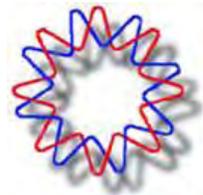




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

**Estudio del efecto de cobre y lignina en la
producción y la transcripción de lacasas por
Pleurotus ostreatus CP50**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO
DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

IBQ. Claudia Vianney Yañez Ñeco

TUTOR DE TESIS: Dr. Leobardo Serrano Carreón



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Leobardo Serrano Carreón.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN 210911.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Leobardo Serrano por su compromiso, apoyo, confianza y asesoría durante la realización del proyecto.

Al Dr. Enrique Galindo, por darme la oportunidad de desarrollarme dentro de su grupo de investigación.

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Marcela Ayala Aceves, por sus comentarios y aportaciones.

Dra. Clarita Olvera Carranza, por su apoyo y contribución que permitieron el desarrollo de éste trabajo.

A los integrantes del jurado:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Dra. Cinthia Ernestina Nuñez López

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Gracias a todos por sus comentarios y aportaciones durante la revisión de la tesis.

A la Dra. Noemí Flores Mejía, por el apoyo técnico y asesoría para el montaje y realización de la metodología de qPCR.

M.B. Jose Raunel Tinoco Valencia, por su apoyo y enseñanza que me permitieron desarrollar éste proyecto.

M. en C. Celia Flores Ocampo y a Dra. Ma. Soledad Córdova Aguilar por su apoyo técnico brindado en el laboratorio.

A todo el personal de la Planta Piloto por todo el apoyo técnico proporcionado.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio, por su apoyo y los buenos momentos compartidos.

INDICE GENERAL

RESUMEN	I
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LAS LACASAS	3
2.2 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES CATALÍTICAS DE LAS LACASAS	5
2.2.1 Estructura molecular	6
2.2.2 Potencial Redox	8
2.2.3 Mecanismo catalítico.....	9
2.3 APLICACIONES.	11
2.4 PRODUCCIÓN DE LACASAS POR HONGOS	12
2.4.1 Hongos productores de lacasas	12
2.4.2 Secuencias de lacasas fúngicas.....	14
2.4.3 Familias de genes de lacasa.....	15
2.5 INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LACASAS EN HONGOS.	17
2.5.1 Inducción por metales.....	18
2.5.2 Inducción por compuestos aromáticos.	21
2.5.3 Análisis de la región promotora de los genes de lacasa	22
2.6 ANTECEDENTES EN EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN	25
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	- 27 -
3.1 HIPÓTESIS.....	- 27 -
3.2 OBJETIVOS.....	- 27 -
3.2.1 General	- 27 -
3.2.2 Particulares.....	- 27 -
4 MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 MICROORGANISMO.	28
4.2 CULTIVO DE <i>P. OSTREATUS</i> CP50 EN MATRACES.....	28
4.2.1 Precultivo	28
4.2.2 Inóculo	28
4.2.3 Medio de cultivo	29
4.2.4 Condiciones de cultivo	29
4.3 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA.	29
4.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE LACASA.....	30
4.5 ZIMOGRAMAS (ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NATIVAS).....	30
4.6 CÁLCULO DE LA PRODUCTIVIDAD ESPECÍFICA	31
4.7 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y SÍNTESIS DE ADNC	32
4.8 IDENTIFICACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LACASA PRODUCIDAS EN CONDICIONES DE INDUCCIÓN	33
4.8.1 Diseño de oligonucleótidos generales para lacasas	33
4.8.2 Amplificación del ADNc por PCR	34
4.8.3 Clonación de los fragmentos obtenidos de la amplificación por PCR.	34
4.9 ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL	35
4.9.1 Diseño experimental factorial 2 ³	35
4.9.2 Diseño de oligonucleótidos.....	36
4.9.3 Desarrollo de la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)..	37
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
5.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE LACASA DE <i>P. OSTREATUS</i> EN MEDIO DE PRODUCCIÓN	40
5.2 PRODUCCIÓN DE LACASA EN CONDICIONES DE INDUCCIÓN	41

5.2.1	<i>Efecto de diferentes concentraciones de CuSO₄ en la síntesis de lacasa</i>	41
5.2.2	<i>Efecto de la adición de CuSO₄ y lignina en la síntesis de lacasas.</i>	45
5.3	PERFIL DE ISOENZIMAS	46
5.4	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL ADNC QUE CODIFICA PARA LAS LACASAS PRODUCIDAS EN CONDICIONES DE INDUCCIÓN.....	48
5.5	DESARROLLO DEL MÉTODO PARA REALIZAR EL ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL	50
5.5.1	<i>Extracción y calidad de ARN</i>	50
5.5.2	<i>Selección de gen de referencia y calibrador</i>	50
5.5.3	<i>Validación del método</i>	51
5.6	EFFECTO DE LOS INDUCTORES EN LA ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA Y EN LA TRANSCRIPCIÓN DE LACASAS.	53
5.6.1	<i>Actividad volumétrica.</i>	53
5.6.2	<i>Expresión de genes de lacasa</i>	54
6	CONCLUSIONES	62
7	PERSPECTIVAS	63
8	BIBLIOGRAFÍA	64
	APÉNDICE A: CÁLCULOS DEL ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2-1 MONÓMEROS PRIMARIOS DE LA LIGNINA: ALCOHOLES <i>p</i> -HIDROXICINAMÍLICOS.	5
FIGURA 2-2 SITIOS DE COBRE DE LA LACASA (ADAPTADO DE ÉNGUITA ET AL., 2003)	7
FIGURA 2-3 CICLO CATALÍTICO DE LA LACASA (ADAPTADO DE WONG, 2009)	10
FIGURA 2-4 COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS CONSENSO DE LACASAS FÚNGICAS.	14
FIGURA 2-5 COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS CONSENSO (L1-L4) DE LAS LACASAS DE <i>P. OSTREATUS</i> (PEZZELLA ET AL., 2009)	15
FIGURA 2-6 COMPARACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS GENES DE LACASA DE <i>P. OSTREATUS</i>	16
FIGURA 2-7 DISTRIBUCIÓN DE LOS ELEMENTOS CIS-ACTING PUTATIVOS EN LAS REGIONES PROMOTORAS DE LOS GENES DE LACASA DE <i>P. OSTREATUS</i>	23
FIGURA 4-1 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UN GEN DE LACASA Y LOS SITIOS DE ALINEAMIENTO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS.	34
FIGURA 5-1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y DE PRODUCCIÓN DE LACASA EN EL MEDIO DE PRODUCCIÓN SIN INDUCTORES.	40
FIGURA 5-2 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CuSO_4 EN LA ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA DE LACASA.....	42
FIGURA 5-3 PRODUCTIVIDAD ESPECÍFICA DE LACASA POST-INDUCCIÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CuSO_4	42
FIGURA 5-4 PRODUCTIVIDAD ESPECÍFICA DE LACASA EN LAS DOS FASES DE CULTIVO.	44
FIGURA 5-5 ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA DE LACASA PRODUCIDA EN MEDIO SUPLEMENTADO CON CuSO_4 Y LIGNINA.	46
FIGURA 5-6 ZIMOGRAMA QUE MUESTRA EL PERFIL DE ISOENZIMAS DE LACASA PRODUCIDAS EN EL CULTIVO CONTROL.	47
FIGURA 5-7 ZIMOGRAMA QUE MUESTRA EL PERFIL DE ISOENZIMAS DE LACASA PRODUCIDAS EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CuSO_4	47
FIGURA 5-8 INTEGRIDAD DE ARNTOTAL	50
FIGURA 5-9 EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN DE LOS TRANSCRITOS.	52
FIGURA 5-10 CURVA DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO $\Delta\Delta\text{Cq}$	53
FIGURA 5-11 ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA CORRESPONDIENTE A LOS TRATAMIENTOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	54

LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1 LISTA DE LACASAS DE BASIDIOMICETOS CUYA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL SE ENCUENTRA DISPONIBLE.	6
TABLA 2.2- INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LACASA EN HONGOS.....	19
TABLA 4.1 COMPOSICIÓN DE LOS GELES DE ACRILAMIDA.	31
TABLA 4.2 OLIGONUCLEÓTIDOS GENERALES PARA LACASAS DE <i>P. OSTREATUS</i>	33
TABLA 4.3 MATRIZ DE DISEÑO FACTORIAL 2 ³	36
TABLA 4.4 OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA EL ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE GENES DE LACASA EN <i>P. OSTREATUS</i> MEDIANTE qPCR.....	37
TABLA 5.1 COMBINACIONES DE OLIGONUCLEÓTIDOS	48
TABLA 5.2 GENES DE LACASA QUE SE EXPRESAN EN LAS CONDICIONES DE INDUCCIÓN	49
TABLA 5.3 EFICIENCIAS DE AMPLIFICACIÓN.....	52
TABLA 5.4 INCIDENCIA DE LOS ELEMENTOS DE RESPUESTA EN LOS GENES DE LACASA ESTUDIADOS.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
ADNc	Acido Desoxirribonucleico complementario
ARE	Aromatic Response Element
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
DMP	2,6 Dimetoxifenol
HAA	Acido 3-hidroxiantranílico
HBT	Hidroxibenzotriazol
MCO	Multicobre Oxidasa
MRE	Metal Responsive Element
mt	Metalotioneínas
PAH's	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
PDB	Protein Data Bank
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
XRE	Xenobiotic Responsive Element

RESUMEN

Debido a que las lacasas (ρ -difenol: oxígeno óxido reductasas EC 1.10.3.2) son enzimas inespecíficas que actúan sobre un amplio rango de sustratos, pueden usarse en una gran variedad de aplicaciones de interés industrial. Con el fin de incrementar la productividad, en los últimos años se ha estudiado el uso de inductores para mejorar la producción de lacasas, la adición de metales pesados como el cobre y compuestos aromáticos relacionados con la lignina permiten aumentar la actividad volumétrica en los cultivos de hongos basidiomicetos. En el presente trabajo se estudió la adición de CuSO_4 y/o lignina como inductores, se analizó su efecto tanto en la actividad volumétrica de lacasa como en el nivel de transcripción de los genes que codifican para las diferentes isoformas que produce *Pleurotus ostreatus*.

El incremento en la actividad volumétrica de lacasa fue proporcional a la concentración de CuSO_4 adicionada (0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM); el cobre en esas concentraciones no es tóxico ya que el crecimiento del hongo no se afectó, logrando un aumento de hasta 12.3 veces en la actividad volumétrica con respecto al control (sin adición de inductores) a las 144 h de cultivo. El efecto de la adición simultánea de CuSO_4 (1.5 mM) y lignina (0.5 g/L) fue aditivo con un aumento de 17 veces. Los resultados obtenidos indican que la adición de sulfato de cobre es una buena estrategia para incrementar la productividad de lacasa en los cultivos de *P. ostreatus* CP50.

Mediante amplificación por PCR usando oligonucleótidos degenerados basados en las secuencias consenso de lacasas para los sitios de unión a cobre, se logró identificar que los genes de lacasa que se expresan en las condiciones de inducción estudiadas son *poxc*, *poxa3* y *pox3*.

A través de un diseño experimental 2^3 se examinó la actividad volumétrica de lacasa y el nivel de expresión de los genes *poxc* y *pox3*. Los transcritos de los genes de lacasa

se evaluaron a diferentes intervalos de tiempo y el gen que codifica para β -tubulina se utilizó como control interno para la cuantificación relativa mediante q-RT-PCR. El análisis transcripcional reveló que el cobre tiene un efecto positivo en la transcripción de *poxc*, mientras que el efecto de la lignina es menor. Por otra parte, la expresión de *pox3* no se afectó por la adición de cobre y/o lignina, permaneciendo constante en todas las condiciones analizadas. Debido a que la expresión del gen *poxa3* es muy baja no fue posible hacer su análisis transcripcional.

El análisis de la secuencia nucleotídica de la región del promotor de los genes *poxc*, *pox3* y *poxa3* muestra la presencia de varios elementos de respuesta MRE, XRE y ARE, los cuales se relacionan con la regulación de su expresión debido a los metales pesados (Cu) y compuestos aromáticos. A pesar de la presencia de 5 MRE y 2 ARE en el promotor del gen *pox3* no se detectó un aumento en los niveles de transcritos debido a la adición de cobre y/o lignina.

1 Introducción

Las lacasas (ρ -difenol: oxígeno óxido reductasas EC 1.10.3.2) son glicoproteínas con peso molecular entre 50 a 130 kDa pertenecientes al grupo de las oxidasas azules de cobre, que catalizan la reducción del O_2 a H_2O usando una gran variedad de compuestos fenólicos como donadores de electrones. Las lacasas son enzimas no específicas y el rango de sustratos a oxidar varía de una lacasa a otra. Por su alta inespecificidad, son de gran importancia biotecnológica debido a que se les ha encontrado aplicaciones en biorremediación de suelos y aguas, industria alimentaria, degradación de colorantes provenientes de la industria textil los cuales son xenobióticos y recalcitrantes, entre otras (Baldrian, 2006).

Las lacasas de hongos ligninolíticos tienen un gran potencial de aplicación en procesos biotecnológicos debido a su facilidad de separación, purificación y producción en biorreactores, lo que facilita su producción a gran escala. La producción extracelular de lacasas por los hongos de pudrición blanca está principalmente asociada a la degradación de lignina y son secretadas en diferentes isoformas dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales.

Además; es posible mejorar significativamente la producción de estas enzimas mediante la adición de diversos compuestos al medio de cultivo que permiten incrementar la actividad volumétrica, entre los cuales destacan el $CuSO_4$ y compuestos aromáticos como xilidina, guaiacol, dimetilfenol, ácido ferúlico, entre otros. En diferentes estudios, se ha observado que la respuesta de los hongos a los diferentes inductores de lacasa es muy variada, el tipo de inductor añadido influye tanto en los niveles de actividad obtenidos como en el perfil de isoenzimas producidas. Recientemente, también se ha reportado que existe una transcripción diferencial de los genes de lacasa en respuesta al mismo inductor en diferentes especies de hongos (Terron et al., 2004).

Pleurotus ostreatus es un hongo basidiomiceto de pudrición blanca capaz de producir al menos doce isoenzimas diferentes de lacasa, algunas de las cuales ya se han purificado y caracterizado: POXC, POXA1w, POXA2, POXA1b, POXB2 POXA3a y POXA3b (Giardina et al; 1996, 1999; Palmieri et al; 1997, 2000, 2003). Palmieri y colaboradores (2000) demostraron que la actividad total de lacasa aumenta cuando el medio de cultivo se suplementa con CuSO_4 y que al menos la producción de algunas isoenzimas (POXA1b, POXA2 y POXC) es altamente estimulada en presencia de cobre. De lo anterior, se ha sugerido que la regulación de la síntesis de diversas isoformas en cultivos adicionados con cobre es a nivel de transcripción génica (Palmieri et al., 2000)

En el grupo de investigación existe el interés de estudiar la producción de lacasa por *P. ostreatus* CP50; recientemente se formuló un medio que permite un eficiente crecimiento del hongo y una mayor actividad de lacasa con respecto al medio de extracto de malta al 2% utilizado anteriormente (Contreras, 2009) (Acevedo, 2009), sin embargo no se ha evaluado el uso de cobre y lignina como inductores en este medio para mejorar la producción de éstas enzimas. De igual forma, también resulta interesante realizar un análisis transcripcional para estudiar la expresión diferencial de los distintos genes de lacasa en dichas condiciones de cultivo.

Por tal motivo, en éste trabajo de investigación se propone estudiar el efecto de la adición de los inductores CuSO_4 y/o lignina en la producción de lacasa y en la expresión de los genes que codifican para las diferentes isoformas de lacasas producidas por *P. ostreatus* CP50.

2 Antecedentes

2.1 Distribución y función biológica de las lacacas

La lacasa es una enzima que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza principalmente en plantas superiores y hongos (Thurston, 1994); aunque también se ha encontrado en algunos insectos y bacterias (Dittmer et al., 2004, Arakane et al., 2005, Claus, 2004). Las lacasas se encuentran en la madera y en las paredes celulares de especies herbáceas. Se ha observado actividad de lacasa en tejidos celulares de *Acer pseudoplatanus*, *Pinus tadea*, *Aesculus parviflora* y *Populus euramericana* (Mayer y Staples, 2002). Desde el descubrimiento de las lacasas (1883) en el árbol japonés de la laca (*Rhus vernicifera*), estas enzimas se han descrito en multitud de hongos y la actividad lacasa está demostrada en más de 60 variedades de hongos pertenecientes a Basidiomicetos, Ascomicetos y Deuteromicetos. La primera lacasa procariótica se describió en *Azospirillum lipoferum* y posteriormente se encontró en bacterias Gram negativas y positivas incluyendo especies de hábitats extremos como *Oceanobacillus iheyensis* o *Aquifex aeolicus*, en bacterias marinas como *Marinomonas mediterranea* o como parte de la endospora de *Bacillus subtilis* (Claus, 2004). También se han descrito algunas polifenol oxidasas que muestran “actividad lacasa” en cutículas de insectos como *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cupreina*, *Manduca sexta* y *Sarcophaga bullata* (Gianfreda et al., 1999).

El rol biológico de las lacasas depende del tipo de organismo, las funciones atribuidas a estas enzimas son muy diversas; en las plantas se han asociado junto con las peroxidasas a la biosíntesis de lignina, respuesta a heridas y desarrollo de frutos, esclerotización de las cutículas de la epidermis de insectos; las lacasas bacterianas juegan un papel importante en la morfogénesis, resistencia a factores físicos en las esporas y en la homeostasis de cobre; en los hongos participan en la morfogénesis, patogénesis, síntesis de pigmentos, esporulación y en la degradación de lignina;

siendo esta última una de las funciones de las lacasas mas estudiada y discutida. (Thurston, 1994, Gianfreda et al., 1999).

