQ hasta completar 25 µl. Se realizó un control negativo conteniendo agua estéril como templado. El ciclado consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min e hibridación de cebadores y extensión a 68 °C durante 8 min. Se realizó un ciclo final de extensión a 68 °C durante 5 min. La temperatura de extensión óptima se determinó previamente realizando un gradiente de temperaturas.

El fragmento amplificado se purificó desde un gel de agarosa al 1%, se digirió con las enzimas *NdeI* y *XhoI* (siguiendo las instrucciones del proveedor de enzimas) y se ligó con el vector de expresión pET14b (+) (previamente digerido con las mismas enzimas) empleando la enzima T4 DNA Ligasa (Thermo Scientific, Cat. EL0014), según las indicaciones del fabricante. La mezcla de ligación se utilizó para transformar por choque térmico células quimio-competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , tal cual se describió en el capítulo anterior.

La presencia del inserto en los clones recombinantes (resistentes a ampicilina) se verificó por amplificación utilizando los cebadores específicos diseñados previamente (ver Tabla 2.2 del Capítulo 2). La mezcla de reacción y el ciclado fueron idénticos a los descritos anteriormente. Se extrajo el ADN plasmídico de los clones seleccionados (conteniendo el inserto) siguiendo el protocolo indicado anteriormente en el Capítulo 2 (punto 2.6).

La ausencia de mutaciones en la secuencia codificante, así como la verificación de que el inserto se encontraba en fase, se analizó por secuenciación del fragmento amplificado, utilizando los cebadores universales T7 que hibridan con el vector. Se denominó al vector de expresión, conteniendo el inserto de interés, con el nombre pLAC458-H6.

### 3.2.2. Transformación de las cepas de expresión

Las cepas de expresión de *E. coli* utilizadas durante este trabajo se transformaron utilizando un protocolo de transformación por choque térmico de baja eficiencia, según se describe a continuación.

Se creció la cepa de expresión (*E. coli* BL21 (DE3) pLysS y *E. coli* C41/pDIA17) en medio LB, a 37 °C y 200 rpm durante 16 h. Se centrifugaron 3 mL de cultivo a 2000 g a 4 °C durante 3 min, se descartó el sobrenadante y el "pellet" de células se lavó dos veces en 0.5 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío. Las células se suspendieron en 0.1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío y se incubaron en hielo durante 30 min. Se agregó 2  $\mu$ l del vector de expresión conteniendo gen de interés (40 ng de ADN) y se realizó el choque térmico dos veces (90 seg a 42 °C y 2 min en hielo). Se agregó 350  $\mu$ L de medio LB y se incubó a 37 °C, con agitación a 200 rpm durante 1 h. El producto de transformación se plaqueó en LB conteniendo los antibióticos correspondientes para seleccionar los clones transformantes y se dejó incubando a 37 °C toda la noche.



### 3.2.3. Ensayos de expresión

Las cepas transformadas con el vector de expresión pLAC458-H6 se crecieron en el medio 2XYT (Anexo 1) conteniendo 0.1 mg/mL de Amp y 0.034 mg/mL de Cm, a 37 °C y agitación constante (200 rpm) durante 16 h. Estos cultivos se utilizaron para inocular (al 1%) matraces conteniendo 1 L de medio 2XYT y los antibióticos correspondientes. Se controló la densidad óptica (DO) de los cultivos a 620 nm, y al alcanzar un valor de DO entre 0.6 y 0.8 se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 0.5 mM. Con el fin de observar el progreso en la producción de la enzima recombinante, se tomaron alícuotas de 1 ml a distintos tiempos, hasta un total de 3 h de inducción. Se utilizaron como control cultivos de las cepas sin inducir así como cultivos de las cepas transformadas con el vector pET14b (+) sin inserto.

### 3.2.4. Expresión en condiciones de microaerobiosis y presencia de $\text{Cu}^{2+}$ .

Se realizó un preinóculo de la cepa de *E. coli* C41 pDIA17 transformada con el vector pLAC458-H6, y se inocularon (al 1%) matraces conteniendo medio litro de medio 2XYT, Amp 0.1 mg/mL y Cm 0.034 mg/mL, y se incubó a 30 °C hasta alcanzar una DO de 0.6. Se agregó al cultivo  $\text{CuSO}_4$  y el inductor IPTG a una concentración final de 2 mM y 0.1 mM, respectivamente. Se incubó a 18 °C en agitación (200 rpm) durante 4 h y posteriormente sin agitación de forma de crear condiciones microaeróbicas hasta completar unas 18 h de inducción. Se utilizó como control el cultivo sin inducir así como un cultivo de *E. coli* C41 pDIA17 transformado con el vector de expresión sin inserto.

### 3.2.5. Preparación del extracto y fraccionamiento celular

Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron con Buffer fosfato 50 mM (pH 7). Los "pellets" celulares, normalizados a una DO a 600 nm de 2.5 se suspendieron en idéntico buffer, pero conteniendo PMSF a una concentración final de 1 mM. El extracto celular se obtuvo por sonicación a pulsos de 50% y con potencia relativa igual a 5 en el equipo Ultrasonic Homogeneizer 4710 Series, de Cole-Parmer, por 6 ciclos de 30 seg, siempre en hielo, con intervalos de descanso de 2 min para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. Las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 30 min a 12000 g, y se separaron las fracciones solubles e insolubles. El sobrenadante correspondiente a la fracción soluble y el "pellet", correspondiente a la fracción insoluble (suspendido en 500  $\mu\text{L}$  de agua milliQ) se almacenaron a -20 °C, hasta su análisis por SDS-PAGE.

### 3.2.6. Determinación de la actividad laccasa

La actividad laccasa se determinó a temperatura ambiente utilizando 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP,  $\epsilon=49,600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) como sustrato donador de electrones. Se empleó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603. Se siguió su oxidación a 468 nm. La mezcla de reacción fue de un volumen final igual a 1 mL y contenía: 2 mM de 2,6-DMP, buffer acetato de sodio 0.1 M pH 5,  $\text{CuSO}_4$  0.1 mM y una cantidad apropiada de extracto celular o enzimático. Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto, en las condiciones ensayadas.

## 3.3 Solubilización, plegamiento *in vitro* y purificación de la proteína

### 3.3.1. Solubilización de los cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión obtenidos en el ensayo de expresión, a 37 °C, se solubilizaron mediante el empleo de un agente caotrópico y la fracción resultante se empleó para el plegamiento *in vitro* en columna de la proteína.

Se agregó 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión de cuerpos de inclusión en buffer de lisis (Tris HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 0.1 mM, NaCl 0.1 M y glicerol 5%) conteniendo 1% de Tritón y se incubó a 4 °C durante 30 min, para promover la solubilización de los cuerpos de inclusión. Se centrifugó durante 15 min a 15000 rpm y el "pellet" se suspendió en buffer de lisis (sin Tritón) conteniendo urea 8M para conseguir la completa desnaturalización de la proteína. Esta preparación se utilizó inmediatamente para el ensayo de plegamiento *in vitro* y posterior purificación por cromatografía de afinidad a metales.

### 3.3.2. Plegamiento *in vitro* y purificación por cromatografía de afinidad a metales

La proteína recombinante, fusionada a una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, se purificó por cromatografía de afinidad a metales (IMAC) utilizando la resina Ni-NTA agarosa (QIAGEN, Cat. 30210).

La resina de purificación se preparó utilizando 3 mL de una suspensión al 50% de agarosa Ni-NTA en una columna de propileno de 10 mL de capacidad. La resina se lavó con 15 mL de buffer de unión (Anexo 5). Luego se procedió a la incubación de la resina con 1 mL de la preparación de cuerpos de inclusión solubilizados en buffer de lisis con urea. La incubación se realizó a 4 °C con agitación en vaivén durante 40 min. Finalizado este tiempo la resina se dejó decantar durante 30 min y se colectó el percolado. Se lavó con cuatro volúmenes de buffer de lavado conteniendo imidazol 20

mM (Anexo 5) y se eluyó utilizando el buffer de elusión conteniendo imidazol 500 mM y glicerol 10% (Anexo 5). Se colectaron fracciones de 1 mL.

Con el objetivo de evaluar la pureza de la proteína purificada se analizaron alícuotas de todas las fracciones colectadas mediante SDS-PAGE. Las bandas proteicas se visualizaron mediante tinción con Coomassie.

Para eliminar el imidazol se realizó una cromatografía de gel filtración con los eluatos agrupados, utilizando una columna PD-10 previamente equilibrada con buffer fosfato 50 mM (pH 7), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### *3.3.3. Confirmación de la identidad de la proteína expresada*

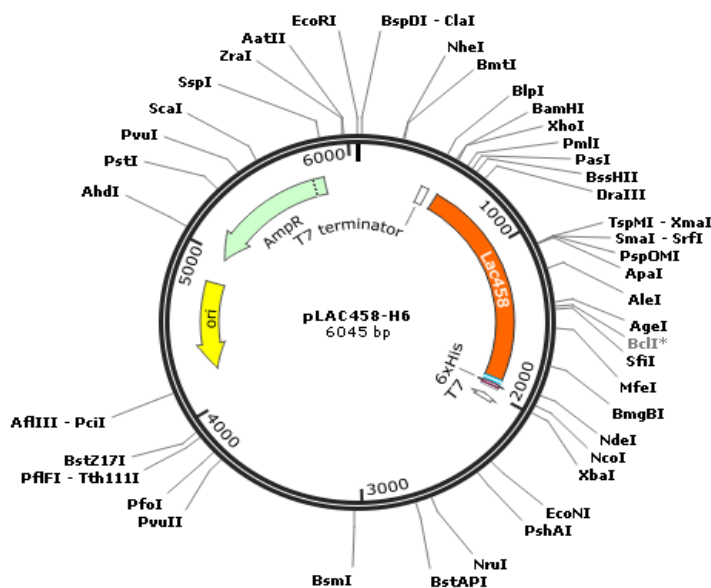
Para corroborar la identidad de la proteína expresada, se mandó la misma para su análisis por mapeo peptídico por MALDI-TOF al servicio de la Unidad de Bioquímica Analítica y Proteómica (UBYPA) del Instituto Pasteur.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Producción de LAC458 en *E. coli*

#### 3.1.1. Construcción del vector de expresión pLAC458-H6

En la Figura 3.2 se muestra un diagrama del vector de expresión pLAC458-H6 construido empleando el vector pET14b (+), según se detalla en Materiales y Métodos. El vector resultante contiene 6045 pb y en el mismo la expresión de LAC458 queda bajo el control del promotor T7, inducible con IPTG. Así mismo, el extremo N-terminal de la proteína recombinante queda fusionado a una etiqueta de seis histidinas para facilitar su posterior purificación por IMAC. Por secuenciación nucleotídica se verificó que el inserto se encontraba en fase y no se detectó ninguna posible mutación dentro de la secuencia codificante.



**Figura 3.2** Mapa del vector de expresión pLAC458-H6. Se indican: gen *Lac458*, etiqueta de histidinas (6xHis), promotor T7, casete de resistencia a ampicilina (Amp<sup>R</sup>) y el origen de replicación (ori).

La producción recombinante de LAC458-H6 se ensayó en las cepas hospederas *E. coli* BL21(DE3)pLysS y *E. coli* C41(DE3)pDIA17. Los resultados de la producción y purificación de LAC458-H6 fueron similares para ambos hospederos, por lo cual, en las

siguientes secciones solo se presentarán los resultados obtenidos con la cepa C41(DE3)pDIA17.

### 3.1.2. Expresión de LAC458 recombinante en la cepa C41(DE3)-pDIA17

La expresión de la proteína LAC458-H6 se ensayó empleando la cepa C41(DE3)pDIA17. Esta cepa es derivada de BL21(DE3) y contiene al menos una mutación no caracterizada a nivel del promotor *lacUV5* que controla la expresión de la T7 ARN polimerasa. Dicha mutación debilita al promotor disminuyendo los niveles de T7 ARN polimerasa, lo que hace a esta cepa más adecuada para la expresión de proteínas recombinantes potencialmente tóxicas (Miroux y Walker, 1996). El plásmido pDIA17 expresa el gen *lacI* bajo el control del promotor del gen de tetraciclina. Esto refuerza la represión de la ARN polimerasa T7 en ausencia del inductor evitando cualquier nivel basal de expresión que pudiera afectar el crecimiento del cultivo.

En la Figura 3.3 se muestra la electroforesis en la cual se analizó los resultados del ensayo de expresión de LAC458-H6. Se muestra el perfil de proteínas totales antes y después de inducción con IPTG (1 y 3 h) y los extractos control [C41(DE3)pDIA17 transformada con pLAC458-H6 sin inducir y C41(DE3)pDIA17 transformada con pET14b(+) sin inserto].

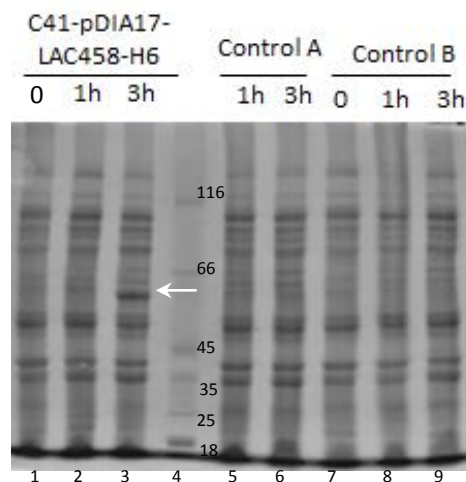


Figura 3.3 Perfil de proteínas por electroforesis SDS-PAGE. Expresión de LAC458-H6 a 37 °C. De izquierda a derecha, carriles 1, 2 y 3: proteínas totales de C41(DE3)-pDIA17 transformada con pLAC458-H6 a los distintos tiempos de inducción con IPTG 0.5mM (0, 1 y 3 h, respectivamente); carril 4: marcador de tamaño molecular SM0431 de Fermentas (en kDa), carriles 5 y 6: proteínas totales de C41(DE3) transformada sin inducir (Control A) a la hora y 3 h de transcurrido el ensayo; carriles 7, 8 y 9: proteínas totales de C41(DE3) transformada con pET14b sin inserto a los distintos tiempo de inducción (Control B). La flecha blanca indica la banda proteica correspondiente a LAC458.

Con el transcurso del tiempo de inducción, en los carriles correspondientes a las proteínas totales de C41(DE3)-pDIA17 transformada con el vector pLAC458-H6, se observó el incremento en la intensidad de una banda de tamaño molecular aproximado al esperado (50 kDa) para la proteína LAC458-H6, sugiriendo que existiría una correcta expresión de la proteína en las condiciones ensayadas.

Con el objetivo de evaluar si la proteína se produce en forma soluble, se procedió a realizar la separación de la fracción soluble e insoluble tal como se describe en Materiales y Métodos. Se analizó la actividad laccasa de las fracciones solubles e insolubles, así como el perfil electroforético de las mismas. En la Figura 3.4 se muestran los resultados de la electroforesis SDS-PAGE.

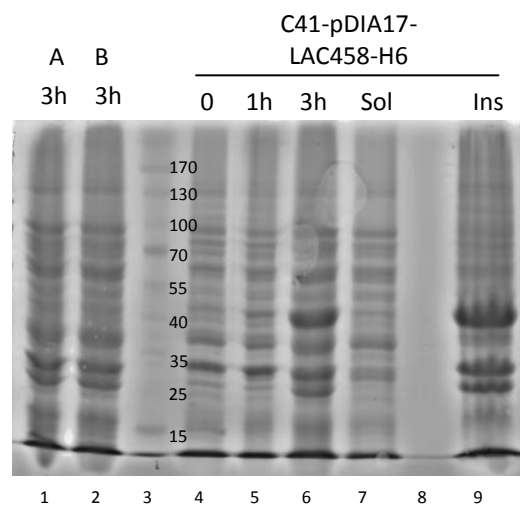


Figura 3.4 Perfil de proteínas por electroforesis SDS-PAGE. Evaluación de la producción de LAC458-H6 como proteína soluble o insoluble. De izquierda a derecha, carriles 1 y 2: proteínas totales de los cultivos control A y B a las 3h de transcurrido el ensayo; carril 3: marcador de tamaño molecular SM26616 de Fermentas (en kDa), carriles 4, 5 y 6: proteínas totales de C41pDIA17 transformada con pLAC458-H6 a los distintos tiempos de inducción (0, 1 y 3 horas) con IPTG 0.5 mM; carriles 7 y 9: proteínas presentes en la fracción soluble e insoluble respectivamente.

Los resultados muestran que no es evidente la producción de LAC458 en forma soluble, o que se encontraría en muy baja cantidad y por lo tanto no se justificaría su producción masiva. Así mismo, no se detectó actividad en la fracción soluble lo que reforzaría la presunción de la ausencia de la proteína en esta fracción, o que la misma se produce en forma inactiva. Para confirmar que la LAC458-H6 no se produce en forma soluble, aunque sea en baja concentración, se podría realizar un Western blot,

utilizando un anticuerpo anti-His 6X, y posterior revelado. Un resultado negativo permitiría descartar la producción de LAC458-H6 en forma soluble.

Por otro lado, en el carril correspondiente a la fracción insoluble (Figura 3.4) se puede observar una banda proteica de tamaño aproximado al esperado, la cual no se observa en las proteínas totales de los cultivos control (controles A y B). La presencia de LAC458-H6 en la fracción insoluble indica que la proteína se estaría acumulando como agregados insolubles, en cuerpos de inclusión y que además estaría de forma inactiva ya que tampoco se detectó actividad laccasa en esta fracción.

La formación de agregados insolubles es frecuente durante la producción de proteínas heterólogas. Los altos niveles de expresión causarían aparentemente un desequilibrio entre la cantidad de proteína formada y la tasa de plegamiento, propiciando la formación de agregados insolubles, o simplemente, la célula podría estar agregando la proteína como una estrategia de protección ante la producción de una proteína tóxica.

La formación de estos agregados en los procesos de producción de proteínas recombinantes tiene algunas ventajas pero también inconvenientes. Los agregados son una fuente de proteína recombinante concentrada y prácticamente pura, la cual puede purificarse más fácilmente que la proteína obtenida de forma soluble. El principal inconveniente es la obtención de la proteína de forma inactiva haciendo necesaria su solubilización y replegamiento para la obtención de la proteína funcional (Choi et al., 2006).

Por lo tanto, y teniendo en cuenta que la expresión de proteínas recombinantes a temperaturas sub óptimas para el crecimiento de *E. coli* mejora la solubilidad de las proteínas con tendencia a agregarse, se evaluó la expresión de LAC458-H6 a 18 °C. Además, como la solubilidad de las proteínas está influenciada por su tasa de síntesis, también se analizó la producción a bajas concentraciones del agente inductor (en este caso IPTG, 0.1 mM).

### 3.1.3. Efecto de la temperatura y concentración del agente inductor en la expresión

Con el fin de analizar si la disminución de la temperatura y de la concentración del inductor IPTG tiene un efecto en la producción soluble de la proteína, se trabajó con un cultivo *E. coli* C41-pDIA17 transformada con el vector pLAC458-H6, crecido a 37 °C y posteriormente termostatzado a 18 °C durante 30 min. Se agregó el inductor

IPTG a una concentración final de 0.1 mM y la inducción se dejó transcurrir durante 18 h a 18 °C.

En la Figura 3.5 se muestra el análisis por SDS-PAGE del ensayo de expresión a baja temperatura y menor concentración de IPTG. En estas condiciones, no se observó inducción de la producción de la proteína (no se evidencia la sobreexpresión de una banda proteica del tamaño esperado), ni actividad laccasa, en ninguna de las fracciones (soluble e insoluble).

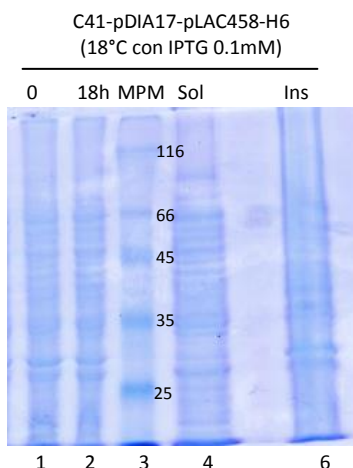


Figura 3.5 Perfil de proteínas por electroforesis SDS-PAGE. Expresión de LAC458-H6 a 18°C y concentración reducida de inductor. De izquierda a derecha, carriles 1y 2: proteínas totales de C41(DE3)pDIA17 transformada con pLAC458-H6 antes y después de 18 h de inducción IPTG 0.1 mM; carril 3: marcador de tamaño molecular SM0431 de Fermentas (en kDa); carril 4: proteínas presentes en fracción soluble y carriles 6: proteínas presentes en fracción insoluble.

#### 3.1.4. Expresión en condiciones de microaerobiosis y presencia de $\text{Cu}^{2+}$

Las laccasas requieren cuatro iones de cobre para la catálisis, por lo cual un suministro suficiente de iones cobre en el citoplasma es crucial para la obtención de la enzima activa. Sin embargo, la existencia de elaborados mecanismos de homeostasis en *E. coli* (sistemas de detección de  $\text{Cu}^{2+}$  y de eflujo) mantienen el contenido de cobre intracelular dentro de un rango estrecho, debido a la conocida citotoxicidad de este metal de transición (Rensing y Grass, 2003; Arguello et al., 2013). Las células cultivadas bajo condiciones de crecimiento anaeróbico no inducen estos sistemas en la misma medida y permiten la acumulación del  $\text{Cu}^{2+}$  intracelular (Outten et al., 2001). Por lo tanto, el crecimiento de *E. coli* en condiciones de microaerobiosis y presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  podría favorecer la producción de una laccasa activa y soluble.



Durao et al. (2008) describen que el contenido de cobre, y por lo tanto la actividad de la enzima laccasa CotA de *B. subtilis* producida de forma recombinante en *E. coli*, dependen de la adición de cobre así como de la disponibilidad de O<sub>2</sub> en el medio de cultivo. La acumulación de cobre intracelular debido a la suplementación del medio con cobre y a la transición entre condiciones aeróbica y microaeróbica conduce a un estado de plegamiento apropiado en el que la enzima se encontraría completamente cargada de cobre. Así, para la producción de la laccasa recombinante CotA de *Bacillus* sp. HR03, Mohammadian et al. (2010) adaptaron las condiciones de cultivo con éxito, obteniendo como resultado una notoria mejora en la solubilidad y actividad de la enzima producida en comparación con la producción en condiciones estándares (sin agregado de cobre y cultivo en aerobiosis). En concordancia, los autores Koschorreck et al. (2008) y Callejón et al. (2015) obtuvieron resultados similares empleando esas condiciones.

Basado en estos antecedentes, se analizó la producción de LAC458-H6 en condiciones de microaerofilia y agregado de Cu<sup>2+</sup> al medio de cultivo según se indica en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.7.

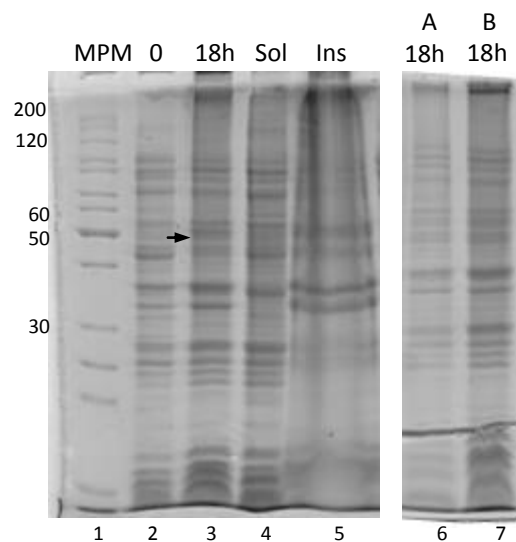


Figura 3.7 Perfil de proteínas por electroforesis SDS-PAGE. Expresión de LAC458-H6 en condiciones de microaerofilia y agregado de cobre, a 18° C. De izquierda a derecha, carril 1: marcador de tamaño molecular SM26614 Fermentas, carriles 2 y 3: perfil de proteínas totales antes y después de 18 h de inducción con IPTG 0.1mM; carriles 4 y 5: proteínas en fracción soluble e insoluble respectivamente, carriles 6 y 7: proteínas totales de los cultivos control a las 18hs. Control A: C41(DE3)pDIA17 transformada con pLAC458-H6 sin inducir. Control B: C41(DE3)pDIA17 transformada con pET14b sin inserto. La flecha negra indica la banda proteica correspondiente a LAC458. Se indican los tamaños moleculares en kDa de algunas bandas del marcador de tamaño molecular.

Los resultados mostrados en la Figura 3.7 sugieren que en las condiciones ensayadas tuvo lugar la síntesis de LAC458-H6, aunque la baja intensidad de la banda proteica de tamaño esperado, indica una menor expresión que la observada a 37 °C, en condiciones aeróbicas y ausencia de cobre (Figura 3.4) La banda proteica de 50 kDa no se observa con claridad en la fracción soluble, mientras que sí se evidencia en la fracción insoluble, poniendo de manifiesto nuevamente la presencia de la proteína en agregados insolubles. Sin embargo, no fue posible detectar actividad laccasa tanto en la fracción soluble como en la insoluble, sugiriendo que la totalidad de la proteína sintetizada estaría de forma inactiva formando cuerpos de inclusión, o que la CDS clonada no codificaría para una proteína con actividad laccasa o multicobre oxidasa. Nuevamente, para corroborar con exactitud la localización de la proteína debería realizarse un ensayo Western Blot empleando anticuerpos contra la cola de histidinas.

Estos resultados mostraron que, contrariamente a lo reportado por los autores mencionados, el agregado de cobre y la creación de condiciones microaerofilicas no serían medidas eficaces para aumentar la solubilidad de la proteína LAC458-H6, al menos en los hospederos empleados.

### **3.2 Solubilización, plegamiento *in vitro* y purificación de la proteína**

Considerando que en todas las condiciones ensayadas se logró la producción de LAC458-H6 en la forma de cuerpos de inclusión, se procedió a recuperar la proteína directamente desde los mismos. Para ello, se solubilizaron los cuerpos de inclusión obtenidos en el ensayo de expresión con la cepa C41(DE3)-pDIA17 a 37 °C, empleando un buffer de lisis conteniendo urea 8M, según se indica en Materiales y Métodos. A continuación, dicha preparación se utilizó inmediatamente para el ensayo de plegamiento *in vitro* y purificación por IMAC empleando condiciones no desnaturalizantes según las recomendaciones del fabricante para la purificación en condiciones híbridas.