La lignina es el polímero aromático más abundante en la Tierra y el segundo compuesto después de la celulosa en contribuir a la biomasa terrestre. Es un componente estructural de todas las plantas vasculares y es extremadamente recalcitrante a la degradación ya que posee una estructura muy compleja derivada del acoplamiento oxidativo de monolignoles (monómeros de lignina y precursores monómicos) y de tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos: *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 2.1). La lignina resiste el ataque de la mayoría de los microorganismos, únicamente los hongos basidiomicetos de pudrición blanca son capaces de degradar la lignina eficientemente logrando su despolimerización y mineralización mediante un sistema extracelular de enzimas y mediadores. Las enzimas ligninolíticas que producen los hongos son: lignina peroxidasa (ligninasa, LiP, EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13), vérsatil peroxidasa (VP; EC 1.11.1.16) y la lacasa (EC 1.10.3.2); aunque existen otras enzimas accesorias que también participan en el proceso de despolimerización como la veratril alcohol oxidasa, la glioxalato oxidasa, celobiosa deshidrogenasa por mencionar algunas (Wong, 2009). El rol de las lacasas en la degradación de lignina es evidente dado que:

- a) Los hongos de pudrición blanca que degradan lignina producen lacasa extracelularmente.
- b) La lignina contiene grupos fenólicos que constituyen los sustratos de la lacasa.

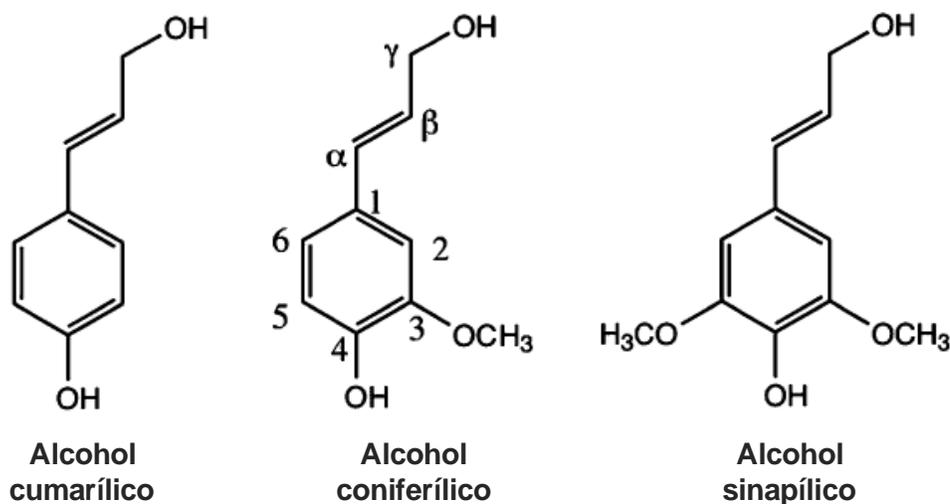


Figura 2-1 Monómeros primarios de la lignina: alcoholes *p*-hidroxicinamílicos.

2.2 Estructura y propiedades catalíticas de las lacasas.

Las lacasas pertenecen al grupo de las oxidasas azules de cobre, catalizan la reducción del O₂ a H₂O usando una gran variedad de compuestos fenólicos como donadores de protones. En las reacciones de oxidorreducción de las lacasas participan cuatro átomos de cobre, cuyos sitios de unión se encuentran ubicados en zonas muy conservadas dentro de la secuencia de aminoácidos (Solomon et al., 1996). El peso molecular de las lacasas varía de aproximadamente 50 a 130 kDa con un punto isoeléctrico alrededor de pH 4.0. También son glicoproteínas cuyo contenido de carbohidratos consiste en manosas, N-acetilglucosamina, y galactosa que constituyen aproximadamente el 45% del peso total en las lacasas provenientes de plantas. Las lacasas fúngicas presentan un porcentaje de glicosilación que comúnmente va del 10 al 25%. Se ha sugerido que la glicosilación ayuda a la estabilidad de la proteína además de proteger a la molécula de proteólisis. Usualmente el pH óptimo de actividad es ácido y la temperatura óptima se encuentra entre 50 y 70° C (Baldrian, 2006, Morozova et al., 2007). La mayoría de las lacasas fúngicas contienen un total de 520-550 aminoácidos, sin incluir el péptido señal de unos 20 residuos en el extremo amino terminal para su secreción extracelular (Thurston, 1994).

2.2.1 Estructura molecular

La resolución estructural por difracción de rayos X de la lacasa bacteriana de *B. subtilis* (Enguita et al., 2003) y de lacasas provenientes de hongos, como *Coprinus cinereus* (Ducros et al., 1998), *Trametes versicolor* (Piontek et al., 2002), *Pycnoporus cinnabarinus* (Antorini et al., 2002), *Melanocarpus albomyces* (Hakulinen et al., 2002), *Rigidoporus lignosus* (Garavaglia et al., 2004) entre otras más, han ayudado a esclarecer la importancia estructural de los sitios de Cu al tiempo que han aportado información relevante sobre la relación estructura-función de este grupo de enzimas. En la tabla 2.1 se registran varias estructuras cristalográficas de lacasas de hongos basidiomicetos que ya han sido reportadas.

Tabla 2.1 Lista de lacasas de basidiomicetos cuya estructura tridimensional se encuentra disponible.

Especie	Nombre	Código PDB	Referencia
<i>Coprinus cinereus</i>	Lac-Cc	1A65	(Ducros et al., 1998)
<i>Trametes versicolor</i> ,	LccI	1GYC	(Piontek et al., 2002)
<i>Trametes versicolor</i> ,	LacIIIb	1KYA	(Bertrand et al., 2002)
<i>Rigidoporus lignosus</i>	RIL	1V10	(Garavaglia et al., 2004)
<i>Lentinus tigrinus</i>	LtL	2QT6	(Ferraroni et al., 2007)
<i>Trametes trogii</i>	TtL	2HRG	(Matera et al., 2008)
<i>Trametes sp. AH28-2</i>	LacB	3KW7	(Ge et al., 2010)

La mayoría de las lacasas son monoméricas, aunque hay reportes de algunas que son oligoméricas. La molécula se organiza formando tres dominios tipo cupredoxina, un

plegamiento característico de las multicobre oxidasas y consiste en una sola cadena en la que cada uno de los tres dominios tiene una topología tipo barril β similar al que presentan las proteínas pequeñas azules de cobre, como la azurina y la plastocianina. El sitio activo está altamente conservado y contiene cuatro sitios de cobre que se han clasificado en tres grupos de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas y cada uno tiene una función específica en la oxidación de los sustratos, siendo un cobre del tipo 1 (T1) y tres cobres que forman el cluster trinuclear (T2/T3) que consiste en un cobre tipo 2 (T2) y dos cobres del tipo 3 (T3) (Figura 2.2). El cobre T1 se encuentra en el dominio 3 mientras que el cluster trinuclear (T2/T3) se localiza entre los dominios 1 y 3 (Zhukhlistova et al., 2008).

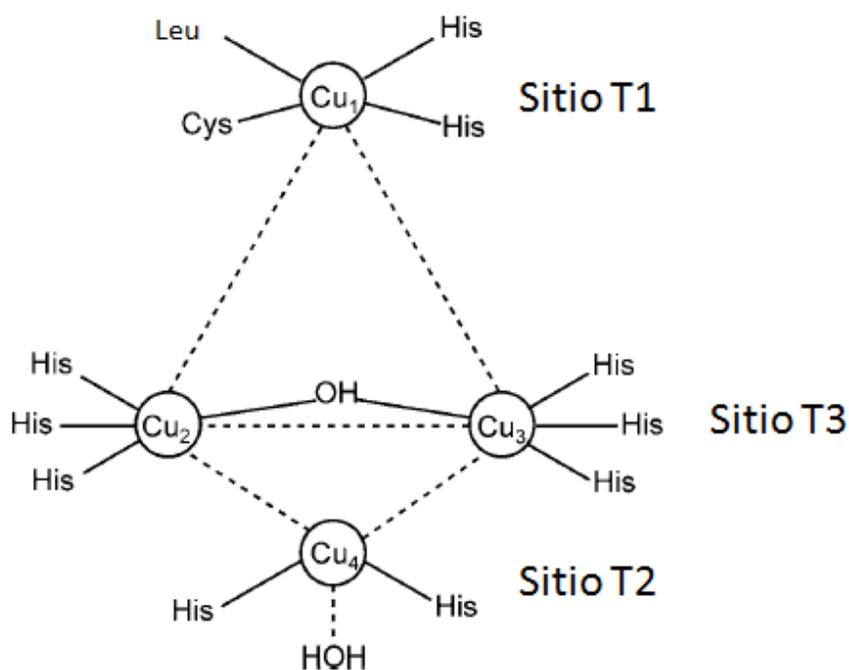


Figura 2-2 Sitios de cobre de la lacasa (adaptado de Enguita et al., 2003)

El cobre del sitio T1 está involucrado en la reacción con el sustrato siendo el aceptor primario de electrones y presenta una λ_{max} a 610 nm dándole a la enzima el color azul característico. El cobre T1 presenta una coordinación trigonal los átomos de N de dos

residuos de His y un átomo de S de un residuo de Cys como ligandos ecuatoriales conservados. En la posición axial un ligando variable que en el caso de bacterias y plantas es una Met, para las lacasas fúngicas puede ser Leu o Phe (ten Have y Teunissen, 2001).

Los cobres de los sitios T2 y T3 se agrupan en forma triangular y participan tanto en la unión y reducción del O₂ como en el almacenamiento de electrones originados a partir de la reducción de sustratos. Se localizan entre los dominios 1 y 3 a unos 12 Å de la superficie. El cobre del sitio T2 está coordinado a dos átomos de N de residuos de His y a un átomo de O como OH⁻, siendo el tercer ligando para formar una configuración coplanar trigonal. Los dos átomos de cobre del sitio T3 se mantienen unidos por un puente hidroxilo y están coordinados por 6 residuos de His (Claus, 2004, Zhukhlistova et al., 2008).

2.2.2 Potencial Redox

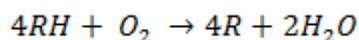
Una característica importante de las lacasas es el potencial redox (E°) de los sitios de cobre (T1, T2 y T3). De hecho, su comportamiento catalítico sobre la mayoría de los sustratos reductores depende del E° en el Cu T1 (aceptor de electrones). Basándose en el potencial redox del sitio T1, las Multicobre Oxidasas (MCO) se dividen en enzimas de alto, medio y bajo potencial redox.

De los datos obtenidos mediante técnicas espectroelectroquímicas (principalmente voltamperometría cíclica y valoraciones redox) haciendo uso de diferentes tipos de electrodos y mediadores redox se sabe que el E° del sitio T1 de las lacasas se encuentra en el rango de valores de 430–780 mV. En general el sitio T1 de las lacasas fúngicas es mucho mayor que el de las lacasas de plantas y otras MCO, sin embargo cabe señalar que también existen marcadas diferencias en los E° del sitio T1 de las diferentes lacasas fúngicas, con valores desde +465 mV de la lacasa de *M. thermophila* hasta +790 mV de la lacasa de *T. hirsuta*.

Se ha demostrado que debido a que el sitio T1 es el aceptor primario de electrones, la actividad catalítica k_{cat}/K_M depende de su potencial redox. De este modo, las lacasas con un mayor E° del sitio T1 son de especial interés en biotecnología debido a que serán capaces de oxidar sustratos de elevado E° como los componentes no fenólicos de la lignina, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), diversos colorantes poliméricos recalcitrantes, etc. (Shleev et al., 2005, Morozova et al., 2007, Zhukhlistova et al., 2008).

2.2.3 Mecanismo catalítico

Las lacasas catalizan la oxidación mono-electrónica de 4 moléculas de sustrato con la consecuente reducción del O_2 a H_2O . La estequiometría de la reacción es cuatro moléculas de sustrato reductor por cada oxígeno molecular, siendo una transferencia total de 4 electrones:



Se ha postulado que la catálisis se realiza en tres pasos principales:

1. El cobre del sitio T1 es reducido al aceptar los electrones del sustrato.
2. Los electrones se transfieren del cobre T1 al cluster trinuclear T2/T3
3. El O_2 activa y se reduce a H_2O en el cluster trinuclear T2/T3.

La oxidación del sustrato reductor genera un radical libre tras la transferencia de un electrón al Cu T1, el cual se encuentra en su estado basal en forma totalmente oxidada (Cu^{+2}). El producto de oxidación inicial es típicamente inestable y es susceptible de una segunda oxidación (por ejemplo convirtiendo un fenol en quinona) o sufrir reacciones no enzimáticas como la hidratación y/o reacciones de polimerización (Messerschmidt et al., 1992, Gianfreda et al., 1999). Cada electrón extraído de cuatro oxidaciones mono-electrónicas en el sitio T1 es transferido intramolecularmente, a través del motivo conservado H-C-H, al agrupamiento trinuclear T2/T3, resultando

en la conversión de la enzima en forma "resting" (totalmente oxidada) a la enzima en un estado de reducción total. El oxígeno molecular interactúa con el sitio T2/T3 y dos electrones del sitio T3 se transfieren para formar el intermediario peróxido. Posteriormente el enlace O-O del intermediario peróxido sufre una ruptura reductiva con $2e^-$ liberando una molécula de agua. Finalmente los cuatro sitios de cobre son oxidados y se libera una segunda molécula de agua (figura 2.3).

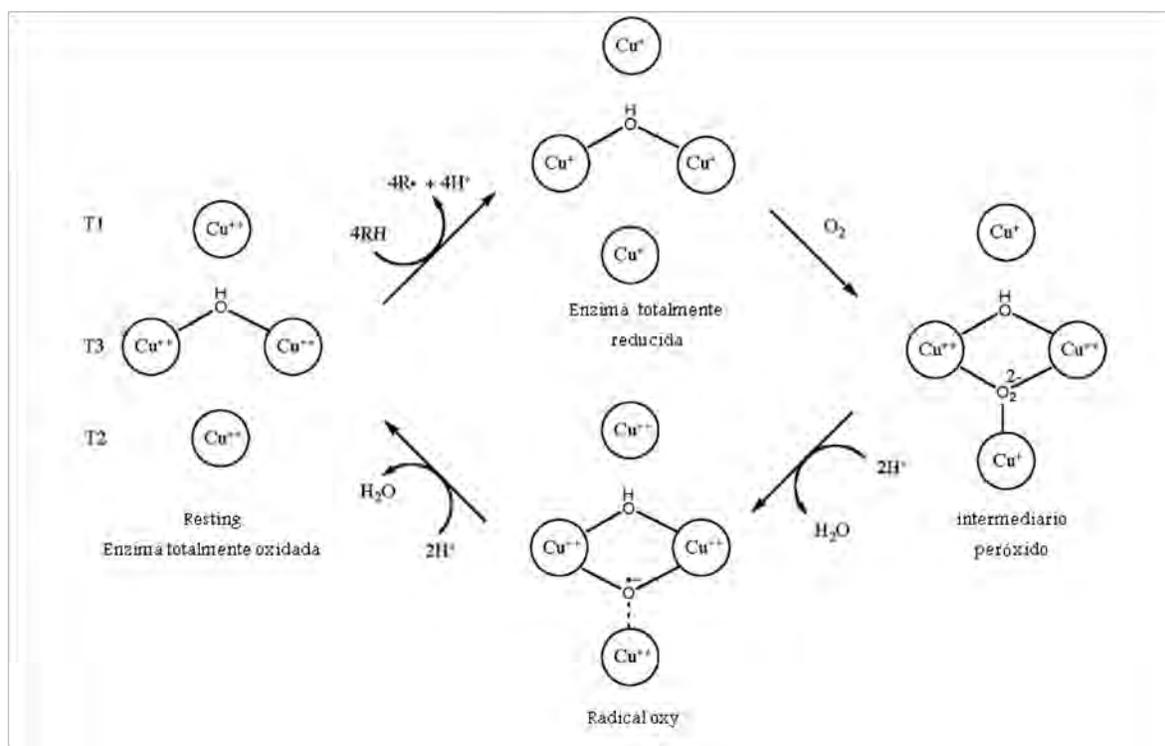


Figura 2-3 Ciclo catalítico de la lacasa (adaptado de Wong, 2009)

Debido a que las lacasas son enzimas con poca especificidad hacia los sustratos son capaces de catalizar la oxidación de sustratos orgánicos e inorgánicos, incluyendo mono, di y polifenoles, aminofenoles, metoxifenoles, poliaminas, entre otros. Los valores K_M y k_{cat} de las diferentes lacasas varían ampliamente para un mismo sustrato. Por otra parte también se ha comprobado que las lacasas pueden oxidar

compuestos no fenólicos en la presencia de un mediador. Los mediadores más estudiados son el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) HBT(1-hidroxibenzotriazol) y HAA (ácido 3-hidroxiantranílico) (Bourbonnais et al., 1997).

La actividad de lacasa puede ser cuantificada por métodos colorimétricos en los cuales la actividad se expresa en unidades por mililitro; en general, los sustratos que son utilizados con mayor eficiencia por todas las enzimas son ABTS, dimetoxifenol y siringaldazina; mientras que los sustratos que son oxidados con menor eficiencia incluyen ácido sinapínico, ácido ferúlico, guaiacol, catecol y p-fenilendiamina (Baldrian, 2006).