En la Figura 3.7 se muestra el progreso de la purificación. En los eluidos 2 y 3 se observa dos bandas proteicas de tamaño aproximado al esperado (50 kDa) que podrían ser la proteína LAC458-H6. Considerando que las laccasas son proteínas usualmente glicosiladas, la doble banda observada podría deberse a diferentes grados de glicosilación de la proteína presente en los cuerpos de inclusión. Es de destacar el grado de pureza observado en los eluidos, no visualizándose la presencia de otras bandas proteicas con el método de tinción empleado.

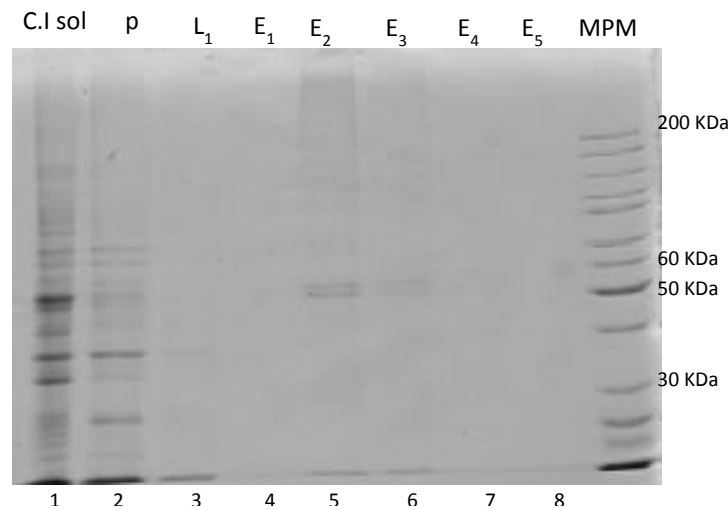


Figura 3.7 Control por SDS-PAGE de las etapas de solubilización, replegado y purificación por IMAC de LAC458-H6 recombinante. De izquierda a derecha, carril 1: Cuerpos de inclusión solubilizados por tratamiento con buffer de lisis y urea 8M (C.I sol), carril 2: percolado (P), carril 3: primer lavado, carriles 4-8 fracciones de elución, y carril 9: marcador de tamaño molecular SM26614 Fermentas. Se indican los tamaños moleculares de algunas de las bandas proteicas del marcador.

Los eluidos conteniendo LAC458-H6 se agruparon y se sometieron a un cambio de buffer (buffer fosfato 50 mM pH 7) con la intención de eliminar el imidazol y las sales presentes en el buffer de elución. Una vez desalados, se determinó la actividad laccasa del eluido, sin que se detectara actividad enzimática. Con la finalidad de aumentar la concentración proteica del eluido, los mismos se concentraron por centrifugación utilizando centricones UltraFreeMC MW30000 (Merk Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las soluciones obtenidas tampoco presentaron actividad laccasa.

La renaturalización de proteínas es un proceso complejo que a menudo depende de muchos factores, incluyendo la concentración de proteína o aditivos durante el proceso de repliegue (Yasuda et al., 1998; Dong et al., 2004). Por lo que, lograr la solubilización y el repliegue *in vitro* de la proteína a partir de los cuerpo de inclusión, no garantiza la obtención de una enzima completamente activa.

Ante la falta de actividad laccasa de la enzima purificada, se decidió confirmar la identidad de las bandas purificadas mediante su análisis por espectrometría de masa (MALDI-TOF). Los resultados obtenidos permitieron confirmar que la proteína purificada correspondía a la proteína LAC458-H6, al identificarse de forma

estadísticamente significativa, con un grado de cobertura total de secuencia del 60%. En la Figura 3.8 se indica en rojo los péptidos identificados.

```

1  MGSSEHHHHH SGLVPRGSH MMSQTFSTRQ ILGGLAGLAV VGVGAGGAYR
51  YWLGKVAEAE AGHDYELIAA PLDVELVPGH KTQAWAFGPS APGTELVRVQ
101 GEWLRVRFIN HLPVATTIHW HGIRLPLEMD GVPYVSQLPV LPGEYFDYKF
151 RVPDAGSYWY HPHVNSSEEL GRGLVGPLII EEREPTGFKH ERTLSTLKSWH
201 VDEEGAFVAF SVPREAARGG TAGRLSTING VSQAVVDLPA GQITRVRLLN
251 LDNLTLYRIN IPGVEAQTIA LDGNPIEPRP MGKEYWLGPG MRICPTIKAP
301 PAGEELSTRN GPVRLGTFRS VVNTDAPNEW PPALPANPIA EPDLANAELK
351 NFNFEWVGTV SVDNGKPPSL WQINGQAWDI TDKTCADRPI AKLEKGSYI
401 FELKNMTQYQ HPDHLHGMSF KVIASNRHKV IPYFTDTYLL GKNERARVAL
451 VADNPGVWVF HCHVIDHMET GLMAAIEVA

```

Figura 3.8 Péptidos de LAC458-H6 identificados por espectrometría de masa

Los resultados presentados durante este capítulo muestran que fue posible expresar la proteína LAC458-H6 en la cepa de *E. coli* C41(DE3)-pDIA17 [también en BL21(DE3)-pLysS aunque aquí no se muestra] pero que la misma se produjo de forma insoluble en todas las condiciones ensayadas. Es posible que uno de los factores implicados en la baja solubilidad de la proteína recombinante, radique en la presencia de un alto número de puntos calientes (propensos a la agregación) en la secuencia de LAC458 tal como fuera detectado *in silico* en el Capítulo 2 de esta tesis.

La expresión heteróloga de laccasas bacterianas en *E. coli* ha sido reportada por varios autores (Sanchez-Amat et al., 2001; Endo et al., 2003; Suzuki et al., 2003; Machczynski et al., 2004; Ruijsenaars y Hartmans 2004; Miyazaki 2005; Koschorreck et al., 2008; Molina-Guijarro et al., 2009; Wu et al., 2010; Callejon et al., 2015; Ihssen et al., 2015), pero a menudo se han observado bajos rendimientos en su producción, y una tendencia a la formación de agregados insolubles, difíciles de purificar (Martins et al., 2002; Suzuki et al., 2003; Li et al., 2008; Pscitelli et al., 2010; Mollania et al. 2013 y Si et al., 2015). Otros autores como Miyazaki (2005) y Ye et al. (2010) hacen frente a los usuales problemas de insolubilidad de las laccasas bacterianas recombinantes empleando el vector pET32 para su expresión. En este tipo de vector la proteína recombinante queda fusionada a una proteína tioredoxina que mejora significativamente la solubilidad de la proteína expresada.

Existen variadas estrategias para aumentar la solubilidad de proteínas sobreexpresadas como lo son la disminución de la temperatura de inducción y la disminución de la concentración de inductor empleada (Bollang et al., 1996; Shirano y

Shibata 1999, Schlicke y Brakmann, 2005), entre muchas otras. En particular, para las laccasas el agregado de cobre al medio y la generación de condiciones microaerofilicas han demostrado mejorar la solubilidad en algunos casos (Duraó et al., 2008; Koschorreck et al., 2008; Mohammadian et al., 2010; Callejón et al., 2015). Por este motivo en un primer momento nuestros esfuerzos se dirigieron hacia la optimización de la producción de la enzima en forma soluble. Sin embargo, en todas las condiciones ensayadas, la proteína LAC458-H6 se obtuvo formando parte de agregados insolubles.

La alta insolubilidad de la proteína podría estar relacionada con la presencia de residuos de cisteína, identificados en el análisis informático de la secuencia obtenida (Capítulo 2) y su capacidad para formar enlaces disulfuro. De dicho análisis se desprendería que la proteína presentaba tres residuos de cisteína capaces de formar un enlace disulfuro. El citoplasma de *E. coli* tiene un ambiente reductor que desfavorece una adecuada formación de puentes disulfuro, pudiendo provocar un incorrecto plegamiento de las proteínas ricas en este tipo de enlaces (Baneyx, 1999). Para la expresión de proteínas recombinantes ricas en residuos de cisteína suelen emplearse cepas optimizadas como Origami™ (Novagen) y SHuffle® (New England BioLab) las cuales presentan mutaciones que favorecen la formación de puentes disulfuro en el citoplasma. Estas cepas presentan una delección de los genes que codifican para la tiorredoxina reductasa (*trxB*) y la glutatión reductasa (*gor*). La ausencia de estas enzimas genera un ambiente redox intracelular más oxidativo que favorece la correcta formación de enlaces disulfuro en el citoplasma (de Marco, 2009). Más aun, la cepa SHuffle expresa en el citoplasma la enzima isomerasa de puentes disulfuro, DsbC, que cataliza intercambios tiol-disulfuro de manera específica, favoreciendo así la formación de enlaces disulfuros correctos. Otra alternativa para la producción de proteínas con enlaces disulfuros es su exportación al periplasma donde el ambiente oxidante favorece la formación de este tipo de enlaces (de Marco, 2009). Si bien LAC458 no presentaría un gran número de enlaces disulfuro, la correcta formación del mismo sería determinante para un adecuado plegamiento y solubilidad de la enzima. En las laccasas este tipo de enlace participa en la unión de los dominios de cupredoxina (ver Introducción) y se ha observado que el empleo de agentes reductores (como *b*-mercaptoetanol, glutatión reducido, DTT, entre otros) afecta notablemente la actividad de este tipo de enzima (Rosconi et al., 2005; More et al., 2011; Singhal et al., 2012; Sondhi et al., 2014). Por lo tanto, el uso de alguna de las cepas optimizadas mencionada podría mejorar la solubilidad de LAC458-H6, así como su posible producción en forma activa.

También podría explicarse la acumulación de la proteína en agregados insolubles por su potencial toxicidad para los hospederos empleados. Para prevenir esto se utilizaron cepas hospederas que presentan características apropiadas para la expresión de genes potencialmente tóxicos, ya que poseen diversos sistemas para el control de la expresión basal (Munier et al., 1991; Studier et al., 1991). En este sentido, los cultivos bacterianos conteniendo o no a la proteína recombinante alcanzaron niveles de crecimiento similares, lo que descartaría un efecto tóxico debido a la producción de la enzima (datos no mostrados). Sin embargo para verificar la ausencia de fenómenos de toxicidad menores, deberían realizarse curvas de crecimiento de las cepas con y sin vector de expresión, previo a la inducción con IPTG, y comparar los perfiles de crecimiento de forma de descartar un enlentecimiento en el crecimiento microbiano debido a la expresión basal de la proteína.

Otro factor que influye en el rendimiento en la producción recombinante es la presencia de péptido señal en el N-terminal de la proteína a expresar. Durante el desarrollo del Capítulo 2, se identificó en LAC458 la presencia de un péptido señal para la vía de secreción TAT. En contraste con la ruta de secreción Sec, que transporta las proteínas en forma desplegada, la vía TAT transloca activamente proteínas en conformación plegada a través de la membrana (Berks et al., 2000, Stanley et al., 2000; DeLisa et al., 2003). La presencia de este tipo de péptido se ha descrito para algunas laccasas (Lee et al. 2002; Machczynski et al., 2004; Sánchez-Sutil et al., 2007; Molina-Guijarro et al., 2009; Gunne y Urlacher, 2012). Algunos autores reportan que la presencia o ausencia de péptidos señal para la vía TAT puede alterar los niveles de proteína soluble producida, así como el grado de actividad alcanzado (Uthandi et al., 2012; Ihssen et al., 2015). Ihssen et al. (2015), en un extenso trabajo donde se describe la producción recombinante de cinco laccasas bacterianas, evalúan la relevancia del péptido señal TAT en la producción de las enzimas. Los autores observan que en ausencia del péptido señal del tipo TAT se obtiene un aumento de la actividad de hasta 50 veces para las laccasa de *G. forsetii* y *M. tractuosa*. Sin embargo, estos autores reportan la pérdida total de actividad al expresar la laccasa de *S. pristinaespiralis* sin péptido señal. Uthandi et al. (2012) comprueban que la expresión heteróloga de la laccasa de *Haloferax volcanii* mejora notablemente cuando se expresa sin el péptido TAT. Estos resultados sugieren que en cada caso debería evaluarse la producción de la enzima con y sin el péptido TAT. En nuestro caso, LAC458 recombinante se produjo con el péptido TAT, por lo cual, en un futuro correspondería evaluar la expresión de LAC458 sin el péptido señal.

Como estrategia para solubilizar y replegar la proteína, se utilizó el método de plegamiento en columna en condiciones híbridas. Esta metodología no dio los resultados esperados, sin embargo quedan pendientes el desarrollo de otras estrategias de solubilización y plegamiento de la proteína. Mollania et al. (2013) describen el desarrollo de un protocolo para la solubilización y replegado de la laccasa CotA de *Bacillus* sp., empleando el método de dilución así como diálisis para la renaturalización de la enzima solubilizada y evalúan el efecto del pH, agregado de diferentes aditivos y duración del tratamiento. Los mejores resultados los obtienen con el método de dilución en buffer citrato-fosfato 100mM, adicionado con ZnSO<sub>4</sub> 4mM y sorbitol 100 mM. En un futuro se podría evaluar el resultado de este protocolo en la solubilidad de LAC458.

La obtención de LAC458-H6 inactiva deja abiertas varias posibilidades: i) la proteína no tendría actividad laccasa; ii) no presenta actividad porque no se logró replegar correctamente; iii) durante el proceso de replegado y purificación, la proteína perdió algún cofactor fundamental para su actividad; iv) la proteína no se sintetizó en las condiciones apropiadas, como podría ser una incorrecta glicosilación.

La obtención de una laccasa bacteriana recombinante de forma inactiva ya fue reportada por Miyazaki (2005) y Molina-Guijarro et al. (2009). En ambos trabajos los autores logran activar la enzima luego de un periodo de incubación y diálisis en buffer conteniendo CuSO<sub>4</sub>. Sin embargo, Callejón et al. (2015), no consiguieron recuperar la actividad de la enzima laccasa de *Lactobacillus plantarum* empleando esta aproximación. Teniendo esto en cuenta, en un futuro se podría evaluar si mediante la incubación de LAC458-H6 con diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub> se logra activar la enzima.

## DISCUSION GENERAL, PERSPECTIVAS Y CONCLUSIONES

Durante este trabajo de tesis se utilizaron varias estrategias para la identificación y purificación de una enzima de interés industrial, la laccasa. Al inicio del trabajo se utilizó un abordaje proteómico, diseñado en base a la información bioquímica previa sobre la laccasa de *S. meliloti* CE52G. No fue posible purificar a homogeneidad la laccasa de *S. meliloti* CE52G mediante las dos estrategias proteómicas empleadas. Ambas estrategias se basaron en la identificación de proteínas con múltiples sitios de unión a cobre, por ser ésta una característica diferencial de algunas pocas proteínas, entre ellas las laccasas. Si bien no se consiguió purificar la enzima se avanzó en el conocimiento sobre ella, observándose que la misma se produce tanto en presencia como en ausencia de cobre, y que en este último caso se produciría de forma inactiva como una apoenzima cuya activación se conseguiría con el agregado de cobre e imidazol.

Queda pendiente utilizar otras estrategias de purificación de laccasas bacterianas. Según algunos reportes que han sido exitosos, podría intentarse la precipitación con acetona-protamina, seguida de una cromatografía con hidroxiapatita en presencia de urea 5M y NaCl 2M, y posterior cromatografía de hidroxiapatita convencional y diálisis (Diamantidis et al. 2000, laccasa de *A. lipoferum* –primer laccasa bacteriana purificada); precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de interacción hidrofóbica seguida de una cromatografía de intercambio iónico (Arias et al. 2003, laccasa de *S. cyaneus*); cromatografías de intercambio iónico seguida de gel filtración (McMahon et al. 2007, laccasa de *P. putida*); precipitación por temperatura seguido de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular (Kalme et al. 2009, laccasa de *P. desmolytucum*); precipitación con sulfato de amonio seguida de cromatografía de intercambio iónico (Kuddus et al. 2013, laccasa de *P. putida*). Aunque no se presentaron entre los resultados de esta tesis, se realizó un intento de purificación de la laccasa de CE52G por precipitación proteica con sulfato de amonio o una combinación de acetona y ácido tricloroacético, pero esta estrategia se descartó porque producía una importante disminución de la actividad laccasa de SmCE52G (datos no mostrados).

El cambio de estrategia (proteómica a genómica) para la identificación de la laccasa de CE52G, empleando cebadores degenerados diseñados en base a las secuencias conservadas de los sitios de unión a cobre para la amplificación de una secuencia parcial de la CDS, tampoco permitió identificar el gen codificante. Sin



embargo, la estrategia resultó exitosa, pues permitió identificar el gen codificante para una enzima multicobre oxidasa tipo laccasa de la cepa AU10 de *Pseudomonas* sp.

Actualmente, la estrategia más racional para la identificación del gen codificante de la laccasa de Sm CE52G sería la secuenciación de su genoma completo y la búsqueda informática de los genes codificantes para enzimas del tipo laccasas. Como se discutió anteriormente, es posible que la enzima responsable de la actividad laccasa de SmCE52G sea una enzima bifuncional con actividad secundaria polifenol oxidasa. Por lo tanto, teniendo en cuenta que en ambos abordajes empleados (proteómico y genómico) se identificó una enzima catalasa y que existen reportes sobre catalasas bifuncionales con actividad del tipo fenol oxidasa adicional (Kokabas et al., 2008), se debería también buscar aquellos genes codificantes para catalasas.

Como la identificación de microorganismos con actividad laccasa se puede

realizar fácilmente en medio de cultivo con DMS y agarosa, una estrategia potencial para la búsqueda de la CDS de la laccasa podría ser la construcción de mutantes con transposones que se insertan al azar, y la búsqueda de los tranconjugantes incapaces de producir esta enzima. Sin embargo, a esta altura del trabajo de tesis, se decidió continuar el trabajo focalizándose en el análisis y expresión recombinante de la multicobre oxidasa producida por AU10.

El análisis informático de la secuencia codificante para la proteína multicobre oxidasa LAC458 de *Pseudomonas* sp. AU10 reveló que la misma presenta un elevado grado de similitud (98%) con la proteína multicobre oxidasa tipo laccasa CumA de *Pseudomonas fluorescens* y que al igual que ésta, presenta un codón de inicio inusual (GTG) así como una señal para su secreción por la vía TAT. Dicho análisis también reveló la presencia de un puente disulfuro en la estructura de la proteína así como múltiples regiones propensas a la agregación o "hot spots", anticipando la posible ocurrencia de fenómenos de agregación durante la expresión recombinante de la enzima.

Efectivamente, durante la expresión de la enzima se observó la agregación de la proteína en cuerpos de inclusión y como consecuencia su producción en forma insoluble. Mediante la variación en las condiciones de expresión (temperatura, concentración de inductor, presencia de cobre y microaerofilia) no se logró mejorar la solubilidad de la proteína por lo que la misma se solubilizó empleando un agente caotrópico (Urea 8M) y se purificó y replegó *in vitro*. Aunque fue posible obtener la enzima en forma recombinante y solubilizarla, la misma se obtuvo de forma inactiva

no detectándose actividad laccasa. Sin embargo, los estudios *in silico* indican que se trataría de una laccasa, lo cual nos alienta a seguir intentado la producción de esta enzima, que por provenir de un microorganismo sicrotolerante, podría tener propiedades bioquímicas innovadoras, como actividad a baja temperatura y menor especificidad de sustrato, entre otras.

El trabajo con proteínas recombinantes es muchas veces complejo e incierto, y no siempre se obtienen los mismos resultados siguiendo lo reportado por otros investigadores, por lo tanto sería deseable seguir explorando todas las posibilidades, como optimizar el uso de codones del gen para *E. coli*, emplear cepas optimizadas para la producción de proteínas con enlaces disulfuro, así como la expresión de la proteína sin el péptido señal TAT.

## CONCLUSIONES

- A pesar de no lograr purificar a homogeneidad la proteína con actividad laccasa de Sm CE52G se obtuvo nueva información sobre ella. Los resultados sugieren que no sería una proteína de expresión diferencial (en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ ) y que podría tratarse de una enzima bifuncional, cuya actividad laccasa se activaría en determinadas situaciones.
- Se identificó el gen *lac458* codificante para una proteína multicobre oxidasa del tipo laccasa de *Pseudomonas* sp. AU10 (LAC458) y fue posible su expresión recombinante en *E. coli* C41(DE3)pDIA17. Aunque se probaron varias condiciones para su producción, aún resta analizar cuales serían las condiciones para la producción de la enzima en forma soluble y activa.

## APENDICE 1: SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DELUCIDADA

En color **rojo** se indica la secuencia codificante de LAC458. Sobre la misma se indica en **subrayado** las regiones donde hibridan los cebadores específicos (LacAU10f/ LacAU10r) y los cebadores de iPCR (LacAU10\_Out\_f /LacAU10\_Out\_r). En color **azul** se muestra parte de la secuencia codificante para la PNP sintasa y en color **verde** parte de la secuencia codificante para la GTPasa.

5´ **CCCCCATGAACTTCGAAATGGGCGTCACCGAAGAAATGATGGCGTTCGCCGAGCGCATCCGCCCGGCGCATATCTGCCT**  
**GGTGCCGAAACCCGCCAGGAACTGACCACCGAAGGCGGCTCGACGTGGCCGGCCAGGAAGCGCGGATCAAAGCTGCCGT**  
**GGAACGCCTGTGGAAGATCGGCAGCGAAGTCTCGCTGTTTCATCGACGCCGACGAGCGCCAGATCGAAGCCTCGCGTCGCGT**  
**AGGCGCGCCCGCCATCGAACTGCACACCGGCCGTTACGCCGATGCCACCACGCCACCAGGAGTGGCTGACGAGCTGCAACG**  
**CATCATCGACGGCGTAAAGTGGCGCTGAATGAAGGCTGATCGTCAACGCCGGCCATGGCCTGCACTACCACAACGTCGA**  
**AGCCGTGGCGGCGATCAAAGGCATCAACGAACTGAACATCGGCCACGCGCTGGTGGCGCATGCGCTGTTTCGTCGGTTTCAA**  
**AGGCGCGGTTCGCCGAGATGAAAGCCCTGATTCTGGCTGCCGCCAAGGCC**TG**A**TACCACAACCTTATGGTCAGCGGGCTTGC  
**ACAAGACCCAATGAAATCGCAAGTGCAGCAATGCGAAGCCTTACTGTTTAGCCGGTTCAGGTGTATCGTATCTGCCCTTG**  
**CGGGCCTATGGCTCGCGCAGATACGTGAGGTTGTT**GTGTCC**AAACTTTTTCCCGTCGACAAATCTGGGTGGTCTT**GCA****  
**GGCCTGGCCGTAGTGGGCGTGGTGGCGGTGGCGCCTACCGCTACTGGCTGGGAAAAGTCGCCGAGGCCGAAGCGGGT**CAC****  
**GATTACGAGCTGATCGCCGCGCCGCTCGACGTGGAAGTGGTGGCGGGCATAAAACCCAAGCCTGGGCGTTCGGCCATCG**  
**GCGCCGGGCACCGAGTTGCGTGTGCGTCAGGGAGAATGGCTGCGGGTGGCGTTTATCAACCACCTGCCGGTTCGCCACCACC**  
**ATCCACTGGCACGGCATCCGCTGCCGCTGGAAATGGACGGCGTGCCTTACGTCTCGCAATTGCCGGTGTGCCTGGCGAA**  
**TACTTCGACTACAAATCCCGCTGCCGACGCCGGCAGCTACTGGTATCACCCGCATGTGAACAGCAGCGAAGAATCGGC**  
**CGTGGCCTGGTTCGGCCGTTGATCATCGAAGAGCGTGAACCCACCGGTTTCAAACACGAACGCACCCCTGAGCCTGAAAAGC**  
**TGGCATGTGGACGAAGAGGGCGCCTTTGTGCGCTTCAGCGTGCCCGGAGAAGCCGCGCGTGGCGGCACGGCGGGGCGGCTG**  
**TCGACGATCAATGGCGTGTCCAGGCGGTGTCGATTTGCCTGCCGGCAGATCACCCGCGTGGCCCTGCTCAACCTCGAC**  
**AACACGTGACTTATCGCATCAACATTTCCCGCGTTCGAAGCGCAGATCTATGCGCTGGACGGCAACCCCATCGAGCCGCGC**  
**CCAATGGGCAAGGAATACTGGCTGGGCCCCGGCATGCGCATTTGCCCGACGATCAAAGCGCCGCCGGCCGGTGAAGAACTG**  
**TCGATCCGCAATGGCCCGGTGCGCCTGGGCACCTTTGCTCTGTGGTCAACACCGACGCGCCCAACGAATGGCCACCGGCG**  
**CTGCCGGCAACCCGATTGCCGAGCCGGACCTGGCCAATGCCGAGAACTCAACTTCAATTTGAGTGGGTGGCACTGT**A****  
**TCAGTGGACAACGGCAAGCCGCCAAGCCTATGGCAGATCAACGGCCAGGCTGGGACATCACCGACAAGACCTGCGCCGAC**  
**CGCCCGATTGCCAAGCTTGAGAAGGGCAAGAGCTACATTTTGAATTGAAGAACATGACCCAGTACCAACACCCGATCCAC**  
**CTGCACGGCATGAGCTTCAAGGTGATGCGCTCGAACCGCCACAAGGTGATCCCGTACTTACCGACACCTACCTGCTGGGC**  
**AAGAACGAGCGCGCTCGCGTGGCGTTGGTGGCGGATAACCCAGGGGTGGTGGATGTTCCACTGCCACGTGATCGACCACATG**  
**GAAACCGGCCTGATGGCCGCCATCGAGGTGG**CATGA**T**GCGCCAGGTTGCCCTACAGCGATCATCGACCGCAGCCGCGACC  
**AGGACTTCATGCGTGAAGCCCTGGCCCTCGCCGCCAAGGCGCGGCACTGGGCGAAGTGCCCGTGGGTGCAGTGTGGTGC**  
**AGGACGTTGAAATCCAGGGAGAGCCGATCGCCGCGTGTCTTCGTGGAATGTGTAATCACCTTATTGAATGAAAAAGCC**  
**GAGGTCAGGGTGTGAGCCGTCGTATTGCCGAACAGGTAGCGGCGGCTGCAGCACTGATGCCCCTGGGCGTGGAGA**ATGGCC****  
**ATGACTGATTCAACCGCAACACGCTGTGGCTATGTTGCCATCGTCGGCCGCCGAACGTTGGGCAAGTCCACGCTGCTGAAC**  
**CACGCTTTGGGCCAGAAGCTGGCGATCACCTCGCGCAAGCCGACAGCACCCGTCACAACATGCTGGGCATCAAGACCGAA**  
**GGCGCCGTGCAAGCGCCCTACGTGACACCCCGGCATGCACAAAGGTGGCGAGAAGGCGCTTAACCGCTACATGAACAAG**  
**ACCGCTTCGGCGGCGTTGAAAGACGTGACGTGGTGTATCTTCGTGGTGCACCGCACCAAGTGGACCGACGAAGACCGATG**  
**GTTCTCGAGCGTGTGACGTACGTACCCGGCCGTTGGTTCGCTGCAACAAGACCGACCGCAT**C**3´**