2.3 Aplicaciones.

Las lacasas han cobrado importancia durante los últimos años ya que son enzimas excepcionalmente versátiles que pueden oxidar compuestos fenólicos y contaminantes recalcitrantes y por lo tanto es posible aplicarlas en diversos procesos biotecnológicos. Además estas enzimas también pueden polimerizar una gran variedad de compuestos fenólicos y no fenólicos. Esta versatilidad catalítica hace que estas enzimas tengan cada vez un interés mayor en aplicaciones biotecnológicas muy variadas:

- Deslignificación de compuestos ligninocelulósicos.- La separación de la lignina de las fibras de celulosa es un paso muy importante en la fabricación de papel. La lacasa es capaz de degradar los polímeros de lignina mediante oxidación. Por otra parte, la fermentación de residuos ligninocelulosicos para generar biocombustibles también requiere deslignificación y en estos casos también se pueden aplicar las lacasas (Mayer y Staples, 2002).
- Bioblanqueo.- La lacasa en presencia de mediadores es capaz de deslignificar la pasta de papel, sin necesidad de las tradicionales técnicas basadas en el uso de reactivos tóxicos clorados (Bourbonnais et al., 1997)

- Biorremediación enzimática.- El sistema lacasa-mediador es capaz de oxidar compuestos tóxicos presentes en zonas contaminadas y efluentes industriales como los PAHs, clorofenoles, dimetoxifenoles, nitrofenoles, y pesticidas organofosforados entre otros (Rodriguez et al., 1999, Alcalde et al., 2002, Torres et al., 2003).
- Industria Alimentaria.- se han aplicado para clarificar jugos y vinos al remover fenoles indeseables mejorando el color, aroma y sabor. La oxidación enzimática de compuestos fenólicos en las bebidas elimina la turbidez de éstas y produce mejoras en el color, aroma y sabor. Además, el uso de lacasas en panadería influye en la calidad de la masa de pan (Minussi et al., 2002).
- Biosensores.- Se han diseñado diferentes biosensores que contienen lacasas para detectar O₂, glucosa, aminas aromáticas, compuestos fenólicos y algunos compuestos reductores. También se pueden usar las lacasas como marcador en un ensayo inmunoquímico si se conjugan covalentemente a un anticuerpo o antígeno (Mayer y Staples, 2002, Minussi et al., 2002, Yaropolov et al., 1994).
- Futuras aplicaciones.- Las lacasas pertenecen al exclusivo grupo de enzimas que son capaces de aceptar electrones directamente desde un electrodo, además, catalizan la reducción de oxígeno a agua consumiendo 4 electrones, es decir, la reacción que tiene lugar en el cátodo de las pilas de combustible (Call y Mucke, 1997, Christenson et al., 2004). También se han hecho estudios sobre su aplicación en síntesis orgánica y el uso del sistema lacasa-mediador para oxidar un amplio rango de sustratos (Witayakran y Ragauskas, 2009)

2.4 Producción de lacasas por hongos

2.4.1 Hongos productores de lacasas

Se ha comprobado la actividad de lacasa en muchas especies de hongos y se ha purificado de decenas de ascomicetos y basidiomicetos, en la actualidad se han caracterizado más de 100 lacasas fúngicas.

Dentro de los diferentes grupos de hongos, los basidiomicetos causantes de la pudrición blanca están adaptados a una amplia variedad de compuestos lignocelulósicos, la utilización de estos sustratos depende de la producción y secreción de enzimas ligninolíticas como la lacasa (Baldrian, 2006). Estas enzimas que participan en la degradación de lignina usualmente son extracelulares, aunque algunas especies producen ambas, intracelulares y extracelulares.

La producción de lacasas por hongos ligninolíticos de los géneros *Trametes*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Pycnoporus*, *Phanerochaete* y *Agaricus* ha sido ampliamente estudiada debido a la facilidad con que estos microorganismos se cultivan *in vitro* y como las enzimas son secretadas al medio de cultivo se facilita su purificación.

Los hongos de pudrición blanca son los más eficientes productores de lacasas; la mayoría de éstos hongos son capaces de producir más de una isoenzima de lacasa. Las distintas lacasas que se han purificado de diversos hongos presentan diferencias en sus propiedades; éstas diferencias pueden deberse a que algunas especies presentan múltiples genes codificantes de lacasa (Mansur et al., 1997, Smith et al., 1998, Yaver et al., 1996, Giardina et al., 1999).

Las lacasas se producen de forma constitutiva en pequeñas cantidades, sin embargo, su producción se puede mejorar a través de la adición de compuestos fenólicos, iones metálicos y alcohol. Las condiciones de crecimiento determinan el perfil de isoenzimas y la cantidad que se produce de cada una de ellas. Varios estudios han demostrado que iones metálicos, particularmente el cobre, y los compuestos aromáticos pueden influir en la expresión de genes de lacasa. Se ha sugerido que el notable incremento en la actividad de lacasa obtenido en los cultivos suplementados con iones metálicos y compuestos derivados de la lignina, así como la producción de varias isoenzimas se deben a la expresión y regulación diferencial de los diversos genes que codifican para lacasa (Baldrian, 2006).

2.4.2 Secuencias de lacasas fúngicas

Una de las características principales de las lacasas fúngicas son los sitios de unión a cobre que forman parte de su centro catalítico; los aminoácidos ligados al cluster trinuclear son ocho histidinas que siguen un patrón altamente conservado de cuatro motivos HXH separados uno del otro por segmentos que van desde 25 a 175 residuos. En uno de estos motivos, X es la C que se une al Cu T1 mientras que las H adyacentes se unen a cada uno de los dos Cu del sitio T3. A una distancia de 35-75 residuos hay otro motivo HXH y cerca del amino terminal hay otros dos motivos separados por 35-60 residuos (Solomon et al., 1996). El análisis de más 100 de lacasas fúngicas basándose en el alineamiento múltiple de secuencias dio como resultado la identificación de 4 regiones L1-L4 con una longitud de 8 a 24 residuos, (Fig.2.4). Los 12 residuos aminoácidos que actúan como ligandos de cobre se localizan dentro de estas cuatro regiones, de las cuales L2 y L4 coinciden con la firma de cobre reportada para las MCOs, mientras L1 y L3 son distintivas para las lacasas (Kumar et al., 2003).

En la Figura 2.5 se muestra el alineamiento de las secuencias de las regiones conservadas para las lacasas fúngicas (L1-L4) correspondientes a las lacasas producidas por *P. ostreatus* POXC, POXA1b, POXA3, POX3 y POX4, donde se observa que los aminoácidos que hacen coordinación con los átomos de cobre para formar el cluster trinuclear del centro catalítico siguen el patrón de cuatro motivos HXH como lo describieron Kumar y colaboradores (2003).

Proteína	L1	L2	L3	L4
LACIib	⁶⁴ HWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	³⁹⁵ HPFHLHGH	⁴⁴⁷ GPWFLHCHIDFHLEAGFAVVF
LCCI	⁶⁴ HWHGFFQAGTNWADGPAFVNQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	³⁹⁵ HPFHLHGH	⁴⁴⁷ GPWFLHCHIDFHLEAGFAIVF
R1L	⁶⁴ HWHGFFQAGTTEMDGPAFVNQCPI	¹⁰⁴ GTWYHSHLSTQYCDGLRGAF	³⁹⁶ HPFHLHGH	⁴⁴⁶ GPWFLHCHIDWHLEAGLAVVF
LACc	⁶⁴ HWHGLFQRGTNWADGADGVNQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHFGTQYCDGLRGPM	³⁹⁵ HPFHLHGH	⁴⁴⁶ GPWFFHCHIEFHLMNGLAIVF
LTL	⁶⁴ HWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	³⁹⁴ HPFHLHGH	⁴⁴⁶ GPWFLHCHIDFHLDAGFAVVM
TLT	⁶⁴ HWHGFFQHGNTNWADGPAFVNQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPI	³⁹⁴ HPFHLHGH	⁴⁴⁴ GPWFLHCHIDFHLEAGFAVVM

Figura 2-4 Comparación de las secuencias consenso de lacasas fúngicas.

Proteína	L1	L2	L3	L4
POXC	HWHGFFQAGSSWA DGF AFVT QCPV	GTFWYHSHLS TQYCDGLRGP F	HPFHLHGH	GPWFLHCHIDW HLEIGLAVVF
POX4	HWHGFFQAGTSWA DGF AFVT QCP I	GTFWYHSHLS TQYCDGLRGAF	HPFHLHGH	GPWFLHCHIDW HLEIGLAVVF
POXA1B	HWHGLFVKGHNWA DGFAMVT QCP I	GTFWYHSHLGTQYCDGLRGPL	HPFHLHGH	GPWFLHCHIDW HLDLGF AVVF
POX3	HWHGLYQEKTTWA DGF AFVT QCP I	GTFWYHAGYGTQYCDGLRGP F	HPFHLHGH	GPWFLHCHVDW HLDLGLAVVL
POXA3	HWHGLFOHKTS GM DGF SFVN QCP I	GNYWYHSHLS TQYCDGLRGS F	HPFHLHGH	GAWFLHCHIDW HLEAGLAVVF
POXA3 larga	HWHGLFOHKTS GM DGF SFVN QCP I	GNYWYHSHLS TQYCDGLRGS F	HPFHLHGH	GAWFLHCHIDW HLEAGLAVVF

Figura 2-5 Comparación de las secuencias consenso (L1-L4) de las lacasas de *P. ostreatus* (Pezzella et al., 2009)

2.4.3 Familias de genes de lacasa

La producción de diferentes isoenzimas de lacasas es común en diferentes especies de hongos, dicha diversidad en las isoenzimas de lacasa en un principio fue atribuida a modificaciones postraduccionales de un mismo gen, sin embargo la identificación de varias familias de genes de lacasa indican que al menos una parte de la diversidad bioquímica se debe a los múltiples genes de lacasa en los genomas fúngicos. Se han caracterizado 5 genes de lacasa de *Trametes villosa* (Yaver et al., 1996) y de *Trametes sanguinea* (Hoshida et al., 2001), cuatro de *Rhizoctonia solani* (Wahleithner et al., 1996), tres de *Trametes sp I-62* (Mansur et al., 1997) y *Trametes sp. AH28-2* (Xiao et al., 2006). En lo que se refiere al género *Pleurotus* ya se aislaron 4 genes en *P. sajor-caju* (Soden y Dobson, 2001) dos en *P. eryngii* (Rodriguez et al., 2008) y siete en *P. ostreatus* (Pezzella et al., 2009).

El agrupamiento de los genes de lacasa se ha reportado en varias especies de hongos, en *R. solani* tres genes están localizados en un fragmento de 12kb (Wahleithner et al., 1996), los 17 genes de lacasa de *C. cinerea* se encuentran en siete diferentes loci en el genoma (Kilaru et al., 2006) mientras que siete genes en *P. ostreatus* se localizan en una región genómica de 150 kb (Pezzella et al., 2009). Basándose en la composición de los intrones y en la similitud de las proteínas, se han identificado subfamilias dentro de diferentes familias de genes. Se ha postulado que la existencia de las familias de genes de lacasa puede deberse a la diversidad de funciones fisiológicas durante el ciclo de vida de los hongos (Giardina et al., 2010)

Para el hongo *P. ostreatus*, sobre el cual se realizó el presente trabajo, se han purificado y caracterizado al menos 8 isoenzimas: POXA1b, POXA1w, POXA2, POXB1, POXB2, POXA3a, POXA3b y POXC (Giardina et al., 1996, Giardina et al., 1999, Palmieri et al., 1997, Palmieri et al., 2000, Palmieri et al., 2003). La isoenzima predominante en diferentes condiciones de cultivo es POXC (Palmieri et al., 1997) y la adición de sulfato de cobre al medio de cultivo provoca un incremento en la actividad total de lacasa, principalmente de la isoforma POXA1b (Palmieri et al., 2003).

Se han secuenciado cuatro genes de lacasa: *pox1* (Giardina et al., 1995), *poxc* (Giardina et al., 1996) y *poxa1b* (Giardina et al., 1999) y *poxa3* que codifica la subunidad grande tanto de POXA3a y POXA3b (Palmieri et al., 2003). Recientemente se reportó la secuencia de tres nuevos miembros de la familia génica de las lacasas *pox3*, *pox4* y *pox5* (Pezzella et al., 2009).

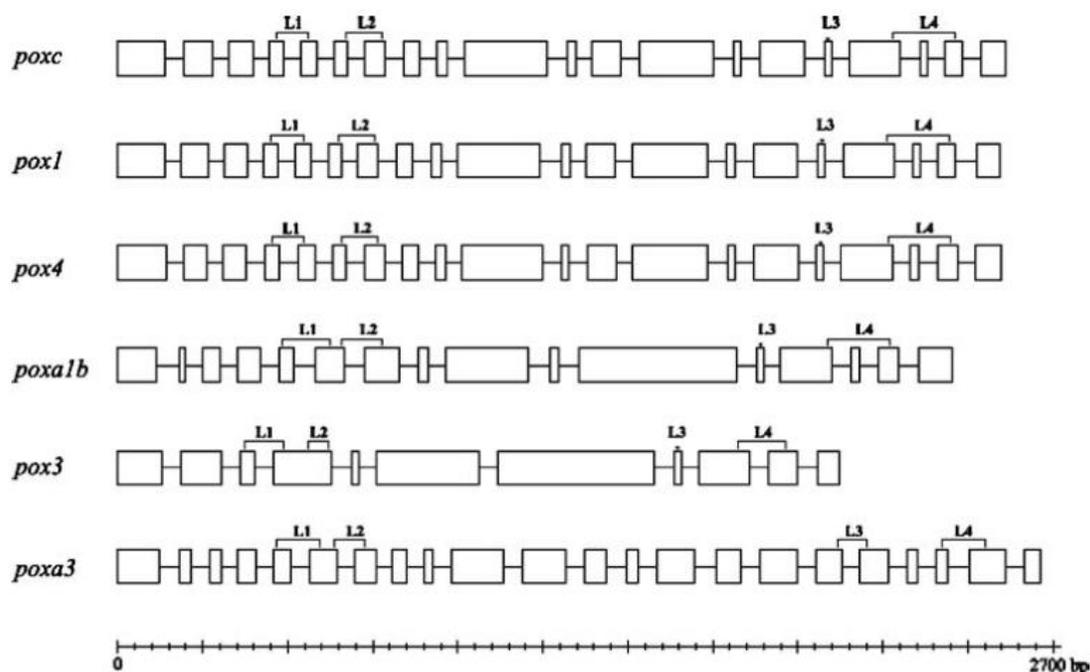


Figura 2-6 Comparación de la estructura de los genes de lacasa de *P. ostreatus*. Los exones se muestran como cajas y los intrones en líneas continuas. Las regiones que codifican para las secuencias consenso L1-L4 de cada gen también se señalan (Pezzella et al., 2009).

La comparación estructural de los genes de lacasa se muestra en la Figura 2.6, donde se observa que las regiones que codifican para L1 y L2 que contienen los sitios de unión a cobre I y II (Kumar et al., 2003) se localizan en posiciones análogas en *poxc*, *pox1* y *pox4*, mientras que la misma región se encuentra organizada de manera diferente en *poxa1b* y *poxa3*. Entre las regiones L1 y L2 el gen *pox3* posee solo un intrón, mientras que *poxa1b* y *poxa3* tienen dos intrones y se encuentran tres intrones en *poxc*, *pox1* y *pox4*. La estructura de la región 3' está bien conservada en los genes *pox1*, *poxc*, *pox4* y *poxa1b* presentando una organización de las regiones L3 y L4 muy similar, mientras que en los genes *pox3* y *poxa3* es más divergente.

2.5 Inducción de la producción de lacasas en hongos.

Diversos medios conteniendo diferentes nutrientes y variadas condiciones de cultivo se han utilizado para la producción de lacasas. En varios estudios se ha observado que los hongos producen altos niveles de lacasa en medios que contienen suficiente cantidad de la fuente de nitrógeno, como en el caso de *T. pubescens* cuya actividad de lacasa aumenta hasta 330 U/mL al adicionar 10 g/L de peptona al medio de cultivo (Galhaup et al., 2002b). Además la respuesta de los hongos a las diferentes fuentes de carbono y a su concentración en el medio de cultivo es muy variada, pueden reprimir o mejorar la producción de lacasas. Por otra parte se ha probado la utilización de los residuos ligninocelulósicos como sustrato en las fermentaciones, dando buenos resultados debido a que contienen carbohidratos solubles y otros compuestos fenólicos que aseguran el crecimiento del hongo y la eficiente producción de lacasa (Elisashvili y Kachlishvili, 2009).

En el caso de la producción de lacasas, el término de inducción es empleado para referirse al incremento en la actividad volumétrica por hongos basidiomicetos debido a la adición de ciertos compuestos. El mejoramiento de la producción de lacasas por hongos de pudrición blanca se ha estudiado mediante la adición de

compuestos químicos (iones metálicos y compuestos fenólicos derivados de la lignina) y mediante interacciones antagónicas (co-cultivos de hongos).

Compuestos aromáticos relacionados con lignina como xilidina, ácido ferúlico, ácido verátrico, entre otros, se han utilizado para incrementar la producción de lacasa al adicionarlos al medio de cultivo (Collins y Dobson, 1997, de Souza et al., 2004). Dentro de las diferentes sustancias que se han probado como inductores en la producción de lacasas por hongos, el cobre ha sido la más eficiente; la estimulación de la producción de lacasas es mucho mayor que cuando se utilizan compuestos aromáticos. En la tabla 2.2 se muestran estudios recientes de la inducción de la producción de lacasa en varias especies de hongos.

La síntesis y secreción de lacasas depende de los nutrientes, las condiciones de cultivo y el estado fisiológico del hongo así como de la adición de diferentes inductores al medio de cultivo. En varias especies de hongos se ha demostrado el efecto de los inductores a nivel de la transcripción de los genes de lacasa.

2.5.1 Inducción por metales

En la última década, se ha reportado que el cobre incrementa tanto la actividad de lacasa como la transcripción de los genes que la codifican en *Trametes versicolor* (Collins y Dobson, 1997) *Pleurotus ostreatus* (Palmieri et al., 2000) *Pleurotus sajor-caju* (Soden y Dobson, 2001) *Trametes sp* AH28 (Xiao et al., 2004) *Cryptococcus neoformans* (Jiang et al., 2009) y *Coriolopsis rigida* LPSC No. 232 (Saparrat et al., 2010). En estos estudios se demostró que la adición de cobre al medio de cultivo incrementa significativamente la producción de lacasas y que el efecto del cobre en la síntesis de diferentes isoenzimas es a nivel de transcripción génica. Asimismo se observó una clara correlación positiva entre los niveles de transcritos de lacasa y la actividad de la enzima cuantificada en el medio de cultivo.