## ANEXO 1: MEDIOS DE CULTIVO

### MEDIO LB

<b>Triptona</b>	10g
<b>Extracto de Levadura</b>	5g
<b>NaCl</b>	10g
<b>H<sub>2</sub>O c.s.p.</b>	1L
<b>Agar</b>	18g

### MEDIO TY

<b>Triptona</b>	5g
<b>Extracto de Levadura</b>	3g
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0.09g
<b>H<sub>2</sub>O c.s.p.</b>	1L
<b>Agar</b>	18g

### 2XYT

<b>Peptona</b>	16g
<b>Extracto de Levadura</b>	10g
<b>NaCl</b>	2g
<b>H<sub>2</sub>O c.s.p.</b>	1L
<b>Agar</b>	18g



## ANEXO 2: ELECTROFORÉISIS DESNATURALIZANTE DE PROTEINAS

<b>GEL CONCENTRADOR 5%</b>	
<b>Agua desionizada</b>	3,4 mL
<b>Tris-HCl 1 M pH 6,8</b>	0,63 mL
<b>Acrilamida-Bisacrilamida 30 % (p/v)</b>	0,83 mL
<b>SDS 10 % (p/v)</b>	0,05 mL
<b>Persulfato amónico 10 %</b>	0,05 mL
<b>TEMED</b>	0,005 mL

<b>GEL SEPARADOR 12%</b>	
<b>Agua desionizada</b>	1,6 mL
<b>Tris-HCl 1,5 M pH 8,8</b>	1,3 mL
<b>Acrilamida-Bisacrilamida 30 % (p/v)</b>	2 mL
<b>SDS 10 % (p/v)</b>	0,05 mL
<b>Persulfato amónico 10 %</b>	0,05 mL
<b>TEMED</b>	0,002 mL

<b>BUFFER DE CORRIDA pH 8,3</b>	
<b>Tris Base</b>	3 g
<b>Glicina</b>	14,4 g
<b>SDS</b>	1 g
<b>H<sub>2</sub>O mQ c.s.p.</b>	1 L

<b>BUFFER MUESTRA/CARGA 5X</b>	
<b>Buffer Tris 1M pH 6,8</b>	3,75
<b>SDS 20%</b>	3 mL
<b>Azul de Bromofenol</b>	9 mg
<b>B-mercaptoetanol</b>	
<b>Glicerol</b>	4,5 mL
<b>H<sub>2</sub>O mQ c.s.p.</b>	10,5

<b>SOLUCIÓN DE TINCIÓN</b>	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	500 mL
<b>EtOH</b>	400 mL
<b>Ácido Acético Glacial</b>	100 mL
<b>Azul Brillante Coomasie</b>	1g

**ANEXO 3:**  
EQUIVALENCIA BASES DEGENERADAS

<b>BASE DEGENERADA</b>	<b>EQUIVALENCIA</b>
<b>R</b>	A,G
<b>Y</b>	C,T
<b>M</b>	A,C
<b>K</b>	G,T
<b>S</b>	C,G
<b>W</b>	A,T
<b>H</b>	A,C,T
<b>B</b>	C,G,T
<b>V</b>	A,C,G
<b>D</b>	A,G,T
<b>N</b>	A,C,G,T



**ANEXO 4:**  
SOLUCIONES EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

---

<b>SOLUCIÓN I</b>	
<b>Glucosa</b>	50 mM
<b>Tris-HCl pH 8.0</b>	25 mM
<b>EDTA</b>	10 mM
<b>Azul Brillante Coomassie</b>	1g

---

<b>SOLUCIÓN II</b>	
<b>NaOH 10 N</b>	0.2 mL
<b>SDS 10%</b>	1 mL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	8.8 mL

---

<b>SOLUCIÓN III</b>	
<b>Acetato de potasio 5M</b>	60 mL
<b>Ácido Acético Glacial</b>	11.5 mL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	28.5 mL

**ANEXO 5:**  
BUFFERS EMPLEADOS PARA EL REPLEGAMIENTO Y PURIFICACIÓN EN  
COLUMNA Ni-NTA (QUIAGEN)

---

**BUFFER DE UNIÓN  
DESNATURALIZANTE**

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.8 20 mM**

**NaCl 500 mM**

**Urea 8 M**

Esterilizar por filtración (filtros 45µm) y almacenar a temperatura ambiente

---

---

**BUFFER DE LAVADO  
DESNATURALIZANTE**

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6 20 mM**

**NaCl 500 mM**

**Urea 8 M**

Esterilizar por filtración (filtros 45µm) y almacenar a temperatura ambiente

---

---

**BUFFER DE LAVADO NATIVO**

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8 50 mM**

**NaCl 300 mM**

**Imidazol 20 mM**

---

---

**BUFFER DE ELUSIÓN NATIVO**

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8 50 mM**

**NaCl 300 mM**

**Imidazol 500 mM**

**Glicerol 10%**

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3357-3362.
- Abdullah J, Ahmad M, Karuppiah N, Heng LY, Sidek H. 2007. An optical biosensor based on immobilization of laccase and MBTH in stacked films for the detection of catechol. *Sensors* 7: 2238-2250.
- Adams LF y Ghiorse WC. 1987. Characterization of extracellular Mn<sup>2+</sup>-oxidizing activity and isolation of an Mn<sup>2+</sup>-oxidizing protein from *Leptothrix discophora* SS-1. *Journal of Bacteriology* 169: 1279-1285.
- Adams M, Perler F, Kelly R. 1995. Extremozymes: Expanding the limits of biocatalysis. *Biotechnology* 13: 662-668.
- Aktas N y Tanyolac A. 2003. Kinetics of laccase-catalyzed oxidative polymerization of catechol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22: 61-69.
- Akyilmaz E, Şahin B, Türkmen H. 2014. A Palladium Complex Mediated Laccase Biosensor and Sensitive Voltammetric Analysis of Catechol. *Sensor Letters* 12: 1519-1525.
- Alexandre G, Bally R, Taylor BL, Zhulin IB. 1999. Loss of cytochrome oxidase activity and acquisition of resistance to quinone analogs in a laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology* 181:6730-6738.
- Alper N y Acar J. 2004. Removal of phenolic compounds in pomegranate juices using ultrafiltration and laccase-ultrafiltration combinations. *Nahrung* 48: 184-187.
- Ander P y Eriksson KE. 1976. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Archives of Microbiology* 109: 1-8.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR, Kramer KJ. 2005. *Laccase 2* is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11337-11342.
- Arana-Cuenca A, Téllez-Jurado A, Yagüe S, Villar JC, González AE. 2010. Delignification of Pinus radiata kraft pulp by treatment with a yeast genetically modified to produce laccases. *Forest Systems* 19: 234-240.
- Archibald FS, Bourbonnais R, Jurasek L, Paice MG, Reid ID. 1997. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology* 53:215-236.
- Arias ME, Arenes M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball AS, Hernandez M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1953-1958.
- Arora DS y Sharma RK. 2010. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Applied Biochemistry Biotechnology* 160: 1760-1788.
- Baker KH y Herson DS. 1994. *Bioremediation*. McGraw-Hill, Inc., New York, USA.
- Baldrian P y Gabriel J. 2002. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 206: 69-74.

- Bao W, O'Malley DM, Whetten R, Sederoff RR. 1993. A laccase associated with lignification in Loblolly Pine xylem. *Science* 260: 672-674.
- Barreca AM, Fabbrini M, Galli C, Gentili P, Ljunggren S. 2003. Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 26: 105-110.
- Barrett FM. 1987. Characterization of phenol oxidases from larval cuticle of *Sarcophaga bullata* and a comparison with cuticular enzymes from other species. *Canadian Journal of Zoology* 65:1158-1166.
- Bauer CG, Kuhn A, Gajovic N, Skorobogatko O, Holt PJ, Bruce NC, Makower AA, Lowe CR, Scheller FW. 1999. New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 364: 179-183.
- Beloqui A, Pita M, Polaina J, Martínez-Arias A, Golyshina OV, Zumárraga M, et al. 2006. Novel Polyphenol Oxidase Mined from a Metagenome Expression Library of Bovine Rumen. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 22933-22942.
- Berks BC, Sargent F, Palmer T. 2000. The Tat protein export pathway. *Molecular Microbiology* 35: 260-74
- Bermek H, Li K, Eriksson KE. 1998. Laccase-less mutants of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* cannot delignify kraft pulp. *Journal of Biotechnology* 66: 117-124.
- Berrio J, Plou FJ, Ballesteros A, Martinez AT, Martinez MJ. 2007. Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit C: stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters. *Biocatalysis and Biotransformation* 25: 130-134.
- Bertrand G. 1894. Sur le latex de l'arbre à laque. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 118: 1215-1218.
- Bertrand G. 1896. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 123: 463-465.
- Binnington KC y Barrett FM. 1988. Ultrastructural localization of phenoloxidases in cuticle and hemopoietic tissue of the blowfly *Lucilia cuprina*. *Tissue & Cell* 20:405-420.
- Binz T y Canevascini G. 1996. Differential production of extracellular laccase by Dutch elm disease pathogen *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. *Mycological Research* 100: 1060-1064.
- Blánquez P, Casas N, Font X, Gabarrell M, Sarrá M, Caminal G, Vicent T. 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Res* 38: 2166-2172.
- Bogsch EG, Sargent F, Stanley NR, Berks BC, Robinson C, Palmer T. 1998. An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *Journal of Biology Chemistry* 273: 18003 - 6.
- Bonnen AM, Anton LH, Orth AB. 1994. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 960-965.
- Bourbonnais R y Paice MG. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267:99-102.
- Bourbonnais R, Paice M, Freiermuth B, Bodie E. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and environmental microbiology* 63: 4627-4632.

- Bourbonnais R, Paice M, Reid D. 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 Microbiology Biotechnology* 61: 1876-1880.
- Bressler DC, Fedorak PM, Pickard MA. 2000. Oxidation of carbazole, Nethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Coriolopsis gallica*. *Biotechnology Letters* 22: 119-1125.
- Brouwers GJ, de Vrind J, Corstjens P, Cornelis P, Baysse C, de Vrind-deJong EW. 1999. *CumA*, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1762-1768.
- Cadena EM, Vidal T, Torres AL. 2010. Can the laccase mediator system affect the chemical and refining properties of the eucalyptus pulp?. *Bioresour Technology* 101:199-204.
- Cai W, Martin R, Lemaire B, Courtois D, Petiard V. 1993. Polyphenol oxidases produced by in vitro cultures of rosemary. *Plant Physiology and Biochemistry* 31: 233-240.
- Call HP y Mücke I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology* 53: 163-202.
- Camarero S, García O, Vidal T, Colom J, Río JCD, Gutiérrez A, Martínez MJ, Martínez AT. 2002. Flax pulp bleaching and residual lignin modification by laccase-mediator systems. *Progress in Biotechnology* 21: 213-222.
- Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez AT. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1775-1784.
- Campos R, Kandelbauer A, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM. 2001. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology* 89: 131-139.
- Cañas A, Alcalde M, Plou F, Martínez MJ, Martínez AT, Camarero S. 2007. Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environmental Science Technology* 41: 2964-2971.
- Cañas A y Camarero S. 2010. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28: 694-705.
- Caparrós-Ruiz D, Fornale S, Civardi L, Puigdomenech P, Rigau J. 2006. Isolation and characterisation of a family of laccases in maize. *Plant Science* 171: 217-225.
- Castro-Sowinski S, Martínez-Drets G, Okon Y. 2002. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiology Letters* 209: 119-125.
- Castro-Sowinski S, Matan O, Bonafede P, Okon Y. 2007. A Thioredoxin of *Sinorhizobium meliloti* CE52G Is Required for Melanin Production and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 986-993.
- Cavicchioli R, Siddiqui K, Andrews D, Sowers K. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 253-261.
- Cha J y Cooksey DA. 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* by periplasmic and outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 8915-1919.

- Chen S, Ge W y Buswell JA. 2004. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS Microbiology Letters* 230: 171-176.
- Chen T, Barton SC, Binyamin G, Gao Z, Zhang Y, Kim HH y Heller A. 2001. A miniature biofuel cell. *Journal of the American Chemical Society* 123: 8630-8631.
- Chivukul M y Renganathan V. 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4374-4377.
- Cho NS, Shin W, Jeong SW, Leonowicz A. 2004. Degradation of Lignosulfonate by Fungal Laccase with Low Molecular Mediators. *Bulletin of Korean Chemical Society* 25: 1551-1554.
- Choi J, Keum K, Lee S. 2006. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science* 61: 876- 885.
- Claus H. y Filip Z. 1997. The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiology Research* 152: 209-216.
- Claus H, Faber G, Koenig H. 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 672-678.
- Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35: 93-96.
- Clutterbuck AJ. 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 70: 423-435.
- Couto SR y Sanromán MA. 2007. The effect of violuric acid on the decolourization of recalcitrant dyes by laccase from *Trametes hirsuta*. *Dyes Pigments* 74: 123-126.
- Coy MR, Salem TZ, Denton JS, Kovaleva ES, Liu Z, Barber DS, Scharf ME. 2010. Phenol-oxidizing laccases from the termite gut. *Insect biochemistry and molecular biology* 40: 723-732.
- Crestini C y Argyropoulos DS. 1998. The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6: 2161-2169.
- d'Annibale A, Stazi SR, Vinciguerra V, Sermanni GG. 2000. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* 77: 265-273.
- Dayaram P y Dasgupta D. 2008. Decolorisation of synthetic dyes and textile wastewater using *Polyporus rubidus*. *Journal of Environmental Biology* 29: 831-836.
- de Marco A. 2009. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 8:26
- Deckert G, Warren PV, Gaasterland T, Young WG, Lenox AL, Graham DE, Overbeek R, Snead MA, Keller M, Aujay M, Huber R, Feldman RA, Short JM, Olsen GJ, Swanson RV. 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392: 353-358.
- Desai SS y Nityananda C. 2011. Microbial laccases and their applications: a review. *Asian Journal of Biotechnology* 2: 98-124.
- Demirjian D, Moris-Varas F, Cassidy C. 2001. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology* 5: 144- 151.
- Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang H, Zhu YC, Gorman MJ, Kramer KJ, Kanost MR. 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and

- developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect biochemistry and molecular biology* 34: 29-41.
- Dong G, Wang C, Wu Y, Cong J, Cheng L, Wang M, Wu K. 2013. Tat Peptide-Mediated Soluble Expression of the Membrane Protein LSEctin-CRD in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 8: 83579.
- Dong XY, Huang Y, Sun Y. 2004. Refolding kinetics of denatured-reduced lysozyme in the presence of folding aids. *Journal of Biotechnology* 114: 135-42.
- Dos Santos AB, Cervantes FJ, van Lier JB. 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology* 98: 2369-2385.
- Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, Brown SH, Østergaard P, Schneider P, Yaver DS, Pedersen AH & Davies GJ. 1998. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 angstrom resolution. *Nature Structural & Molecular Biology* 5: 310-316.
- Durrens, P. 1981. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospira anserina*: the three forms of the major laccase activity. *Archives of Microbiology* 130: 121-124.
- Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP y Kumar A. 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 68: 117-128.
- Edens WA, Goins TQ, 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, Temp U, Eriksson K. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1151-1158.
- Eggert C. 1997. Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbiological Research* 152: 315-318.
- Eisenman HC, Mues M, Weber SE, Frases S, Chaskes S, Gerfen G, Casadevall A. 2007. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology* 153: 3954-3962
- Endo K, Hayashi Y, Hibi T, Hosono K, Beppu T, Ueda K. 2003. Enzymological Characterization of EpoA, a Laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *Journal Biochemistry* 133: 671-677.
- Endo K, Hosono K, Beppu T, Ueda K. 2002. A novel extracytoplasmatic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology* 148: 1767-1776.
- Fabbrini M, Galli C, Gentili P. 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16: 231-240.
- Fang Z, Li TL, Wang QA, Zhang XC, Peng H, Fang W, Hong YZ, Ge HH, Xiao YH. 2011. A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 1103-1110.
- Fernandes AT, Damas JM, Todorovic S, Huber R, Baratto MC, Pogni R, Soares CM, Martins LO. 2010. The multicopper oxidase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum* shows nitrous oxide reductase activity. *FEBS Journal* 277: 3176-3189.

- Fernandes SC, de Oliveirab IR, Fatibello-Filho O, Spinellia A, Cruz Vieira I. 2008. Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate. *Sensors and Actuators B: Chemical* 133: 202–207.
- Fitz-Gibbon ST, Ladner H, Kim UJ, Stetter KO, Simon MI, Miller JH. 2002. Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 99: 984–989.
- Francis CA y Tebo BM. 2001. *cumA* multicopper oxidase genes from diverse Mn(II)-oxidizing and non-Mn(II)-oxidizing *Pseudomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4272–4278.
- Franzoi AC, Migowski P, Dupont J, Cruz Vieira I. 2009. Development of biosensors containing laccase and imidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide ionic liquid for the determination of rutin. *Analytica Chimica Acta* 639: 90–95.
- Freeman IC, Nayar PG, Bagley TP, Villafranca JJ. 1993. Stoichiometry and spectroscopic identity of copper centers in phenoxazinone synthase: a new addition to the blue copper oxidase family. *Biochemistry* 32: 4826–4830.
- Froehner SC y Eriksson KE. 1974. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. *Journal of Bacteriology* 120: 458–465.
- Gaitán IJ, Medina SC, González JC, Rodríguez A, Espejo AJ, Osma JF, Sarria V, Meciga-Díaz CJ, Sánchez O. 2011. Evaluation of toxicity and degradation of a chlorophenol mixture by the laccase produced by *Trametes pubescens*. *Bioresource Technology* 102: 3632–3635.
- Galli C y Gentili P. 2004. Chemical messengers: mediated oxidations with the enzyme laccase. *Journal of Physical Organic Chemistry* 17: 973–977.
- García O, Camarero S, Colom JF, Martínez AT, Martínez MJ, Monje R y Vidal T. 2003. Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57: 513–519.
- Gardiol AE, Hernández RJ, Reinhammar B y Harte B. 1996. Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 18: 347–352.
- Geiger JP, Nicole M, Nandris D, Rio B. 1986. Root-rot diseases of *Hevea brasiliensis*. 1. Physiological and biochemical aspects of host aggression. *European journal of forest pathology* 16:22–37.
- Gellissen G y Hollenberg CP. 1997. Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*: a review. *Gene* 190:87–97.
- Georis J, Lomascolo A, Camarero S, Dorgeo V, Herpoel I, Asther M, Martinez AT, Dauvrin T. 2003. *Pycnoporus cinnabarinus* laccases: An interesting tool for food or nonfood applications. *Communications in Agricultural and Applied Biological Science* 68:263–266.
- Georgette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Hoyoux A, Marx J, Sonan G, Feller G, Gerday C. 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 25–42.
- Ghindilis AL, Gavrilova VP, Yaropolov AI. 1992. Laccase-based biosensor for determination of polyphenols: determination of catechols in tea. *Biosensors and Bioelectronics* 7: 127–131.
- Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3: 1–25.



- Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Science* 67: 369-85.
- Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant ML, Bally R. 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters* 108: 205-210.
- Golz-Berner K, Walzel B, Zastrow L, Doucet O. 2004. Cosmetic and dermatological preparation containing copper-binding proteins for skin lightening. International Patent Application WO2004017931.
- Gomes J y Steiner W. 2004. Extremophiles and Extremozymes. *Food Technology and Biotechnology* 42: 223-235.
- Gomes SASS y Rebelo MJF. 2003. A new laccase biosensor for polyphenol determination. *Sensors* 3:166-175.
- Goodell B, Yamamoto K, Jellison J, Nakamura M, Fujii T, Takabe K. 1998. Laccase immunolabelling and microanalytical analysis of wood degraded by *Lentinus edodes*. *Holzforschung* 52: 345-350.
- Gu ZY, Weidenhaupt M, Ivanova N, Pavlov M, Xu BZ, Su ZG, Janson, JC. 2002. Chromatographic methods for the isolation of and refolding of proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* 25: 174-179.
- Gunne M y Urlacher VB. 2012. Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* with unusual properties discovered by genome mining. *PLoS One* 12: e52360. doi:10.1371/journal.pone.0052360.
- Gureir M, Akta N, Tanyolaç A. 2005. Influence of reaction conditions on the rate of enzymic polymerization of pyrogallol using laccase. *Process Biochemistry* 40: 175-1182.
- Gutierrez-Sanchez C, Shleev S, De Lacey AL, Pita M. 2014. Third-generation oxygen amperometric biosensor based on *Trametes hirsuta* laccase covalently bound to graphite electrode. *Chemical Papers* 69:237-240.
- Hakulinen N, Kiiskinen L-L, Kruus K, Saloheimo M, Paananen A, Koivula A, Rouvinen J. 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural & Molecular Biology* 9: 601-605.
- Halpin C, Barakate A, Abbott J. 1999. Arabidopsis laccases. *Journal of Experimental Botany* 50S: 36.
- Hao OJ, Kim H, Chang PC. 2000. Decolorization of wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 30: 449-505.
- Harris ZL., Davis-Kaplan SR, Gitlin JD, Kaplan J. 2004. A fungal multicopper oxidase restores iron homeostasis in aceruloplasminemia. *Blood* 103: 4672-4673.
- Hattori M, Tsuchihara K, Noda H, Konishi H, Tamura Y, Shinoda T, Nakamura M, Hasegawa T. 2010. Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 331-338.
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T. 1998. Characterization of Laccases and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family Coprinaceae). *Applied Environmental and Microbiology* 64: 1601-1606
- Hermann TE, Kurtz MB, Champe SP. 1983. Laccase localized in Hulle cells and cleistothecial primordial of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 154: 955-964.

- Hernández M, Hernández-Coronado MJ, Montiel MD, Rodríguez J, Arias ME. 2001. Analysis of alkali-lignin in a paper mill effluent decolourised with two *Streptomyces* strains by gas chromatography-mass spectrometry after cupric oxide degradation. *Journal of Chromatography A* 919: 389-394.
- Hernández-Romero D, Solano F, Sánchez-Amat A. 2005. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Applied Environmental Microbiology* 71: 6808-6815.
- Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kues U. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* 273: 2308-2326.
- Hofer M. y Schlosser D. 1999. Novel enzymatic oxidation of  $Mn^{+2}$  to  $Mn^{+3}$  catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Letters* 451: 186-190.
- Holker U, Dohse J, Hofer M. 2002. Extracellular laccase in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiologica* 47: 423-427.
- Hoopes JT y Dean JFD. 2004. Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera* *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 27-33.
- Hu MR, Chao YP, Zhang GQ, Xue ZQ, Qian SJ. 2009. Laccase-mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 45-51.
- Huang J, Fang J, Liu C, Gu E, Jiang D. 2008. A Novel Fiber Optic Biosensor for the Determination of Adrenaline Based on Immobilized Laccase Catalysis. *Analytical Letters* 41: 1430-1442.
- Hullo MF, Moszer I, Danchin A, Martin-Verstraete I. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of Bacteriology* 183: 5426-5430.
- Iamarino G, Rao MA, Gianfreda L. 2009. Dephenolization and detoxification of olive-mill wastewater (OMW) by purified biotic and abiotic oxidative catalysts. *Chemosphere* 74: 216-223.
- Ibarra D, Romero J, Martínez MJ, Martínez AT, Camarero S. 2006. Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalyptus pulp by laccase-mediator. *Enzyme Microbial Technology* 39: 1319-1327.
- Ibarra D, Chávez MI, Rencoret J, del Río JC, Gutiérrez A, Romero J, Camarero S, Martínez MJ, Jiménez Barbero J, Martínez AT. 2007. Structural modification of eucalypt pulp lignin in a totally chlorine free bleaching sequence including a laccase-mediator stage. *Holzforschung* 61:643-646.
- Ikeda R, Tanaka H, Oyabu H, Uyama H, Kobayashi S. 2001. Preparation of artificial urushi via an environmentally benign process. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 74: 1067-1073.
- Ikeda R, Tanaka H, Uyama H, Kobayashi S. 1998. Laccase-catalyzed polymerization of acrylamide. *Macromolecular Rapid Communications* 19: 423-425.
- Isono Y y Hoshino M, 1989. Laccase-like activity of nucleoside oxidase in the presence of nucleosides. *Agricultural and Biological Chemistry* 53: 2197-2203.
- Jarosz-Wilkolazka A, Ruzgas T y Gorton L. 2004. Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 238-241.