Tabla 2.2- Inducción de la producción de lacasa en hongos.

Especie	Inductor	Referencia
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Cobre	(Palmieri et al., 2000)
<i>Pleurotus sajur-caju</i>	Cobre y compuestos fenólicos	(Soden y Dobson, 2001)
<i>Trametes sp</i>	Cobre y compuestos fenólicos	(Xiao et al., 2004)
<i>Trametes pubescens</i>	Cobre	(Galhaup et al., 2002a)
<i>Trametes hirsuta</i>	Cobre	(Couto et al., 2004)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Cobre	(de Souza et al., 2006)
<i>Coriolus versicolor</i> MTCC 138	Cobre y compuestos fenólicos	(Revankar y Lele, 2006)
<i>Trametes versicolor</i>	Cobre	(Minussi et al., 2007)
<i>Coprinus comatus</i>	Cobre, manganeso y ácido cafeico.	(Lu y Ding, 2010)
<i>Corioloopsis rigida</i> LPSC No. 232	Cobre, anfotericina B, ácido siringico, entre otros.	(Saparrat et al., 2010)
<i>Pleurotus ostreatus</i> CP50	Cobre y lignina	(Tinoco et al., 2011)

Un considerable aumento en la actividad de lacasa producida por *T. pubescens* se obtuvo al incrementar la concentración de cobre en el medio de cultivo hasta cierto valor; la concentración óptima para la producción de lacasa fue de 1.5-2.0 mM. Tanto la concentración como el tiempo de adición del cobre fueron factores importantes para obtener niveles altos de actividad de lacasa (Galhaup y Haltrich, 2001).

En el caso de *Trametes sp.* AH28 Xiao y colaboradores demostraron que el cobre juega un papel importante tanto en la transcripción génica como en la actividad de lacasa ya que encontraron una correlación positiva entre la acumulación de ARNm de lacasa y el aumento de actividad enzimática en los cultivos (Xiao et al., 2006). Concentraciones de cobre menores a 0.5 mM estimularon la producción de las isoenzimas LACA y LACC; sin embargo al aumentar la concentración a 1-2 mM LACC desapareció. Jiang y colaboradores (2009), en un trabajo con *C. neoformans*, reportaron una correlación positiva entre la actividad de lacasa y el nivel de transcritos de *lac1* y demostraron que el factor de transcripción sensible a cobre CUF1 es necesario para que se lleve a cabo la inducción por cobre.

Debido a que en varias especies de hongos se ha demostrado que el cobre aumenta el nivel de transcripción de los genes de lacasa, se ha analizado la región promotora. Se encontraron secuencias MREs (Metal Response Elements) en la región promotora de los genes *lacA*, *lacB* y *lacC*, en *Trametes sp.* AH28 (Xiao et al., 2004) en los genes *poxc* y *poxa1b* de *P. ostreatus* (Faraco et al., 2003) y en el gen *lap2* de *T. pubescens* (Galhaup et al., 2002a). Los MREs interaccionan con los factores de transcripción sensibles a Cu y su organización es similar a la de los genes de metalotionina.

Se ha postulado que la adición de cobre puede estimular eficientemente la producción de lacasa debido a las MREs que se encuentran en las regiones promotoras de los genes que codifican las diferentes isoenzimas. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual existe una expresión diferencial de isoenzimas de lacasas debido a la presencia de cobre aún se desconoce.

Recientemente se analizaron los transcritos de los genes *poxa1b*, *pox2*, *poxa3*, *sspoxa3a* y *sspoxa3b*, que codifican para lacasas en *P. ostreatus* mediante qRT-PCR. El estudio fue realizado en cultivos en un medio químicamente definido (CM), un medio CM suplementado con Cu⁺² y Mn⁺² (CM-plus) y un medio de aguas residuales de los molinos de aceite olivo (OMW) al 50% en agua destilada. El transcrito más abundante

tanto en CM-plus y en OMW fue *poxa3*, los transcritos de *pox2* únicamente fueron inducidos en OMW y los transcritos de *poxa1b* presentaron un incremento significativo en el día 14 de cultivo en CM-plus y OMW (Goudopoulou et al., 2010).

2.5.2 Inducción por compuestos aromáticos.

Los compuestos aromáticos relacionados estructuralmente a la lignina como xilidina, ácido ferúlico, ácido verátrico, ácido gálico, vainillina entre muchos otros, se han utilizado para incrementar el rendimiento de la producción de lacasa al añadirlos al medio de cultivo. La inducción de lacasas en presencia de compuestos fenólicos parece ser una respuesta de defensa para reducir el estrés oxidativo causado por los radicales de oxígeno que se generan a partir de estas moléculas (Thurston, 1994). Uno de los inductores que se han reportando presentan una mayor eficiencia es 2,5-xilidina en *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert et al., 1996), *T. versicolor* (Collins y Dobson, 1997, Couto et al., 2002) y *T. villosa* (Yaver et al., 1996) solo por mencionar algunos.

La respuesta de las diferentes especies de hongos a los compuestos aromáticos es muy variada y en algunos casos la inducción de la producción de lacasa es sensible a pequeñas diferencias en la estructura química. Terrón y colaboradores (2004) evaluaron el efecto de nueve compuestos aromáticos relacionados estructuralmente en la producción de lacasa por *Trametes* sp. I-62. Los resultados que obtuvieron demuestran que estos compuestos tienen diferentes efectos tanto en la actividad enzimática como en como en la expresión de genes de lacasa. Tres genes de lacasa *lcc1*, *lcc2*, y *lcc3* presentaron una expresión diferencial en respuesta a la presencia de estos compuestos y los perfiles de niveles de transcritos fueron muy diferentes para cada uno de los compuestos evaluados. En *Trametes* sp. AH28-2, distintos compuestos aromáticos pueden inducir selectivamente la producción de diferentes isoenzimas de lacasa, la toluidina induce la expresión de LACA y 3,5-dihidroxitolueno estimula la expresión de LACB (Xiao et al., 2006).

El efecto inductor de los compuestos aromáticos no sólo depende de la estructura molecular y la concentración, también juega un papel importante el tiempo de adición al cultivo. La inducción es más evidente en los cultivos de *P. pulmonarius* y de *Botryosphaeria rhodina*, cuando los inductores se añaden al inicio del cultivo (de Souza et al., 2004, Dekker et al., 2007). En el caso de *P. ostreatus*, *Rigidoporus lignosus* y *Trametes modesta* es necesario una adaptación del micelio a las condiciones de cultivo antes de adicionar los inductores, esto con el fin de evitar una inhibición de crecimiento (Nyanhongo et al., 2002, Vanhulle et al., 2008).

El efecto de los compuestos aromáticos a nivel transcripcional varía en las diferentes especies de hongos que se han estudiado, así también el resultado sobre las diversas isoenzimas en un mismo organismo puede ser muy distinto. En algunos casos la inducción se ha correlacionado con la existencia de elementos putativos de respuesta a xenobióticos (XRE) corriente arriba de varios genes de lacasa, como los de *T. versicolor* (Collins y Dobson, 1997), *P. sajur-caju* (Soden y Dobson, 2001), *P. ostreatus* (Faraco et al., 2003) y *Trametes sp.* AH28-2 (Xiao et al., 2006).

2.5.3 Análisis de la región promotora de los genes de lacasa

A través del análisis de la secuencia de diversos promotores de genes de lacasa se distingue la presencia de diversos elementos de respuesta los cuales varían en número, ubicación y orientación. La presencia de los diferentes elementos de respuesta se puede correlacionar con la expresión diferencial de los genes de lacasa en respuesta a diferentes condiciones de cultivo.

En el genoma de *P. ostreatus* se identificaron 12 genes putativos que codifican para lacasa. El análisis de las regiones promotoras de los genes de lacasa que se extienden 500pb corriente arriba del codón de inicio permitió reconocer diferentes sitios putativos de regulación distribuidos a lo largo de la secuencia del promotor (Figura 2.7) (Piscitelli et al., 2011).

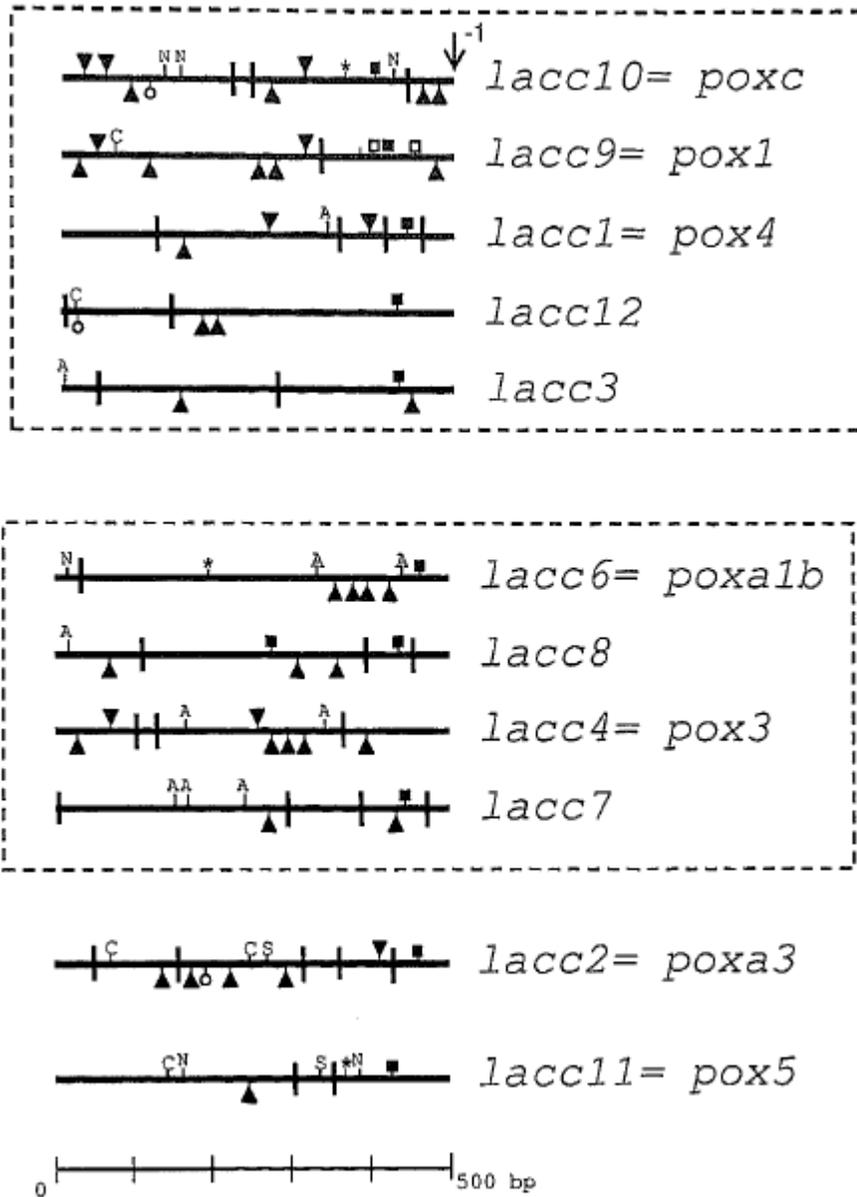


Figura 2-7 Distribución de los elementos cis-acting putativos en las regiones promotoras de los genes de lacasa de *P. ostreatus*.

500 pb corriente arriba del codón de inicio (↓): (■) caja TATA; (|) caja CAAT; (▼) caja GC; (*) HSE, Heat Shock Element; (N) NIT2, Nitrogen Responsive Element; (A) ARE, Antioxidant Responsive Element; (□) PRE, Putative Response Elements; (▲) MRE, Metal Responsive Element; (○) XRE, Xenobiotic Responsive Element; (C) Cre-A binding site; (S) STRE Stress Responsive Element (Tomado de Piscitelli et al., 2011)

Cabe señalar que en el promotor del gen *poxc* que codifica para la proteína más abundante en todas las condiciones de cultivo se encuentra la mayor cantidad de diversos elementos de respuesta, destacando 4 MRE localizados en las posiciones -20, -60, -236 y -297 (Moussa, 2009).

Los genes *poxc* y *poxa1b* que se inducen por cobre en *P. ostreatus* presentan en la región del promotor varios MREs. La formación de complejos entre los MREs y los factores de transcripción se lleva a cabo únicamente en ausencia de iones de cobre; sugiriendo la intervención de factores de regulación negativa que pueden reprimir la expresión de los genes de lacasa cuando se encuentran unidos al promotor (Faraco et al., 2003).

Las variaciones en la ubicación y la cantidad de elementos XRE (Xenobiotic Responsive Element) y ARE (Antioxidant Responsive Element) pueden resultar en una amplia variedad de respuestas a los compuestos aromáticos dando lugar a una expresión diferencial de los múltiples genes de lacasa (Soden y Dobson, 2003, Xiao et al., 2006).

Las secuencias consenso de unión al factor de transcripción NIT2 se relacionan con la regulación debido al nitrógeno, varios genes involucrados en el metabolismo de purinas, de aminoácidos y en la asimilación de nitratos requieren una proteína funcional de NIT2 para su expresión, sugiriendo una regulación de los genes de lacasa debido al tipo y cantidad de fuente de nitrógeno (Marzluf, 1997).

Se ha observado que la expresión de los genes de lacasa puede ser sometida a represión catabólica. Altos niveles de glucosa inhiben la transcripción de lacasa en *T. pubescens* (Galhaup et al., 2002a) y en *T. sp* AH28-2 (Xiao et al., 2006). Los sitios putativos de unión a CreA que se han localizado en algunos genes de lacasa sugieren un mecanismo de represión catabólica por carbono similar a la que se lleva a cabo por CreA en *Aspergillus nidulans* (Strauss et al., 1999).

2.6 Antecedentes en el grupo de investigación

En nuestro grupo de investigación durante los últimos años se ha estudiado la producción de lacasas por *P. ostreatus* CP50. Se purificaron y caracterizaron las lacasas producidas en cultivo axénico y en co-cultivo con *Trichoderma viridae* (Contreras, 2009).

Por otra parte, se estudió el enriquecimiento del medio de cultivo con diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para formular un medio de cultivo en el que se mejorara la producción de ésta enzima. Además se realizaron unos primeros estudios de inducción en los cuales se observó un incremento en la producción de lacasa al adicionar diferentes compuestos a la mitad de la fase exponencial de crecimiento (60 h de cultivo). Cuando se adicionó cobre se obtuvo una producción de 5.7 U/mL y una producción de 4.8 U/mL al adicionar lignina. Cabe destacar que los mejores resultados se obtuvieron al adicionar cobre y lignina de manera simultánea obteniendo una producción máxima de 12.23 U/mL a las 100 h (Figura 2.8). Esto es 10 veces mayor que la obtenida en el medio de cultivo base, así como mayor que la producción obtenida cuando únicamente se adicionó cobre o lignina (Acevedo, 2009).

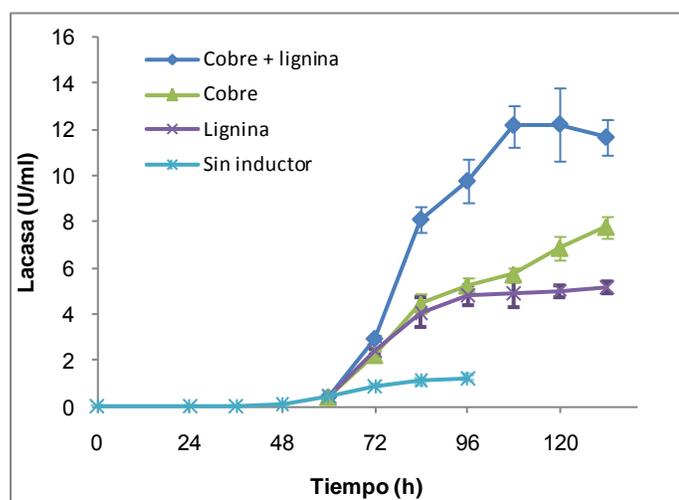


Figura 2-8 Cinética de producción de lacasa por *P. ostreatus* CP50 inducida a las 60 h de cultivo.

Sin embargo, hace falta realizar una evaluación de la inducción de lacasas en respuesta a distintas concentraciones de CuSO_4 y a la combinación de CuSO_4 /lignina como estrategia para incrementar su producción. Así como determinar si el efecto es a nivel de transcripción regulando la síntesis de los múltiples genes de lacasa en *P. ostreatus* CP50 y así obtener información que permita mejorar la producción de las isoenzimas de interés.

3 Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

El incremento de actividad volumétrica de lacasa en los cultivos de *P. ostreatus* CP50 suplementados con cobre y lignina se debe a un incremento en el nivel de expresión de los genes de lacasa

3.2 Objetivos

3.2.1 General

- Estudiar el incremento de la producción de lacasa en cultivos de *P. ostreatus* CP50 suplementados con cobre y lignina y analizar su relación con un aumento en el nivel de expresión de los genes que codifican para lacasa.

3.2.2 Particulares

- Determinar los genes de lacasa que se expresan en las condiciones de inducción a estudiar.
- Estudiar por medio de la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real los niveles de expresión de los genes que codifican para lacasa como respuesta a la presencia de inductores.
- Estudiar el efecto de la adición de cobre y lignina por separado y de manera combinada sobre la actividad volumétrica y transcripción de genes que codifican para lacasa en cultivos de *P. ostreatus* CP50.

4 Materiales y métodos

4.1 Microorganismo.

La cepa utilizada, *Pleurotus ostreatus* CP50, fue proporcionada por el Dr. Daniel Martínez del Colegio de Posgraduados, Unidad Puebla y fue preservada en caja de Petri en medio de agar y malta al 2%.

Para preservarla, se sembró aproximadamente 1 cm² del medio con la cepa a otra caja con medio fresco y se incubó durante 7 días a 29°C en oscuridad.