- Jarosz-Wilkolazka A, Ruzgas T, Gorton L. 2005. Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. *Talanta* 66: 1219-1224.
- Johannes C y Majcherczyk A. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 524-528.
- Kalme S, Jadhav S, Jadhav M, Govindwar S. 2009. Textile dye degrading laccase from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. *Enzyme Microbial Technology* 44: 65
- Karamyshev AV, Shleev SV, Koroleva OV, Yaropolov AI, Sakharov IY. 2003. Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 556-564.
- Kasana RC. 2010. Proteases from psychrotrophs: an overview. *Critical reviews in microbiology* 36: 134-45.
- Keilin D y Mann T. 1939. Laccase, a blue copper-protein oxidase from the latex of *Rhus succedanea*. *Nature*: 143: 23-24.
- Kiefer-Meyer MC, Gomord V, O'Connell A, Halpin C, Faye L. 1996. Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco. *Gene* 178: 205-207.
- Kim C, Lorenz WW, Hoopes T, Dean J. 2001. Oxidation of siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* *yacK* gene. *Journal of Bacteriology* 183: 4866-4875.
- Koschorreck K, Richter SM, Ene AB, Roduner E, Schmid RD, Urlacher VB. 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Applied Microbiological Biotechnology* 79: 217-224.
- Kosman DJ. 2010. Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 15: 15-28.
- Kuddus M, Joseph B, Ramteke PW, 2013. Production of laccase from newly isolated *Pseudomonas putida* and its application in bioremediation of synthetic dyes and industrial effluents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2: 333-338.
- Kumar L, Awasthi G, Singh B. 2011. Extremophiles a novel source of industrially important enzymes. *Biotechnology* 10: 121-135.
- Kurtz MB y Champe SP. 1982. Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 151: 1338-1345.
- LaFayette P, Eriksson KE, Dean JF. 1999. Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). *Plant Molecular Biology* 40: 23-35.
- Lang G y Cotteret J. 1999. Hair dye composition containing a laccase. (L'Oreal, Fr.). International Patent Application, WO9936036.
- Lantto R, Schänberg C, Buchert J. 2004. Effects of laccase-mediator combination on wool. *Textile Reserch Journal* 74: 713-717.
- Larrondo LF, Salas L, Melo F, Vicuña R, Cullen D. 2003. A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6257-6263.
- Law DJ y Timberlake WE. 1980. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 144: 509-517.

- Leatham GF y Stahmann MA. 1981. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *Journal of General Microbiology* 125: 147-157.
- Lee SM, Grass G, Rensing C, Barrett SR, Yates CJ, Stoyanov JV, Brown NL. 2002. The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295: 616-620.
- Lee Y, Hendson M, Panopoulos NJ, Schroth MN. 1994. Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small copper proteins and multicopper oxidases. *Journal of Bacteriology* 176: 173-188.
- Leech D y Daigle F. 1998. Optimisation of a reagentless laccase electrode for the detection of the inhibitor azide. *Analyst* 123: 1971-1974.
- Leech K y Feerick O. 2000. Biosensor Warning Devices: Reagentless Detection of Modulators of Laccase Activity. *Electroanalysis* 12: 1339-1342.
- Leontievsky A, Myasoedova NM, Baskunov BP, Golovleva LA, Bucke C, Evans CS. 2001. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 85-91.
- Leontievsky A, Vares T, Lankinen P, Shergill JK, Pozdnyakova NN, Myasoedova NM, Kalkkinen N, Golovleva LA, Cammack R, Thurston CF, Hatakka A. 1997. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiology Letters* 156: 9-14.
- Litescu SC, Eremia SAV, Bertoli A, Pistelli L, Radu GL. 2010. Laccase-Nafion Based Biosensor for the Determination of Polyphenolic Secondary Metabolites. *Analytical Letters* 43: 7-8.
- Liu L, Dean JFD, Friedman WE, Eriksson KEL. 1994. A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin synthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. *Plant Journal* 6: 213-224.
- Loera O, Perez I, Barbosa J y Villaseñor F. 2006. Laccases. En: Guevara-Gonzalez R.G. y Torres-Pacheco I. (Eds.), *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Kerala, India, pp: 323-340.
- Lorenzo M, Moldes D, Couto SR y Sanroman MA. 2005. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere* 60: 1124-1128.
- MacElroy R. 1974. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems* 6: 74-75.
- Machczynski MC, Vijgenboom E, Samyn B, Canters GW. 2004. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science* 13: 2388-2397.
- Madhavi V y Lele SS. 2009. Laccase: properties and applications. *BioResources* 4: 1694-1717.
- Madigan M y Mairs B. 1997. Extremophiles. *Scientific American*. 276: 66-71
- Madigan M y Martinko M. 2006. Environmental effects on microbial growth: temperature. En: *Brock Biology of Microorganisms*. 11th ed. pp. 150-154. Pearson Prentice Hall.
- Madigan M y Oren A. 1999. Thermophilic and halophilic extremophiles. *Ecology and Industrial Microbiology* 2:265-269.
- Mai C, Majcherczyk A y Huttermann A. 2000. Chemo-enzymatic synthesis and characterization of graft copolymers from lignin and acrylic compounds. *Enzyme Microbiology Technology* 27: 167-175.

- Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Blánquez P, Vicent T, Caminal G. 2010. Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. *Bioresource Technology* 101: 2159-2166.
- Margesin R y Miteva V. 2011. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in microbiology* 162: 346-61.
- Margesin R, Feller G, Gerday C, Russell N. 2002. Cold-Adapted Microorganisms: Adaptation Strategies and Biotechnological Potential. En: G. Bitton (Ed.), *The Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Vol. 2. John Wiley & Sons, New York pp. 871-885.
- Margesin R, Neuner G, Storey K. 2007. Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects. *Die Naturwissenschaften* 94: 77-99.
- Martinez AT, Camarero S, Guillen F, Gutiérrez A, Muñoz C, Varela E, Martínez MJ, Barrasa JM, Ruel K, Pelayo JM. 1994. Progress in biopulping of non-woody materials: Chemicals, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat straw delignification with ligninolytic fungi from genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 265-273.
- Martinez-Rosales C, Castro-Sowinski S. 2011. Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but with activity and stability at high temperature. *Polar Research* 30: 7123.
- Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, Henriques AO. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biologic Chemistry*. 277: 18849-18859.
- Marx JC, Collins T, D'Amico S, Feller G, Gerday C. 2007. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms. *Marine biotechnology* 9: 293-304.
- Mathiasen TE y Petersen BR. 1996. Deoxygenation of a food item using a laccase. Google Patents. Tomado de <https://www.google.com/patents/WO1996031133A1?cl=en22>.
- Mayer AM, Staples RC. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem* 60: 551-565.
- McMahon AM, Doyle EM, Brooks S, O'Connor KE. 2007. Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1435-1441
- Mendonça RT, Jara JF, González V, Elissetche JP, Freer J. 2008. Evaluation of the whiterot fungi *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispota* in biotechnological applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35: 1323-1330.
- Mikolasch A, Niedermeyer TH, Lalk M, Witt S, Seefeldt S, Hammer E, Schauer F, Gesell M, Hessel S, Julich WD y Lindequist U. 2006. Novel penicillins synthesized by biotransformation using laccase from *Trametes* species. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 54: 632-638.
- Min KL, Kim YH, Kim YW, Jung HS y Hah YC. 2001. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 392: 279-286.
- Minussi RC, Miranda MA, Silva JA, Ferreira CV, Aoyama H, Marangoni S, Rotilio D, Pastore GM, Durán N. 2007. Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *African Journal of Biotechnology* 6: 1248-1254.

- Minussi RC, Pastore GM, Duran N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 13: 205–216.
- Miyazaki K. 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 9:415–425
- Molina-Guijarro JM, Pérez J, Muñoz-Dorado J, Guillén F, Moya R, Hernández M, Arias ME. 2009. Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. *International Microbiology* 12: 13–21.
- Montealeali MR, Della Seta L, Vastarella W, Pilloton R. 2010. A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64: 189–194.
- More SS, Renuka P S, Pruthvi K, Swetha M, Malini S, Veena S. 2011. Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme Research* 248735. doi:10.4061/2011/248735.
- Morgan-kiss R, Priscu J, Pocock T, Gudynaite-savitch L, Huner N. 2006. Adaptation and Acclimation of Photosynthetic Microorganisms to Permanently Cold Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 222-252.
- Mousty C, Vieille L, Cosnie S. 2007. Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: A reagentless amperometric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 22: 1733–1738.
- Murugesan K, Chang Y, Kim Y, Jong-Rok J, Kim EJ, Chang YS. 2010. Enhanced transformation of triclosan by laccase in the presence of redox mediators. *Water Research* 44: 298-308.
- Mustafa R, Muniglia L, Rovel B, Girardin M. 2005. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydroorganic biphasic system. *Food Research International* 38: 995-1000.
- Nagai M, Kawata M, Watanabe H, Ogawa M, Saito K, Takesawa T, Kanda K, Sato T. 2003. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: Purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology* 149: 2455–2462.
- Nakamura K y Go N. 2005. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell Molecular Life Science* 62: 2050-2066.
- Ng IS, Zhang X, Zhang Y, Lu Y. 2013. Molecular Cloning and Heterologous Expression of Laccase from *Aeromonas hydrophila* NIU01 in *Escherichia coli* with Parameters Optimization in Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169:2223–2235
- Nicotra S, Cramarossa MR, Mucci A, Pagnoni UM, Riva S, Forti L. 2004. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron* 60: 595-600.
- Niehaus F, Bertoldo C, Kaehler M, Antranikian G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology Biotechnology* 51: 711-729.
- Niku PM y Viikari L. 2000. Enzymatic oxidation of alkenes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10: 435-444.
- Novy R y Morris B. 2001. Use of glucose to control basal expression in the pET system innovations *BioTechniques* 12: 1–3.

- Odaci D, Timur S, Pazarlioglu N, Kirgöz UA, Telefoncu A. 2006. Effects of mediators on the laccase biosensor response in paracetamol detection. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 45: 23–28.
- Ohga S, Cho NS, Thurston CF, Wood DA. 2000. Transcriptional regulation of laccase and cellulase in relation to fruit body formation in the mycelium of *Lentinula edodes* on a sawdust-based substrate. *Mycoscience* 41: 149–153.
- Okazaki M, Sugita T, Shimizu M, Ohode Y, Iwamoto K, deVrinddeJong EW, deVrind JPM, Corstjens P. 1997. Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1. *Applied Environmental Microbiology* 63: 4793–4799.
- O'Malley DM, Whetten R, Bao W, Chen CL, Sederoff RR. 1993. The role of of laccase in lignification. *Plant Journal* 4: 751–757.
- Oshima R, Yamauchi Y, Watanabe C, Kumanotani J. 1985. Enzymic oxidative coupling of urushiol in sap of the lac tree, *Rhus vernicifera*. *Journal of Organic Chemistry* 50: 2613–2621.
- Outten FW, Huffman DL, Hale JA, O'Halloran TV. 2001. The independent cue and cusSystems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 30670–30677.
- Palmer AE, Lee SK, Solomon EI. 2001. Decay of the peroxide intermediate in laccase: Reductive cleavage of the O-O bond. *Journal of the American Chemical Society* 123: 6591–6599.
- Palmer T y Berks BC. 2012. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nature Reviews Microbiology* 10: 483–96.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 31301–31307.
- Palmore GT y Kim HH. 1999. Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 565: 110–7.
- Park HJ, Shin SC, Kim D. 2013. Draft genome sequence of a subarctic humic substance-degrading pseudomonad. *Genome Announc* 1: (1):e00070-12. doi:10.1128/genomeA.00070-12.
- Pazarlioglu NK, Sariik M, Telefoncu A. 2005. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry* 40: 1673–1678.
- Pereira L, Bastos C, Tzanov T, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM. 2005. Environmentally friendly bleaching of cotton using laccases. *Environmental Chemistry Letters* 3: 66–69.
- Piacquadio P, De Stefano G, Sammartino M, Sciancalepore V. 1998. Apple juice stabilization by laccase immobilized on metal chelate regenerable carriers. *Industria delle Bevande* 27: 378–383.
- Pilz R, Hammer E, Schauer F, Krag U. 2003. Laccase-catalyzed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. *Applied Microbiology Biotechnology* 60: 708–712.
- Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V y Giovanni S. 2010. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioengineered Bugs* 1: 252–262.
- Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by white -rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20–33.

- Pourcel L, Routaboul JM, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L, Debeaujon I. 2005. Transparent testa10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell* 17: 2966-2980.
- Pulicherla K, Ghosh M, Kumar P, Rao K. 2011. Psychrozymes- The Next Generation Industrial Enzymes. *Journal of Marine Science: Research & Development* 1: 1-7.
- Qu J, Lou T, Wang Y, Dong Y, Xing H. 2015. Determination of Catechol by a Novel Laccase Biosensor Based on Zinc-Oxide Sol-Gel. *Analytical Letters* 48: 1842- 1853.
- Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, Jauneau A, Boudet AM, Goffner D. 2002. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiology* 129: 145-155.
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes-Macheteau M, Boudet AM, Goffner D. 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - a divergent gene family - in poplar. *European Journal of Biochemistry* 259: 485-495.
- Regalado V, Perestelo F, Rodríguez A, Carnicero A, Sosa FJ, de la Fuente G y Falcón MA. 1999. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 388-390.
- Rensing C y Grass G. 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 197-213.
- Richardson A. y McDougall GJ. 1997. A laccase-type polyphenol oxidase from lignifying xylem of tobacco. *Phytochemistry* 44: 229-235.
- Riva S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology* 24: 219-226.
- Roberts SA, Weichsel A, Grass G, Thakali K, Hazzard JT, Tollin G, Rensing C, Montfort WR. 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 99: 2766-2771
- Rodríguez A, Falcon MA, Carnicero A, Perestlo F, Fuent GD, Trojanowski J. 1996. Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 399-403.
- Rodríguez D y Tiedje J. 2008. Coping with our cold planet. *Applied and environmental microbiology* 74: 1677-86.
- Rodríguez-Couto S y Toca-Herrera JL. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 24: 500-513.
- Rosconi F, Franco L, Martinez-Drets G, Castro-Sowinski S. 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 800-807.
- Rothschild L y Manicynelli R. 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409: 1092-1101.
- Roy JJ, Abraham TE, Abhijith KS, Kumar PV, Thakur MS. 2005. Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. *Biosens Bioelectron* 21: 206-211.
- Ruijsenaars HJ y Hartmans S. 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 177-182.