4.2 Cultivo de *P. ostreatus* CP50 en matraces

4.2.1 Precultivo

Se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio extracto de malta al 2% a pH 6. Para preparar el precultivo, se cortó 1 cm² de agar con el hongo crecido durante 7 días a 29°C y se molió con 10 mL de medio estéril en un molino de acero inoxidable por cada matraz a inocular, de la suspensión de micelio obtenida, se inoculó 10 mL en cada uno de los matraces conteniendo 90 mL de medio para completar un volumen final de 100 mL. Posteriormente los matraces se incubaron a 29°C y 150 rpm durante 4 días.

4.2.2 Inóculo

La biomasa producida en el precultivo se recuperó mediante centrifugación a 10000 rpm durante 10 min y se desechó el sobrenadante. El micelio se lavó con amortiguador de fosfatos (60 mM, pH 6) y se volvió a centrifugar a las condiciones anteriores. El paquete celular se resuspendió en amortiguador de fosfatos (60 mM, pH 6) y se homogenizó en un molino de acero inoxidable a 30,000 rpm durante 11 seg. De la suspensión de micelio obtenida se tomó 1 mL para inocular cada matraz conteniendo 100 mL de medio de producción.

4.2.3 Medio de cultivo

Para el cultivo se utilizó el medio de producción formulado anteriormente en el grupo de investigación (Acevedo, 2009). Su composición es:

Extracto de malta	20 g/L
Extracto de levadura	10 g/L
Glucosa	10 g/L
Peptona	10 g/L
Triptona	5 g/L
pH	6

4.2.4 Condiciones de cultivo

El estudio de la producción de lacasa se realizó para cultivo en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio de producción, incubados a 29°C y 150 rpm durante 144 h. Para estimular la síntesis de lacasa se adicionó solución 100 mM CuSO₄ y solución de lignina alcalina (Sigma-Aldrich).

4.3 Cuantificación de Biomasa.

El crecimiento micelial se evaluó mediante la técnica de peso seco tomando muestras por triplicado cada 24 h. El micelio contenido en cada matraz se filtró al vacío en papel Whatman No. 1 previamente secado a peso constante (80°C, 24 h) y tarado. Las muestras filtradas se lavaron con agua destilada, se secaron en el horno a 80°C hasta alcanzar un peso constante (24 h) y se pesaron. La cantidad de biomasa se calculó mediante diferencia de pesos y se indica en g de biomasa por L de medio de cultivo (g/L).

4.4 Determinación de actividad de lacasa

La actividad enzimática se determinó midiendo la oxidación de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) por espectrofotometría mediante el incremento de la absorbancia a 436 nm ($\epsilon_{436} = 29\,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de la reacción consistió en una solución 1mM de ABTS en amortiguador de acetatos (pH de 3.6, 100 mM) y alícuotas (5 a 100 μL) del caldo del cultivo a un volumen total de 1 mL. Una unidad de actividad de lacasa se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de ABTS por minuto a 25 °C bajo las condiciones de reacción. La actividad de lacasa se determinó por triplicado.

4.5 Zimogramas (electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas)

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas se realizó mediante el método descrito por (Laemmli, 1970). Para elaborar el gel, primeramente se montó el dispositivo para moldeado del gel, enseguida, se preparó el gel separador y una vez que gelificó se adicionó el gel concentrador y se colocó el peine. Se utilizaron geles al 12% de acrilamida y de 0.75 mm de grosor, cuya composición se indica en la tabla 4.1.

Las muestras para cargarse en los pozos se prepararon con 10 μL de la muestra y 5 μL del amortiguador de carga, cargándose en cada pozo un total de 15 μL . Los geles se montaron y se corrieron en una cámara mini-protean Bio-Rad a un voltaje constante de 150 V, en amortiguador de Tris-Glicina pH 8.3.

Para revelar el gel, se cubrió con amortiguador de acetatos (pH 5, 100 mM) y se adicionó ABTS (1 mM) y/o DMP (6 mM) para observar las bandas de actividad de lacasa.

Tabla 4.1 Composición de los geles de acrilamida.

Componente	Gel separador	Gel concentrador
Agua	3.7 mL	3.7 mL
Tris pH 8.8	2.5 mL	—
Tris pH 6.8	—	0.5 mL
Acrilamida 30%	3.7 mL	0.66 mL
APS	0.1 mL	0.04 mL
TEMED	0.015 mL	0.008 mL

4.6 Cálculo de la productividad específica

Para el cálculo de la productividad específica de lacasa se empleó una ecuación semejante a la utilizada por Amanullah y colaboradores (1998). En ésta ecuación, se considera tanto la producción de enzima asociada al crecimiento como la producción de enzima no asociada al crecimiento:

$$\frac{\dot{X}_{Biomasa} \Delta A_{Lacasa} + \bar{A}_{Lacasa} \Delta X_{Biomasa}}{(\dot{X}_{Biomasa})^2 \Delta t}$$

$\dot{X}_{Biomasa}$ = promedio de biomasa en g/L

ΔA_{Lacasa} = diferencial de actividad de lacasa (U/mL)

\bar{A}_{Lacasa} = promedio de actividad de lacasa (U/mL)

$\Delta X_{Biomasa}$ = diferencial de biomasa (g/L)

Δt = diferencial de tiempo (h)

Se evaluó la productividad específica de lacasa (U de actividad/g de biomasa.h) a partir del momento de la inducción (60 h) al final del cultivo (144 h). También se hizo una estimación para la fase de crecimiento (60 a 96 h) y para la fase estacionaria (96 a 144 h).

4.7 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

El micelio se filtró y se lavó con agua destilada y se adicionó a cada muestra 3 mL de RNA later (Ambion Inc., TX, USA). Para lograr la ruptura celular, el micelio se congeló con nitrógeno líquido y se maceró en un mortero, enseguida se realizó la extracción de ARN total utilizando TRIzol® Plus RNA Purification System (Invitrogen) de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante. La integridad se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador MOPS (ácido mofolino propano sulfónico) con formaldehído. La integridad del ARN ribosomal se tomó como indicio de que el ARN total había sido extraído adecuadamente. La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente midiendo absorbancia a 260 y a 280 nm en NanoDrop ND-1000 (Thermo scientific, Whaltam, MA). Posteriormente las muestras se sometieron a tratamiento con DNasa I usando el kit Turbo-DNase free (Ambion Inc, TX, USA).

La síntesis de la primera cadena de ADNc se realizó a partir de 5 µg de ARN total utilizando el oligo dT y RevertAid™ Minus H First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Science) de acuerdo al protocolo del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó como templado para las reacciones de PCR convencional y PCR cuantitativo en tiempo real.

4.8 Identificación de las isoformas de lacasa producidas en condiciones de inducción

4.8.1 Diseño de oligonucleótidos generales para lacasas

Con el fin de amplificar segmentos del cDNA que codifican para las isoformas de lacasa que se producen en los cultivos suplementados con cobre, se diseñaron oligonucleótidos degenerados basados en las secuencias consenso altamente conservadas de los sitios de unión a cobre de lacasas (L1-L4) descritas anteriormente. Se realizó un alineamiento de las secuencias reportadas de ADNc para lacasas de *P. ostreatus*: *poxc* (número de acceso del GenBank Z34848), *poxa1b* (número de acceso del GenBank AJ005018), *pox1* (número de acceso del GenBank Z34847), *pox3* (número de acceso del GenBank FM202672,) y *pox4* (número de acceso del GenBank FM202673) usando el software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y se diseñaron tres oligonucleótidos correspondientes a las secuencias L1, L3 y L4, así como un oligonucleótido correspondiente a una región conservada de aminoácidos (Lac) para las lacasas de *P. ostreatus*, (Tabla 4.2 y Figura 4.1).

Tabla 4.2 Oligonucleótidos generales para lacasas de *P. ostreatus*. Las abreviaciones de los nucleótidos están de acuerdo a la nomenclatura IUPAC-IUB (Y=C ó T, R=A ó G, N= G, A, T ó C, D=A, G ó T, S=C ó G).

Nombre	Secuencia de aa	Secuencia de nucleótidos
Cu1F	SIHWHGF	AGTATYCAYTGGCAYGGYYTC
LacF	DNYWIR	RTYGRSAAYTACTGGATTTCG
Cu3R	HPFHLHG	GAANGTRTGNCCGTGDARAT
Cu4R	WFLHCHI	TGCCARTCRAYRTGRCARTG



Figura 4-1 Representación esquemática de un gen de lacasa y los sitios de alineamiento de los oligonucleótidos diseñados.

La región estructural de un gen de lacasa se representa por un rectángulo. Los sitios de unión a Cu (L1, L2, L3 Y L4) y la región conservada Lac se encuentran indicados en recuadros.

4.8.2 Amplificación del ADNc por PCR

Para la amplificación se utilizó como templado el ADNc obtenido de las muestras de un cultivo con adición de 1.5mM de CuSO_4 . Primeramente se hizo una evaluación de las mejores condiciones de temperatura para el alineamiento de los oligonucleótidos mediante una PCR convencional con gradiente de temperatura de 55 a 65°C. La reacción de amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio. El producto de PCR se purificó y concentró utilizando High Pure PCR Purification Kit (Roche).

4.8.3 Clonación de los fragmentos obtenidos de la amplificación por PCR.

Se llevó a cabo la reacción de ligación de los productos amplificados para los genes de lacasa con el vector de ligación de clonación pCR2.1 del sistema Topo TA cloning Kit (Invitrogen) con resistencia a kanamicina y ampicilina de acuerdo a la metodología del proveedor. Posteriormente se transformaron células Top10 de *E. coli* electrocompetentes; se seleccionaron colonias blancas que crecieron en presencia de antibiótico ampicilina/kanamicina en placas de agar LB con Xgal. Las clonas seleccionadas se cultivaron en caldo LB con 50µg/mL de ampicilina y se aisló el DNA plasmídico con el High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). La evaluación de los plásmidos se realizó mediante un ensayo de restricción con la enzima *EcoRI* (New England). La secuenciación de las clonas se hizo través de los oligos M13 en ambos

sentidos. La similitud de las secuencias obtenidas se realizó con Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

4.9 Análisis transcripcional

4.9.1 Diseño experimental factorial 2³.

La metodología de PCR cuantitativa en tiempo real permite el estudio de la expresión génica en una situación fisiológica determinada, es decir no solo podemos saber si un determinado gen se está expresando, sino que también podemos saber la magnitud de expresión de ese gen a diferentes condiciones fisiológicas. Esta metodología se empleó para investigar la expresión de los genes de lacasa bajo diferentes condiciones de inducción.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la adición de cobre y/o lignina en los cultivos de *P. ostreatus*, se realizó un diseño experimental que permitiera conocer los efectos principales y las interacciones entre los factores que originan el aumento de la producción de lacasa. Se estudiaron tres factores (cobre, lignina y tiempo de cultivo) a dos niveles (ausencia o presencia) en un diseño factorial 2³ y se analizaron como respuestas la actividad volumétrica y la expresión de los genes de lacasa. El diseño consistió en 8 experimentos que se hicieron por triplicado. La matriz de experimentos se muestra en la tabla 4.3.

Tabla 4.3 Matriz de diseño factorial 2³.

Experimento	Variables codificadas			Variables reales		
	Cobre	Lignina	Tiempo	Cobre mM	Lignina g/L	Tiempo (horas)
1	-1	-1	-1	0	0	96
2	+1	-1	-1	1.5	0	96
3	-1	+1	-1	0	0.5	96
4	+1	+1	-1	1.5	0.5	96
5	-1	-1	+1	0	0	120
6	+1	-1	+1	1.5	0	120
7	-1	+1	+1	0	0.5	120
8	+1	+1	+1	1.5	0.5	120

4.9.2 Diseño de oligonucleótidos.

Mediante la técnica de qPCR se hizo un análisis transcripcional de los genes de lacasa bajo diferentes condiciones de cultivo. Los oligonucleótidos correspondientes fueron diseñados sobre las secuencias de ARNm de los genes de las isoformas de lacasa producidas en inducción, obtenidas del GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI); ver Tabla 4.4. Los oligonucleótidos se diseñaron usando el programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA) con una longitud entre 19 y 21 pb para generar amplicones de 101 pb. Los oligonucleótidos diseñados y utilizados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 4.4 Oligonucleótidos diseñados para el análisis transcripcional de genes de lacasa en *P. ostreatus* mediante qPCR.

Gen	Acceso Genebank	Nombre del oligo	Secuencia 5'-3'
<i>pox3</i>	FM202672	pox3a	CAATCGTTCCGGGACATTCT
		pox3b	ACCGTCACAGTATTGCGTGC
<i>poxc</i>	Z34848	poxca	CTGTTGTCGCTCGCTCAGTG
		poxcb	CAGCTGGAAGTTATCGCCCTT
<i>poxa3</i>	AJ344434	poxa3a	ATGTTCCACATGGGCCCTC
		poxa3b	TGCGTGACGCTTACCTGAGT
β -tubulina	AF332138	b-tuba	TGAGCCGTACAATGCCACAC
		b-tubb	TGCGGAAGCAAATGTCTAG

4.9.3 Desarrollo de la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Las muestras se colectaron a las 60, 96 y 120 h de cultivo y se realizó la extracción de ARN total y síntesis de ADNc de acuerdo a lo mencionado en la sección 4.6. Las reacciones de qPCR se realizaron en multicámaras de 96 pozos (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems), en un termociclador ABI PRISM 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las condiciones de los ciclos térmicos para todos los genes fueron de la siguiente manera: un paso inicial a 50°C por 2 min y a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 s y 60°C por 1 min y finalmente un paso de disociación a 95°C por 15 s, a 60°C por 1 min y 95°C por 15 s.

La especificidad de las reacciones de amplificación fue confirmada en línea, analizando la curva de disociación.

Cada reacción consistió en 1 μ L de de mezcla equimolar (5 μ M) de cada par de oligonucleótidos (sentido y antisentido), 50 ng de ADNc como templado y 6 μ L de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Fermentas) en un volumen total de reacción de 12 μ L. En todos los experimentos, por cada gen analizado se sometieron al mismo procedimiento controles negativos sin templado de ADNc (NTC) para excluir o detectar cualquier posible contaminación. La adquisición de datos se realizaron mediante el programa SDS software (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los valores para todos los genes aparecieron antes del ciclo 31. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

La eficiencia de amplificación para cada gen se determinó haciendo diluciones seriales de ADNc (1:2) en un rango de 0.178 a 200 ng, cada dilución se analizó por triplicado y se generó la curva estándar al graficar el ciclo de cuantificación (Cq) como función del logaritmo base 10 de la concentración del ADNc (ng) y la eficiencia de amplificación se calculó haciendo un ajuste de mínimos cuadrados y usando la ecuación $E=10^{-1/s} - 1$ (Apéndice A). La curva estándar también proporcionó el rango dinámico de concentraciones para cada gen, definido como la fase cuantitativa y detectable de la curva en la que se mantiene la linearidad.

El cálculo de la expresión génica se hizo mediante el método de doble delta Cq (Livak y Schmittgen, 2001). Para poder usar este método se requiere que la eficiencia de amplificación del gen problema y del gen de referencia sea muy similar. Para validar la eficiencia de amplificación se graficó la variación del ΔCq (Cq del gen de referencia- Cq del gen problema) en función del logaritmo base 10 de la cantidad de templado (ng). Si el valor absoluto de la pendiente es menor a 0.1, se considera que la eficiencia de amplificación del gen problema y el gen de referencia son aproximadamente iguales y entonces se puede aplicar el método $\Delta\Delta Cq$.

Los datos del análisis de expresión génica son presentados como las veces de cambio de la expresión de un gen normalizado al gen de referencia y relativo a la muestra calibrador. El calibrador es la expresión 1 del gen problema normalizada al gen de referencia. Es decir, se hizo el cálculo de la expresión de cada uno de los genes de lacasa normalizada al gen de β -tubulina y relativa a la muestra control del mismo tiempo, mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

5 Resultados y discusión

5.1 Cinética de crecimiento y producción de lacasa de *P. ostreatus* en medio de producción

Debido a que las características particulares de la cepa de *P. ostreatus* CP-50 y las condiciones de cultivo influyen tanto en la cantidad como en la velocidad de producción de lacasa, primeramente se caracterizó el crecimiento del hongo y la síntesis de lacasa en el medio de producción sin adición de inductores, el cual es el sistema control. La cinética de crecimiento y la cinética de producción de enzima se muestran en la Figura 5.1, donde se observa que la concentración máxima de biomasa de 7.8 g/L se alcanza a las 120 h de cultivo, presentando una velocidad específica de crecimiento, μ , de 0.089 h⁻¹. La actividad extracelular de la enzima se detecta a partir de las 60 h de cultivo alcanzando un máximo de 1.3 U/mL a las 144 h, posteriormente la actividad permanece relativamente constante, es decir no hay un aumento o disminución significativa de la misma.

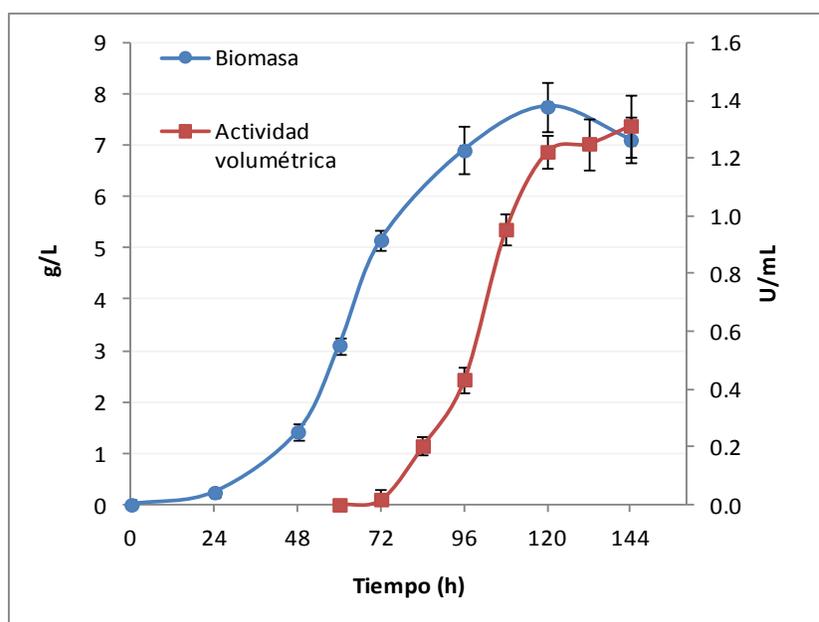


Figura 5-1 Cinética de crecimiento y de producción de lacasa en el medio de producción sin inductores.

5.2 Producción de lacasa en condiciones de inducción

5.2.1 Efecto de diferentes concentraciones de CuSO_4 en la síntesis de lacasa

Se sabe que la adición de iones de Cu^{2+} como CuSO_4 a cultivos de diferentes especies de basidiomicetos puede aumentar eficazmente la síntesis de lacasa. El mejor efecto se ha obtenido en cultivos suplementados durante la fase exponencial de crecimiento en cultivos de *T. pubescens* (Galhaup y Haltrich, 2001), *T. sp* AH28-2 (Xiao et al., 2006) y *L. tigrinus* (Shutova et al., 2008). Dentro del grupo de investigación, dicho efecto se estudió en *P. ostreatus* CP50 al cultivarlo en el medio de producción suplementado con CuSO_4 al inicio y a las 60 h de cultivo; obteniéndose mayores niveles de actividad enzimática cuando se adicionó durante la fase exponencial de crecimiento, esto es a las 60 h (Acevedo, 2009).

Primeramente se estudió la producción de lacasa estimulada con diferentes concentraciones de CuSO_4 cuando se adiciona a las 60 h de cultivo, se evaluaron las concentraciones de 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM de CuSO_4 . En la Figura 5.2 se puede observar un incremento en la actividad de lacasa con respecto a la que se obtiene en el control a las 144 h de cultivo. La adición de 0.25 mM de Cu^{2+} produjo una actividad de 6 U/mL incrementado 4.6 veces lo que se obtiene en el cultivo control, mientras que el mayor incremento en la producción de la enzima se obtuvo al adicionar 1.5 mM de Cu^{2+} elevando su síntesis 12.3 veces al alcanzar una actividad de 16 U/mL a las 144 h. Con las concentraciones de 0.5 y 1 mM de Cu^{2+} se logró un aumento en la actividad de lacasa de 5.4 y 7.1 veces respectivamente. Además cabe destacar que el incremento de actividad de lacasa se lleva a cabo principalmente durante la fase estacionaria, la cual comienza después de las 96 h de cultivo.

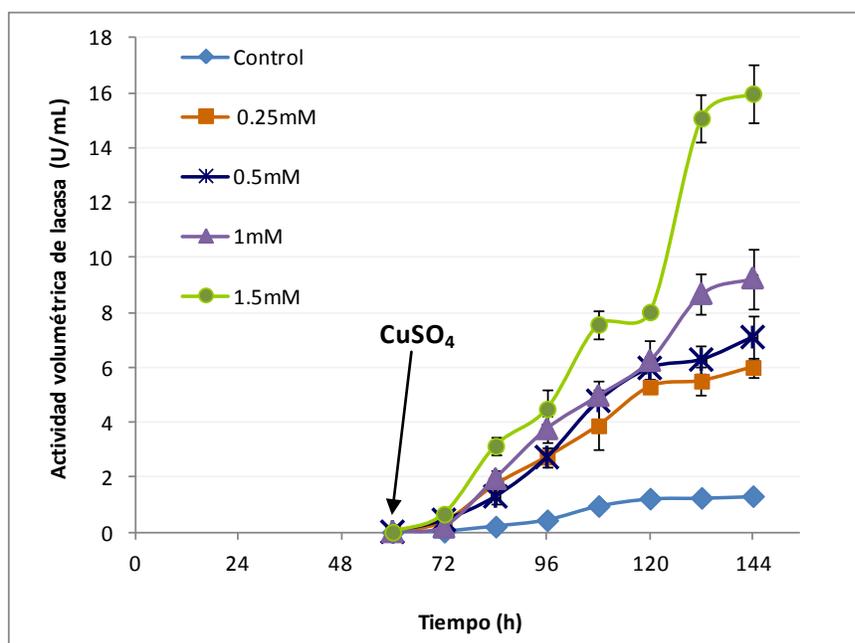


Figura 5-2 Efecto de diferentes concentraciones de CuSO_4 en la actividad volumétrica de lacasa. Evolución de la actividad volumétrica de lacasa (U/mL) al añadir diferentes concentraciones de CuSO_4 (0, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM) a las 60h de cultivo.

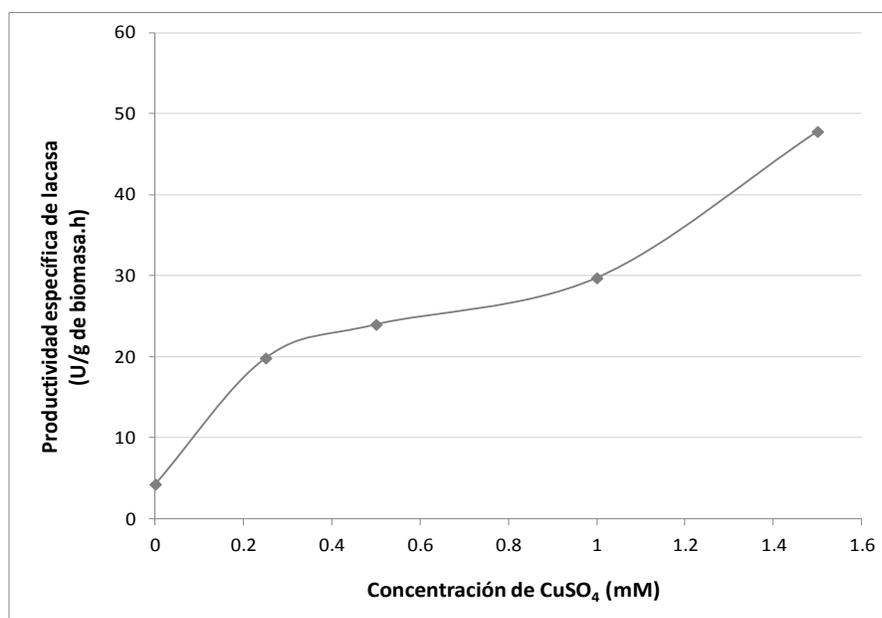


Figura 5-3 Productividad específica de lacasa post-inducción en función de la concentración de CuSO_4 .

Se presenta la productividad específica de lacasa (U de actividad/g de biomasa.h) correspondiente a las concentraciones de CuSO_4 estudiadas: 0, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM. Se calculó partir de la inducción (60 h) hasta el término del cultivo (144 h).

La productividad específica de lacasa se calculó conforme a la ecuación descrita en el apartado 4.6. En la Figura 5.3 se muestra que la productividad específica (U de actividad/g de biomasa.h) aumenta conforme se incrementa la concentración de Cu^{2+} añadido al cultivo, siendo hasta 11.2 veces mayor al añadir 1.5 mM.

Así también, se realizó el cálculo de la productividad específica de lacasa tanto para la fase de crecimiento exponencial (60 a 96 h) como para la fase estacionaria (96 a 144 h). La figura 5.4 muestra que la adición de CuSO_4 propicia un incremento en la productividad específica en ambas fases conforme aumenta la concentración que se añadió al cultivo. En los cultivos inducidos con 0.25, 0.5 y 1 mM de Cu^{2+} , la productividad específica de lacasa es mayor durante la fase de exponencial, mientras que en los cultivos inducidos con 1.5 mM de Cu^{2+} , la productividad específica de lacasa es equiparable en las dos fases. Esto sugiere que a concentraciones más bajas de 1.5 mM de CuSO_4 existe una limitación de iones de Cu^{2+} que no permite lograr un mayor efecto de inducción en ambas fases de crecimiento.

Se ha reportado que el incremento en la actividad volumétrica es proporcional a la cantidad de cobre añadido al cultivo llegando a una concentración óptima para la producción de lacasa, no obstante, si se adiciona Cu^{2+} en exceso, la cantidad de éste metal puede llegar a ser tóxica para el hongo inhibiendo su crecimiento y por consiguiente la síntesis de enzima (Galhaup y Haltrich, 2001, Shutova et al., 2008).

Para el caso de la producción de lacasas por *P. ostreatus* bajo las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente, con las concentraciones evaluadas hasta el momento, no es posible proponer la concentración óptima de CuSO_4 que se debe adicionar al cultivo para lograr el máximo efecto de inducción; pero si se observa una clara correlación entre la concentración de CuSO_4 con el incremento de la actividad volumétrica y de la productividad específica.

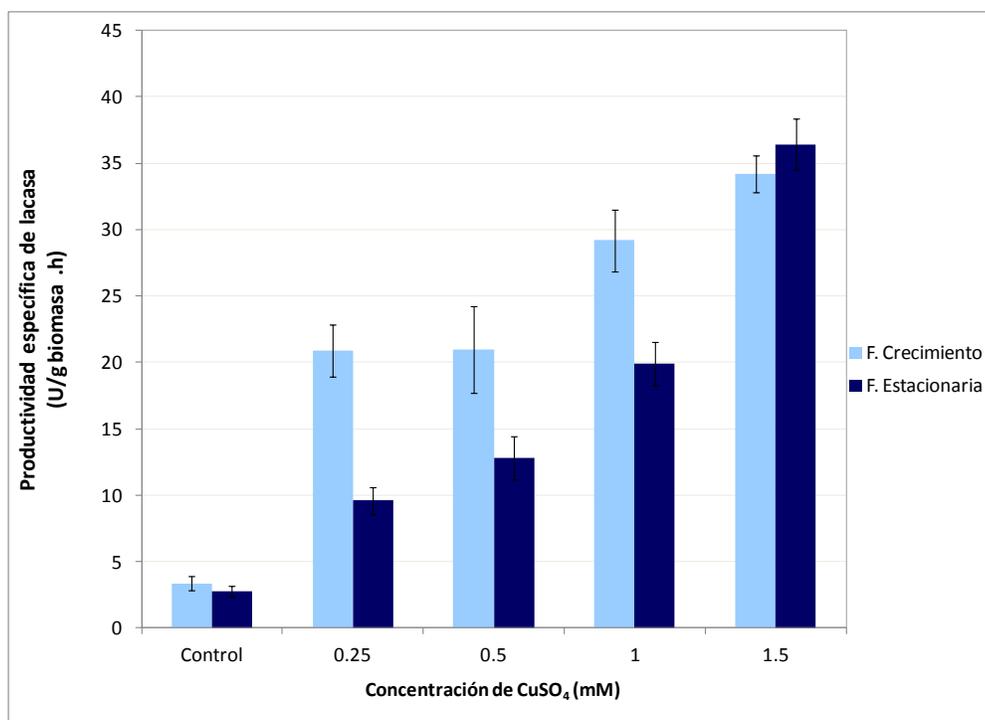


Figura 5-4 Productividad específica de lacasa en las dos fases de cultivo.

Se presenta la productividad específica de lacasa (U de actividad/g de biomasa.h) obtenida tanto en la fase de crecimiento como en la fase estacionaria en los cultivos adicionados con 0, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mM de CuSO₄.

El cobre es tóxico para la mayoría de los hongos, incluso a concentraciones bajas, sin embargo la sensibilidad hacia éste metal puede diferir mucho entre especies y cepas (Baldrian, 2003). Palmieri y colaboradores (2000) reportaron que en los cultivos de una cepa de *P. ostreatus* en un medio rico en nutrientes, la adición de 150 μ M de CuSO₄ al tiempo de inoculación no afectó el crecimiento del hongo.

La presencia del cobre en el medio de cultivo no parece afectar de manera significativa la producción de biomasa ya que en las diferentes concentraciones evaluadas sigue prácticamente la misma evolución. Además, la μ_{max} tiene el valor de $0.089 \text{ h}^{-1} \pm 0.0025$, lo cual indica que no hay un efecto de la presencia y concentraciones usadas de éste metal en el crecimiento del hongo.

Los resultados indican que la adición de CuSO_4 es una estrategia efectiva para elevar significativamente la productividad de lacasa en los cultivos de *P. ostreatus* sin afectar su crecimiento.

5.2.2 Efecto de la adición de CuSO_4 y lignina en la síntesis de lacasas.

Se estudió la producción de lacasas por *P. ostreatus* CP50 en el medio de producción suplementado las 60 h de cultivo con 0.5 g/L de lignina y dos concentraciones de CuSO_4 : 0.5 y 1 mM, (ver Figura 5.5). Se obtuvo una actividad de 12.7 U/mL a las 144h cuando se adicionó al medio 0.5 mM CuSO_4 y 0.5 g/L de lignina siendo 9.8 veces que la producida en el control y 1.8 veces con inducción de 0.5 mM Cu^{2+} . De las diferentes condiciones de inducción estudiadas, la mayor producción de lacasa a las 144h se obtuvo al adicionar 1 mM CuSO_4 y 0.5 g/L de lignina, llegando a las 22.2 U/mL lo cual significa un incremento de 17 veces con respecto al control.

La adición de CuSO_4 y lignina parece tener un efecto aditivo, ya que es mayor el incremento en la actividad volumétrica cuando se adicionan ambos inductores en comparación cuando únicamente se adiciona CuSO_4 . Los compuestos fenólicos derivados de la lignina pueden incrementar la producción de enzimas ligninolíticas, incluyendo a la lacasa; por lo tanto la lignina adicionada en solución al medio puede degradarse en compuestos fenólicos que sumándose al efecto inductor del cobre incrementan la producción de la enzima.

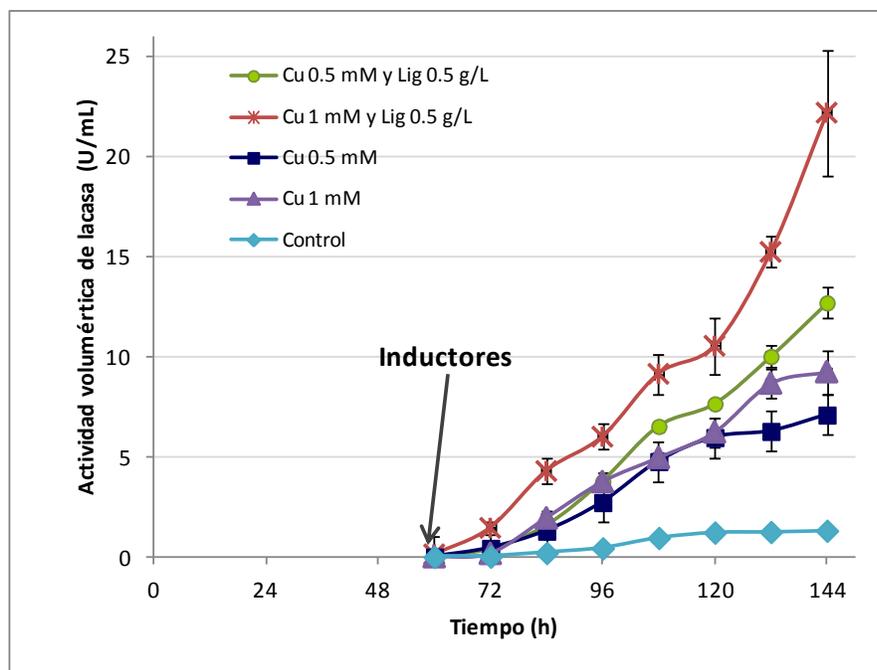


Figura 5-5 Actividad volumétrica de lacasa producida en medio suplementado con CuSO_4 y lignina.

5.3 Perfil de isoenzimas

Con el fin de estudiar si la concentración de CuSO_4 ejerce una influencia sobre la síntesis de varias isoformas de lacasa, mediante geles de poliacrilamida en condiciones nativas se analizó el mismo volumen de muestras de caldo de cultivo que se tomaron a diferentes tiempos (cada 24 h a partir de las 72 h). En la Figura 5.6 se muestra que sólo se presentaron dos bandas de actividad en el gel correspondiente al cultivo control.

Para analizar el perfil de isoenzimas que se presentaba para cada una de las diferentes concentraciones de CuSO_4 estudiadas, las bandas de actividad en los zimogramas se revelaron con DMP. Como se observa en la Figura 5.7, para todas las muestras se detectaron 2 bandas de actividad; así también la banda inferior va aumentando conforme al tiempo y se presenta con mayor intensidad que la superior para todas las concentraciones CuSO_4 que se estudiaron. La presencia de cobre en el

medio de cultivo no induce la producción de una isoenzima diferente a las que se producen en el control.

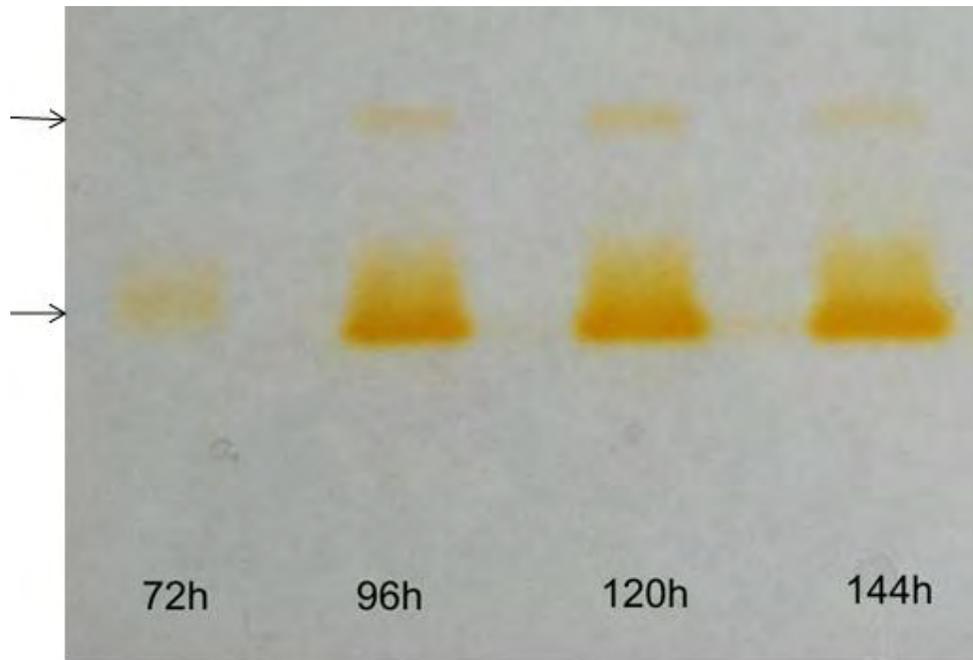


Figura 5-6 Zimograma que muestra el perfil de isoenzimas de lacasa producidas en el cultivo control.