- Ryan S, Schnitzhofer W, Tranov T. 2003. An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolorization. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 766–774.
- Sambrook MD, Maniatis T, Frisch EF. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sampedro I, Cajthaml T, Marinari S, Petruccioli M, Grego S, D'Annibale A. 2009. Organic matter transformation and detoxification in dry olive mill residue by the saprophytic fungus *Paecilomyces farinosus*. *Process Biochemistry* 44: 216–225.
- Sánchez-Sutil MC, Gómez-Santos N, Moraleda-Muñoz A, Martins LO, Pérez J, Muñoz-Dorado J. 2007. Differential expression of the three multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology* 189: 4887–98.
- Santhanam N, Vivanco JM, Decker SR, Reardon K. 2011. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends in Biotechnology* 29:480–489.
- Santini CL, Ize B, Chanal A, Muller M, Giordano G, Wu LF. 1998. A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO Journal* 17: 101– 12.
- Sato Y, Wuli B, Sederoff R, Whetten R. 2001. Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Journal of Plant Research* 114: 147–155.
- Satyanarayana T, Chandralata R, Shivaji S. 2005. Extremophilic microbes diversity and perspectives. *Current Science* 89: 78 - 90.
- Scheel T, Holker U, Ludwig S, Hofer M. 1999. Evidence for and expression of a laccase gene in three basidiomycetes degrading humic acids. *Applied Microbiology Biotechnology* 52: 66–69.
- Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K. 2006. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat dough. *Journal of Cereal Science* 43: 152– 159.
- Selvam K, Swaminathan K, Rasappan K, Rajendran R, Michael A, Pattabi S. 2005. Deinking of waste papers by white rot fungi *Fomes lividus*, *Thelephora* sp. and *Trametes versicolor*. *Nature Environment and Pollution Technology* 4: 399–404.
- Servili M, DeStefano G, Piacquadio P, Sciancalepore V. 2000. A novel method for removing phenols from grape must. *American Journal of Enology and Viticulture* 51: 357–361.
- Setti L, Giuliani S, Spinozzi G, Pifferi PG. 1999. Laccase catalyzed oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme Microbiology Technology* 25: 285–289.
- Sezgintürk MK, Odaci D, Pazarlioglu N, Pilloton R, Dinckaya E, Telefoncu A y Timur S. 2010. Construction and comparison of *Trametes versicolor* laccase biosensors capable of detecting xenobiotics. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology* 38: 192–199.
- Sigoillot C, Camarero S, Vidal T, Record E, Asther M, Pérez-Boada M, Martínez MJ, Sigoillot JC, Asther M, Colom JF, Martínez AT. 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology* 115: 333–343.
- Sitthisak S, Howieson K, Amezola C, Jayaswal RK. 2005. Characterization of a multicopper oxidase gene from *Staphylococcus aureus*. *Applied Environmental Microbiology* 71: 5650–5653.
- Sharma KK y Kuhad RC. 2009. An evidence of laccases in archaea. *Indian Journal of Microbiology* 49: 142–150.

- Sharma P, Goel R, Capalash N. 2007. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 823-832.
- Shervedani RK y Amini A. 2012. Direct electrochemistry of dopamine on gold—*Agaricus bisporus* laccase enzyme electrode: Characterization and quantitative detection. *Bioelectrochemistry* 84: 25-31.
- Shleev S, Persson P, Shumakovich G, Mazhugo Y, Yaropolov A, Ruzgas T, Gorton L. 2006. Laccase-based biosensors for monitoring lignin. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 835-840.
- Shleev SV, Khan IG, Morozova OV, Mazhugo YM, Khalunina AS, Yaropolov AI. 2004. Phenylpyrazolones, novel oxidoreductase redox mediators for degradation of xenobiotics. *Applied Biochemistry. Microbiology* 40: 140-145.
- Singh G, Bhalla A, Kaur P, Capalash N, Sharma P. 2011. Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 10: 309-326.
- Singhal A, Choudhary G, Thakur IS. 2012. Characterization of laccase activity produced by *Cryptococcus albidus*. *Prep Biochem Biotechnol.* 42: 113-24.
- Slomczynski D, Nakas JP, Tanenbaum SW. 1995. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 907-912.
- Solomon EI, Augustine AJ, Yoon J. 2008. O<sub>2</sub> reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases. *Dalton Trans* 14: 3921-3932.
- Solomon EI, Chen P, Metz M, Lee SK, Palmer AE. 2001. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angewandte Chemie International Edition in English* 40: 4570-4590.
- Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96: 2563-2606
- Sondhi S, Sharma P, Saini S, Puri N, Gupta N. 2014. Purification and Characterization of an Extracellular, Thermo-Alkali-Stable, Metal Tolerant Laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. *PLoS ONE* 9: e96951 doi: 10.1371/journal.pone.0096951.
- Srebotnik E y Hammel KE. 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *Journal of Biotechnology* 81: 179-188.
- Srong PJ y Claus H. 2011. Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41:373-434.
- Stanley NR, Palmer T, Berks BC. 2000. The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec independent protein targeting in *Escherichia coli*. *Journal of Biology Chemistry.* 275: 11591- 6.
- Sterjiades R, Dean JF, Eriksson KEL. 1992. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiology* 99: 1162-1168
- Strong PJ y Burgess JE. 2008. Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters: A review. *Bioremediation Journal* 12: 70-87.
- Studier FW. 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of molecular biology* 219: 37-44.

- Sugareva V, Härtl A, Brock M, Hübner K, Rohde M, Heinekamp T, Brakhage A. 2006. Characterisation of the laccase-encoding gene *abr2* of the dihydroxynaphthalene-like melanin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *Archives of Microbiology* 186: 345–355.
- Sugumaran M, Giglio L, Kundzicz H, Saul S, Semensi V. 1992. Studies on the enzyme involved in puparial cuticle sclerotization in *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 19:271-283.
- 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
- Szamocki R, Flexer V, Levinb L, Forchiasinb F, Calvoa EJ. 2009. Oxygen cathode based on a layer-by-layer self-assembled laccase and osmium redox mediator. *Electrochimica Acta* 54:1970–1977.
- Szeponik J, Möller B, Pfeiffer D, Lisdat F, Wollenberger U, Makower A, Scheller FW. 1997. Ultrasensitive bienzyme sensor for adrenaline. *Biosensors and Bioelectronics* 12: 947-952.
- Takami H, Takaki Y, Uchiyama I. 2002. Genome sequence of *Oceanobacillus iheyensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments. *Nucleic Acids Research* 30: 3927-3935.
- Takemori T, Ito Y, Ito M y Yoshama M. 1992. Flavor an taste improvement of cacao nib by enzymatic treatment. JP 04126037 to Lotte Co, Ltd.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729
- Temp U y Eggert C. 1999. Novel interaction between laccase and collobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungi *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 389–395.
- Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics* 16: 121-131.
- Thomas BR, Yonekura M, Morgan TD, Czaplá TH, Hopkins TL, Kramer KJ. 1989. A trypsin-solubilized laccase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry* 19:611-622
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19-26.
- Tzanov T, Basto C, Gübitz GM, Cavaco-Paulo A. 2003. Laccases to Improve the Whiteness in a Conventional Bleaching of Cotton. *Macromolecular Materials and Engineering* 288: 807-810.
- Uthandi S, Prunetti L, De Vera IMS, Fanucci GE, Angerhofer A, Maupin-Furlow JA. 2012. Enhanced archaeal laccase production in recombinant *Escherichia coli* by modification of N-terminal propeptide and twin arginine translocation motifs. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 39:1523-1532.
- Uthandi S, Saad B, Humbard MA y Maupin-Furlow JA. 2010. LccA, an archaeal laccase secreted as a highly stable glycoprotein into the extracellular medium by *Haloferax volcanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 733-743.
- Uyama H y Kobayashi S. 2002. Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 785: 1-11.
- Van der Burg B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology* 6: 213-218.

- Van Waasbergen LG, Hildebrand M, Tebo BM. 1996. Identification and characterization of a gene cluster involved in manganese oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *Journal of Bacteriology* 178: 3517-3530.
- Vares, T., Kalsi, M. y Hatakka, A. 1995. Lignin peroxidase, manganese peroxidase and other
- Viterbo A, Staples RC, Yagen B, Mayer AM. 1994. Selective mode of action of cucurbitacin in the inhibition of laccase formation in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 35: 1137-1142.
- Wahleithner JA, Xu F, Brown KM, Brown SH, Golightly EJ, Halkier T, Kauppinen S, Pederson A, Schneider P. 1996. The identification and characterization of four laccase from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 29: 395-403.
- Walker JRL. 1968. Studies on the diphenol oxidase of the phytopathogenic fungus *Glomerella cingulata*: inhibition by quaternary ammonium compounds. *Phytochemistry* 7: 1231-1240.
- Wang GD, Li QJ, Luo B, Chen XY. 2004. Ex planta phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase. *Nature biotechnology* 22: 893-897.
- Wang HX y Ng TB. 2004. Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315: 450-454.
- Waterman SR, Hacham M, Panepinto J, Hu G, Shin S, Williamson PR. 2007. Cell wall targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mice. *Infection and Immunity* 75: 714-722.
- Widsten P y Kandelbauer A. 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 42: 293-307.
- Wiethaus J, Wildner GF, Masepohl B. 2006. The multicopper oxidase CutO confers copper tolerance to *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiology Letters* 256: 67-74.
- Williamson PR, Wakamatsu K, Ito S. 1998. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology* 180: 1570-1572.
- Wood D. 1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *Journal of General Microbiology* 117: 327-338.
- Worrall JJ, Chet I, Hüttermann A. 1986. Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* spp. *Journal of General Microbiology* 132: 2527-2533.
- Wu Y, Ren C, Gao Y, Hou B, Chen T, Zhang C. 2010. A novel method for promoting heterologous protein expression in *Escherichia coli* by fusion with the HIV-1 TAT core domain. *Amino Acids* 39: 811-20.
- Xu F. 1996. Catalysis of novel enzymatic iodide oxidation by fungal laccase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 59: 221-230.
- Xu F. 2005. Applications of oxidoreductases: recent progress. *Industrial Biotechnology* 1: 38-50.
- Xu, F. 1999. Laccase. En Flickinger MC y Drew SW (Eds.), *The encyclopedia of bioprocessing technology: Fermentation, biocatalysis and bioseparation* (pp. 1545-1554). Wiley, New York, USA
- Yahr TL, Wickner WT. 2001. Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro. *EMBO Journal* 20: 2472- 9.

- Yamak O, Kalkan N, Aksoy S, Altinok H, Hasirci N. 2009. Semi-interpenetrating polymer networks (semi-IPNs) for entrapment of laccase and their use in Acid Orange 52 decolorization. *Process Biochemistry* 44: 440-445.
- Yamazaki H. 1969. The cuticular phenoloxidase in *Drosophila virilis*. *Journal of Insect Physiology* 15: 2203-2211.
- Yamazaki H. 1972. Cuticular phenoloxidase from the silkworm, *Bombyx mori*: properties, solubilization, and purification. *Insect Biochemistry* 2: 431-444.
- Yaropolov AI, Skorobogat'ko OV, Vartanov SS, Varfolomeyev SD. 1994. Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 49: 257-80.
- Yasuda M, Murakami Y, Sowa A, Ogino H, Ishikawa H. 1998. Effect of additives on refolding of denatured protein. *Biotechnology Progress* 14: 601-6.
- Ye M, Li G, Liang WQ, Liu YH. 2010. Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived multicopper oxidase with alkaline laccase activity and highly soluble expression. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 1023-1031.
- Yoon MY. 1998. Process for improved shrink resistance in wool. WO patent 98/27264.
- Yoshida H. 1883. Chemistry of Lacquer (Urushi) Part 1. *Journal of the Chemical Society* 43: 472-486.
- Yoshitake A, Katayama Y, Nakamura M, Iimura Y, Kawai S Y Morohoshi N. 1993. N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *Journal of General Microbiology* 139: 179-185.
- Zhao W, Wang K, Wei Y, Ma Y, Liu L, Huang X. 2014. Laccase biosensor based on phytic acid modification of nanostructured SiO<sub>2</sub> surface for sensitive detection of dopamine. *Langmuir* 30: 11131-11137.