Se analizó el mismo volumen de cada una de las muestras y se reveló con DMP.

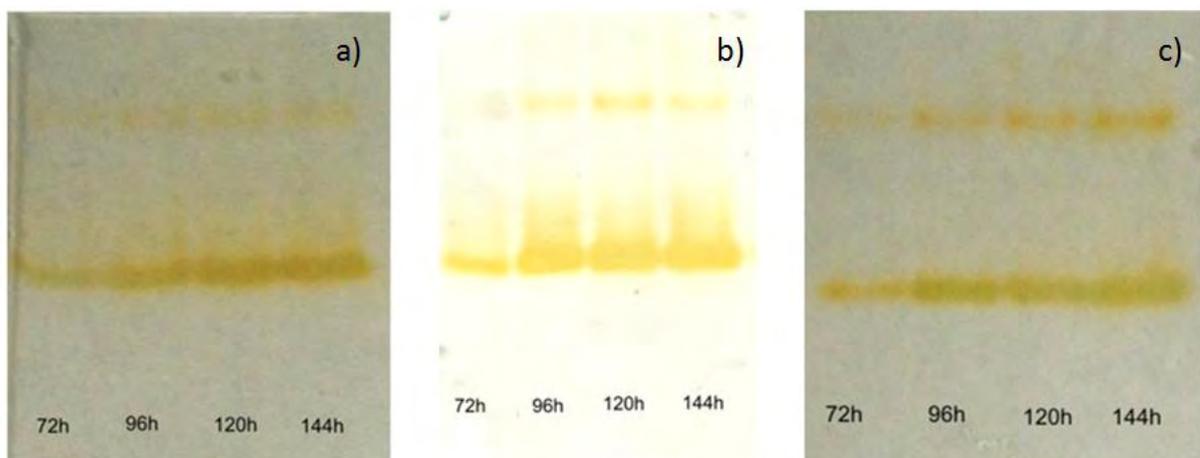


Figura 5-7 Zimograma que muestra el perfil de isoenzimas de lacasa producidas en presencia de diferentes concentraciones de CuSO_4 .

Se muestra el gel revelado con DMP en el cual se analizó el mismo volumen para cada una de las condiciones: a) 0.25 mM b) 1mM c) 1.5 mM.

5.4 Aislamiento y caracterización del ADNc que codifica para las lacasas producidas en condiciones de inducción.

Al micelio obtenido de los cultivos de *P. ostreatus* en condiciones de inducción (adición de CuSO₄ a las 60 h) se le realizó la extracción de ARN total y posteriormente se llevó a cabo la síntesis de ADNc. Para la reacción de PCR se usó como templado el ADNc obtenido y una de las 4 posibles combinaciones de oligonucleótidos para lacasas obtenidos a partir de las regiones conservadas de los sitios de unión a cobre (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Combinaciones de oligonucleótidos .

Combinación de oligonucleótidos	Tamaño esperado de producto de PCR (bp)
1.- LacF-Cu4R	580
2.- LacF-Cu3R	425
3.- Cu1F-Cu4R	1150
4.- Cu1F-Cu3R	1015

Para poder caracterizar los fragmentos de los genes de lacasa, la banda obtenida mediante PCR con la combinación de oligonucleótidos número 3 (Cu1F-Cu4R) se clonó y se seleccionaron 12 clonas mediante un ensayo de restricción, posteriormente se secuenciaron dichas clonas. Mediante el programa Blastx, se analizaron las secuencias parciales de los genes de lacasas con las secuencias de genes de las bases de datos, las cuales coincidieron con secuencias previamente reportadas para lacasas producidas por *P. ostreatus*: *poxc*, *pox3* y *poxa3*. Esto indica que *P. ostreatus* CP50 cultivado en el medio de producción suplementado con cobre expresa al menos tres isoenzimas diferentes cuyas principales características se resumen en la Tabla 5.2.

Estos resultados, concuerdan con lo reportado por Giardina y colaboradores (1996), siendo POXC la isoenzima mayormente producida bajo diferentes condiciones de crecimiento. Por otra parte también se comprobó el efecto de inducción del cobre al aumentar los transcritos del gen *poxc* y la cantidad de ésta isoenzima en el caldo de cultivo (Palmieri et al., 2000). Dos isoenzimas heterodiméricas estrechamente relacionadas POXA3a y POXA3b, se purificaron de cultivos suplementados con cobre, un único gen (*poxa3*) codifica la subunidad grande y a través de splicing alternativo se producen las dos variantes (Palmieri et al., 2003). Recientemente se reportó la expresión heteróloga del gen *pox3* en cultivos con adición y sin adición de 150 μM de CuSO_4 o de 150 μM de CuSO_4 mas 2mM de ácido ferúlico, sin embargo, no se ha detectado la producción de POX3 en cultivos de *P. ostreatus* (Pezzella et al., 2009). Lo anterior indica que los genes de lacasa detectados en los cultivos adicionados con CuSO_4 coinciden con las isoenzimas previamente reportadas que se producen en cultivos suplementados con este metal.

Tabla 5.2 Genes de lacasa que se expresan en las condiciones de inducción

GEN	PROTEINA	PM (kDa)	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
<i>poxc</i>	POXC	59	Mayormente producida en diversas condiciones de cultivo	(Palmieri et al., 2000)
<i>pox3</i>	rPOX3	61	Obtenida por expresión heteróloga	(Pezzella et al., 2009)
<i>poxa3</i>	POXA3a	85	Enzimas heterodiméricas	(Palmieri et al., 2003)
	POXA3b	83		

5.5 Desarrollo del método para realizar el análisis transcripcional

5.5.1 Extracción y calidad de ARN

La integridad y pureza del ARN es crítica para el análisis de expresión génica. La calidad y pureza del ARN total se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa, la presencia de dos bandas bien definidas correspondientes al ARN ribosomal, sin barrido entre ellas y en una proporción 2:1(28s:18s) se tomó como criterio de integridad y calidad (Figura 5.8).

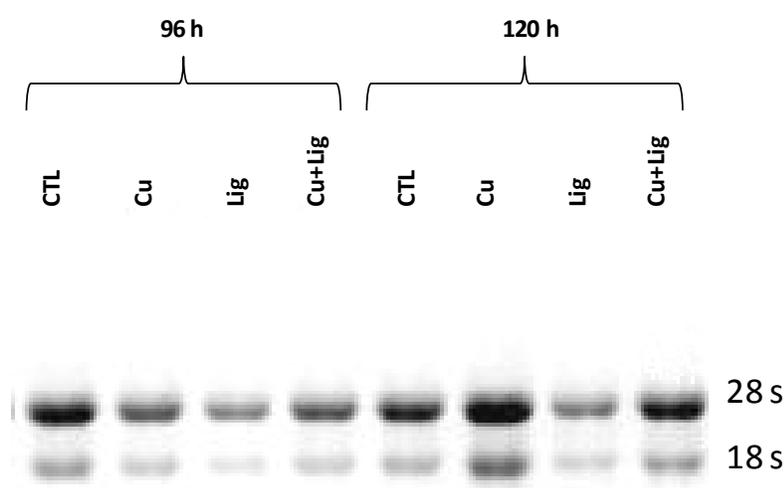


Figura 5-8 Integridad de ARNtotal

Gel de agarosa al 1%, se cargó 2 μ l de ARNtotal en cada pozo. La presencia de dos bandas bien definidas correspondientes al ARN ribosomal confirmó la integridad de las muestras. CTL=control, Cu=inducción con CuSO₄, Lig=inducción con lignina, Cu+Lig=inducción combinada de CuSO₄ y lignina.

5.5.2 Selección de gen de referencia y calibrador

Los genes de referencia comúnmente utilizados son constitutivos y necesarios para la sobrevivencia básica de la célula, como por ejemplo GADPH, albúminas, actinas, tubulinas, ARNr 18s o 28s. El gen de referencia que seleccionó fue el de β -tubulina. Para analizar los perfiles de transcripción de las diferentes isoenzimas a distintos

tiempos se hizo en comparación con la muestra obtenida del cultivo control con los cultivos inducidos para cada tiempo estudiado.

5.5.3 Validación del método

Un paso importante para la aplicación de la qPCR es evaluar la eficiencia de amplificación de los genes a estudiar la cual se obtiene al graficar el ciclo de cuantificación (Cq) en función del logaritmo de la concentración de ADNc. Una pendiente cercana a -3.32 implica una eficiencia del 100%, lo que significa que la cantidad del amplicón se duplica en cada ciclo. Una eficiencia de amplificación menor al 85% no es confiable para realizar una correcta cuantificación, de tal forma que pendientes en un rango de -3.1 a -3.7 son aceptables. En la figura 5.9 se muestra el ajuste de mínimos cuadrados que se realizó para calcular la eficiencia de amplificación de los tres genes y en la tabla 5.3 se muestra el valor obtenido para la pendiente y la eficiencia calculada.

El intervalo dinámico de concentraciones debe ser determinado para cada transcrito con el fin de garantizar que la cuantificación se realice siempre en la región lineal de la curva. Los resultados obtenidos al evaluar diluciones seriales muestran que la mínima cantidad de ADNc que puede ser amplificada manteniendo reproducibilidad es de 25 ng, de tal forma que los tres genes presentaron un intervalo dinámico reducido: de 25 a 200 ng. La concentración que se escogió para realizar los ensayos de qPCR fue de 50 ng. Cabe mencionar que para el caso de *poxa3* debido a que presentó muy baja expresión era necesario utilizar concentraciones de ADNc muy altas para poder realizar una cuantificación confiable, no obstante esto representa limitaciones técnicas, por consiguiente no se cuantificó su expresión.

Tabla 5.3 Eficiencias de amplificación

Tub	poxc	pox3
m= -3.30	m= -3.26	m= -3.49
E= 100.09 %	E= 102.6%	E= 93.8%

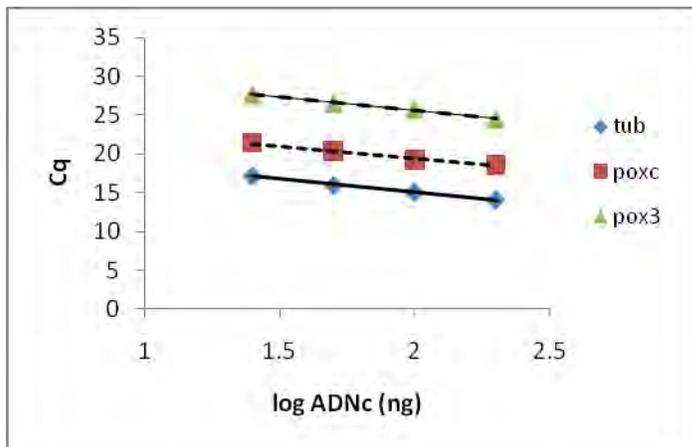


Figura 5-9 Eficiencia de amplificación de los transcritos.

Cálculo de la eficiencia de amplificación de los 3 genes mediante un ajuste de mínimos cuadrados.

Una de las condiciones que se deben cumplir para utilizar el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta Cq$ y asegurarnos de obtener una estimación confiable de la expresión relativa de un gen es que la eficiencia del gen problema y la del gen de referencia sean aproximadamente iguales. Para determinar si dos reacciones de qPCR tienen la misma eficiencia de amplificación y para determinar el intervalo de confianza dentro del cual el método de cuantificación relativa puede ser empleado, la variación de ΔCq en función del logaritmo de la concentración de ADNc se analizó mediante un ajuste de mínimos cuadrados, idealmente el valor absoluto de la pendiente de la curva debe ser menor a 0.1 (horizontal casi perfecta) implicando eficiencias de amplificación similares (Figura 5.10).

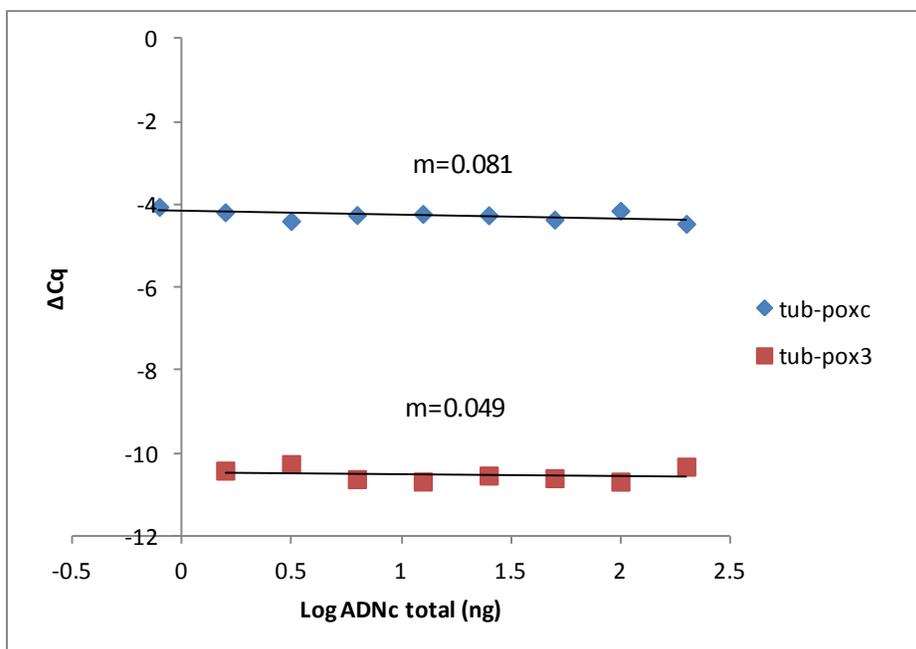


Figura 5-10 Curva de validación del método $\Delta\Delta Cq$.

El ΔCq de la combinación del gen de referencia-gen problema se graficó en función del logaritmo de la concentración de ADNc. Una pendiente menor a 0.1 fue el criterio para considerar válido el método de cuantificación.

5.6 Efecto de los inductores en la actividad volumétrica y en la transcripción de lacasas.

5.6.1 Actividad volumétrica.

En la figura 5.11 se muestra la actividad volumétrica de lacasa de los 8 experimentos que forman parte del diseño experimental. A las 96 h, la actividad en los cultivos suplementados con lignina es muy similar a la del control, mientras que en los cultivos que contienen cobre aumenta varias veces. A las 120 h los cultivos inducidos presentan mayor actividad que el control alcanzando un máximo de 14 U/mL con la adición de cobre+lignina, mientras que la actividad volumétrica del cultivo inducido con lignina sólo es un poco mayor que el control. El incremento de la actividad de lacasa se correlaciona con la presencia de $CuSO_4$ en el medio de cultivo, así pues el

cobre es el factor que ejerce un efecto significativo, mientras que el efecto de la lignina es residual y se observa hasta las 120 h.

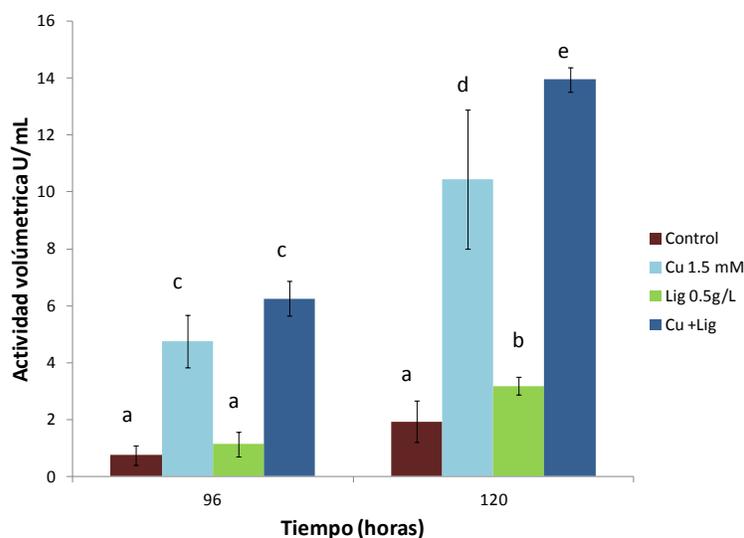


Figura 5-11 Actividad volumétrica correspondiente a los tratamientos del diseño experimental. Se muestra la actividad volumétrica correspondiente a los 4 tratamientos y a los dos tiempos que se estudiaron para evaluar la inducción mediante el diseño experimental.

5.6.2 Expresión de genes de lacasa

Mediante qPCR se analizaron los perfiles de transcripción de los genes de lacasa en respuesta a la presencia de cobre y/o lignina como inductores comparando con los cultivos control a 96 y 120 h (Figura 5.12). El gen *pox3* se expresa de manera constitutiva en los dos tiempos analizados y no se observan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, por lo tanto ni el cobre ni la lignina tienen efecto en su transcripción.

Por otra parte, los resultados muestran que existe un incremento en el nivel de expresión de *poxc*, siendo los niveles más altos los obtenidos en los cultivos a 120 h. Se observa claramente que el CuSO_4 ejerce un efecto positivo sobre la transcripción de *poxc* ya que propicia su aumento tanto a 96 h como a 120 h con respecto al cultivo control.

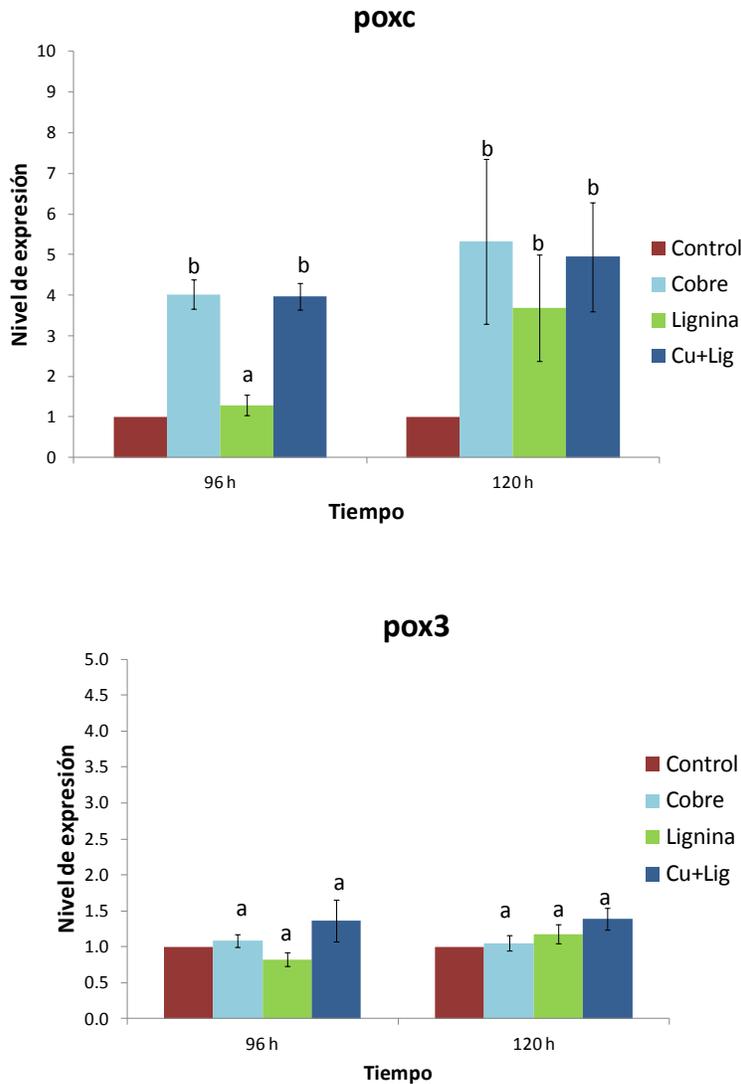


Figura 5-12 Efecto de la adición de cobre y/o lignina en la expresión de los genes de lacasa. Se muestra la expresión relativa de los genes *poxc* y *pox3* en 3 condiciones diferentes de inducción: cobre, lignina y cobre+lignina; la cual se determinó a las 96 y 120 h de cultivo y se representa como el cociente normalizado al gen β -tubulina y al cultivo control del mismo tiempo. Los datos representan la media y la desviación estándar de triplicados.

Los resultados con los cultivos adicionados con CuSO_4 demuestran que los iones de cobre ejercen un efecto inductor sobre la regulación de la transcripción del gen *poxc* ya que se propicia un incremento en el nivel de ARNm. A las 96 h no se observa ningún efecto de la lignina en el nivel de transcritos, sólo hasta las 120 h se puede

apreciar el efecto inductor al aumentar casi cuatro veces el nivel de ARNm con respecto al control. Esto puede deberse a que la lignina siendo un polímero complejo no puede actuar como inductor. Sin embargo, la lacasa que se secreta al principio es capaz de actuar sobre la lignina haciendo posible la liberación de los monómeros que la componen; éstos monómeros con grupos fenólicos son los que propician la inducción del gen *poxc* y el incremento en la actividad volumétrica que se observa posteriormente a las 120 h.

Cabe destacar que los resultados obtenidos para la actividad volumétrica concuerdan con los datos de la expresión del gen *poxc*, resaltando el efecto positivo de la adición de CuSO_4 en los dos tiempos analizados y un efecto menor de la lignina que se presenta a 120 h. Por lo tanto es posible inferir que el notable aumento en la actividad volumétrica de los cultivos adicionados con cobre (cobre y Cu+Lig) se debe principalmente a la acumulación de POXC en el medio. Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que otra isoenzima no estudiada en este trabajo, contribuya a la actividad lacasa obtenida, ya que en el genoma de *P. ostreatus* se han detectado al menos 12 genes que codifican para lacasa (Giardina et al., 2010).

También se analizó la expresión de *poxc* y *poxa3* en el sistema control a 96 h y 120 h, usando como calibrador la muestra a las 60 h, con la finalidad de observar variabilidad (aumento o decremento) en su expresión a lo largo del cultivo. Los datos obtenidos muestran que la expresión de estos genes a las 96 y 120 h no tiene variaciones significativas con respecto a las 60 h ya su nivel de expresión se mantuvo en un valor de 1 (datos no mostrados).

El aumento de la actividad de lacasa y la expresión diferencial de los genes que se observó mediante el análisis transcripcional se puede deber a diferentes factores:

a) Los hongos producen lacasa como respuesta a la toxicidad de las sales de cobre. En levaduras, los iones de cobre pueden regular la biosíntesis de varias proteínas a nivel transcripcional. La expresión de un subconjunto de genes se activa como

respuesta a niveles elevados de sales de cobre en el medio de cultivo. Dichas proteínas pueden actuar como quelantes de los iones de cobre disminuyendo su capacidad tóxica en el interior de la célula (Winge et al., 1997). Los factores de transcripción que se activan en respuesta al cobre regulan la expresión de los genes que codifican para proteínas involucradas en la protección hacia la toxicidad del cobre. Se ha propuesto que una función de la producción de lacasas es ser un mecanismo de defensa en contra del estrés oxidativo ocasionado por el cobre, jugando un papel en la homeostasis y desintoxicación de éste metal; dicha función se atribuye a que los iones de cobre son quelados durante la síntesis de la enzima debido a los sitios de unión a cobre. Sin embargo, para *T. pubescens* MB 89, Galhaup y Haltrich (2001) demostraron que la cantidad de cobre que se queló por la síntesis de lacasa fue menos del 0.3% del total que se adicionó durante el cultivo. Lo anterior sugiere que los hongos utilizan otros mecanismos para combatir el efecto nocivo causado por los iones de cobre como son los complejos intracelulares de metalotioneínas y la formación de pigmentos como la melanina. La melanina se encuentra principalmente en la pared celular aunque también existe como un polímero extracelular; este pigmento posee una variedad de grupos funcionales que ofrecen múltiples sitios de unión a iones metálicos como Cu, Zn y Cd. Se ha propuesto que melanina puede servir como una barrera física en contra del alto nivel de iones de cobre en el medio ya que los hongos con melanina pueden resistir altas concentraciones de metales (Fogarty y Tobin, 1996, Fomina y Gadd, 2003). La síntesis de melanina puede ser catalizada por fenol oxidasas como la lacasa (Eisenman et al., 2007), por consiguiente la inducción de lacasas por cobre puede ser un mecanismo mediante el cual se asegura la biosíntesis de melanina en cantidades significativas para contrarrestar el efecto nocivo de este metal.

b) *Los elementos reguladores en la región promotora de los genes de lacasa.* A través del análisis de la región promotora de los genes de lacasa se ha podido correlacionar la presencia de los elementos de respuesta con el efecto observado sobre la

transcripción génica. Gracias a que recientemente se secuenció el genoma de *P. ostreatus* fue posible hacer un análisis *in silico* de las regiones promotoras de todos los genes de lacasa identificando distintos elementos de respuesta putativos distribuidos a lo largo de la secuencia del promotor (Figura 2.7) (Piscitelli et al., 2011). La presencia de MRE (Metal Responsive Element) puede originar un alto nivel de transcritos debido a los metales. Las secuencias de los MREs son similares a la secuencia consenso (5'-TGCRNC-3') que se ha identificado en los promotores de los genes de metalotioneínas (mt) (Thiele, 1992). La regulación de la transcripción por metales de los genes de mt se ha caracterizado ampliamente, en los eucariontes superiores los promotores de mt contienen múltiples copias de MREs que son las responsables de la inducción de la transcripción debido a metales pesados como Cd, Cu y Zn. La regulación de los genes de mt ocurre a través de una proteína de regulación por metales que funciona como un receptor de iones metálicos y como factor de transcripción. A pesar de que se ha sugerido que la inducción de la transcripción de los genes de lacasa por efecto del cobre puede ser similar a la de los genes de mt, aún se desconoce el mecanismo.

Las variaciones en la ubicación y la cantidad de elementos XRE (Xenobiotic Responsive Element) y ARE (Antioxidant Responsive Element) pueden resultar en una amplia variedad de respuestas a los compuestos aromáticos dando lugar a una expresión diferencial de los múltiples genes de lacasa (Soden y Dobson, 2003, Xiao et al., 2006)

Al hacer el análisis de las regiones promotoras de los genes que se estudiaron (*poxc*, *pox3* y *poxa3*) para estimar la incidencia de los elementos de respuesta que podrían correlacionar con el efecto de la adición de cobre y lignina en el medio, se encontró que los 3 genes presentan varios MRE y XRE ó ARE (Tabla 5.4). Cabe señalar que el promotor de *poxc* contiene la mayor cantidad de elementos de respuesta. Si bien, los elementos XRE y ARE se correlacionan con el efecto inductor debido a los

compuestos aromáticos, no se observó un efecto significativo de la lignina en los niveles de transcripción de los genes *poxc* y *pox3*.

Tabla 5.4 Incidencia de los elementos de respuesta en los genes de lacasa estudiados.

Gen	Elementos de respuesta
<i>poxc</i>	4 MRE, 1 XRE
<i>pox3</i>	5 MRE, 2 ARE
<i>poxa3</i>	4 MRE, 1 XRE

El comportamiento de la expresión de los genes *poxc* y *poxa3* en las condiciones de inducción estudiadas se puede justificar si se considera que en sus regiones promotoras existen diversos elementos de respuesta, de tal manera que no solamente están actuando los elementos MRE, XRE y ARE, por lo tanto su regulación como respuesta a diferentes condiciones fisiológicas y condiciones en el ambiente extracelular se debe a la presencia de los diferentes elementos de respuesta que en conjunto activan o reprimen su expresión.

c) *Las diferentes isoenzimas tienen roles distintos en el ciclo de vida del hongo.*- Las diferentes isoenzimas que forman parte de la familia génica de lacasas pueden tener diversas funciones durante el ciclo de vida del hongo, por lo tanto los múltiples genes de lacasa se pueden expresar diferencialmente dependiendo de la etapa de desarrollo o condición fisiológica del organismo.

El análisis del perfil de transcripción de MCOs realizado para el hongo ectomicorrizo *Laccaria bicolor* mostró que los genes de lacasa se expresan diferencialmente en función de la etapa fisiológica y condiciones de crecimiento. Los transcritos de *lcc3* y *lcc8* fueron muy abundantes en las ectomicorrizas, en los cuerpos fructíferos hubo una mayor expresión de *lcc7* mientras que en el micelio crecido en agar enriquecido

con glucosa se expresaron mayormente *lcc9* y *lcc10*; estos resultados sugieren una función particular para cada una de éstas isoenzimas (Courty et al., 2009)

En los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* se identificó a la isoenzima LACC12, debido a que ésta isoenzima no se ha encontrado en el micelio activo, se sugiere que podría tener una función específica en el desarrollo de los cuerpos fructíferos (Lettera et al., 2010). Es importante mencionar que a la fecha no se conocen las funciones fisiológicas de las isoenzimas *poxc*, *pox3* y *poxa3*, pero es muy probable que presenten roles específicos durante las diferentes etapas fisiológicas o de crecimiento del hongo.

Los estudios sobre la regulación transcripcional de los genes de lacasa que se han reportado hasta ahora, apuntan hacia un sistema de regulación bastante complejo que va más allá de la regulación que se ejerce por los diversos elementos de respuesta que se encuentran en el promotor de los genes, ya que la expresión también es influenciada por la etapa de desarrollo o condición fisiológica en la cual se encuentre el hongo (fase exponencial, fase estacionaria, formación de cuerpos fructíferos, pigmentación, patogénesis, etc.). Si se considera que la expresión de los genes de lacasa se regula por una serie de factores que actúan de manera sinérgica o antagónica y que en las diferentes fases de desarrollo del micelio ocurren mecanismos que también modulan los niveles de expresión de las diferentes isoenzimas, se puede explicar el hecho de que la lignina no ejerza un efecto inductor significativo y que la expresión del gen *pox3* permanezca constante en las diferentes condiciones y tiempos estudiados a pesar de la existencia de 5 MRE y 2 ARE en su región promotora.

Finalmente se puede inferir que la regulación génica de lacasas es un fenómeno muy complejo y con la información que se dispone en la actualidad aún no es posible precisar los mecanismos moleculares que la rigen. Una comprensión completa de los mecanismos mediante los cuales la transcripción es regulada por metales o compuestos aromáticos, requiere una comprensión de cómo las células fúngicas pueden percibir, transportar, distribuir y responder a este tipo de moléculas. Por lo

tanto con el fin de incrementar la productividad de lacasas fúngicas nativas, resulta de gran interés realizar estudios dirigidos a descifrar y esclarecer los mecanismos moleculares de la regulación de la expresión de los genes de lacasa, así como identificar todos los elementos involucrados en dicha regulación.

De esta manera, en el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de dos inductores (lignina y CuSO_4) por separado y de manera combinada para incrementar la producción de lacasa. Así también se hizo el análisis del efecto de la concentración de CuSO_4 tanto en la actividad volumétrica como en la productividad específica de lacasa en *P. ostreatus* CP50 y por primera vez se estudió el efecto de la lignina a nivel transcripcional.

6 Conclusiones

- La adición de diferentes concentraciones de cobre al medio de cultivo durante la fase de crecimiento (a las 60 h de cultivo) estimula eficazmente la producción de lacasas de *P. ostreatus* CP50, incrementado hasta 12.3 veces la actividad volumétrica con 1.5 mM de CuSO₄, respecto al control.
- *P. ostreatus* CP50 | cultivado en las condiciones de estudio, expresa los genes que codifican para lacasa: *poxc*, *pox3* y *poxa3*.
- La expresión del gen *poxa3* bajo las condiciones de estudio es insuficiente para poder llevar a cabo un análisis de transcripción.
- Mediante qPCR se estableció que el cobre induce la transcripción del gen *poxc*.
- La presencia de cobre y/o lignina no afecta la transcripción del gen *pox3* en las condiciones estudiadas.
- El aumento en la actividad volumétrica de lacasa puede deberse al efecto inductor del cobre en la expresión de *poxc*. Sin embargo, no se descarta la participación de otras lacasas no caracterizadas en este trabajo

7 Perspectivas

Como en el estudio realizado solo se analizó la expresión de los genes de lacasa (*poxc* y *pox3*) a 36 y 60 h después de la inducción, resulta interesante hacer el análisis transcripcional en periodos más largos de tiempo. Esto permitirá conocer si el cobre sigue incrementando el nivel de transcritos de *poxc* y si el efecto de la lignina sobre la expresión de *poxc* se incrementa después de las 120 h de cultivo, así como observar si la expresión de *pox3* aumenta en las etapas posteriores del cultivo.

Con respecto a la identificación de cada gen con la isoenzima que codifica, se propone secuenciar las isoenzimas que se producen en los cultivos de *P. ostreatus*, esto con el fin de especificar a cual gen corresponde cada una de las bandas de actividad de lacasa que se observan en el zimograma.

Hacer un estudio sobre el efecto de concentraciones más altas de cobre y lignina así como analizar otros tiempos de inducción.

Evaluar la inducción debida a compuestos relacionados con la lignina (ácido ferúlico, xilidina, dimetoxifenol, guaiacol, etc) para estudiar su posible efecto sobre la actividad volumétrica de lacasa y estudiar la expresión diferencial de los genes de lacasa por *P. ostreatus*.

8 Bibliografía

- ACEVEDO, Q. A. 2009. *Estudio cinético de la producción de lacasas por Pleurotus ostreatus CP50 en medios complejos.*, Instituto Tecnológico de Zacatepec.
- ALCALDE, M., BULTER, T. & ARNOLD, F. H. 2002. Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *J Biomol Screen*, 7, 547-53.
- AMANULLAH, A., SERRANOCARREON, L., CASTRO, B., GALINDO, E. & NIENOW, A. W. 1998. The influence of impeller type in pilot scale Xanthan fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 95-108.
- ANTORINI, M., HERPOEL-GIMBERT, I., CHOINOWSKI, T., SIGOILLOT, J. C., ASTHER, M., WINTERHALTER, K. & PIONTEK, K. 2002. Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. *Biochim Biophys Acta*, 1594, 109-14.
- ARAKANE, Y., MUTHUKRISHNAN, S., BEEMAN, R. W., KANOST, M. R. & KRAMER, K. J. 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.
- BALDRIAN, P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 78-91.
- BALDRIAN, P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*, 30, 215-42.
- BERTRAND, T., JOLIVALT, C., BRIOZZO, P., CAMINADE, E., JOLY, N., MADZAK, C. & MOUGIN, C. 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*, 41, 7325-7333.
- BOURBONNAIS, R., PAICE, M. G., FREIERMUTH, B., BODIE, E. & BORNEMAN, S. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4627-4632.
- CALL, H. P. & MUCKE, I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym(R)-process). *Journal of Biotechnology*, 53, 163-202.
- CLAUS, H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35, 93-96.
- COLLINS, P. J. & DOBSON, A. D. W. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3444-3450.
- CONTRERAS, O. M. A. 2009. *Caracterización de lacasas producidas por Pleurotus ostreatus en cocultivo con Trichoderma viride en medio líquido.*
- COURTY, P. E., HOEGGER, P. J., KILARU, S., KOHLER, A., BUEE, M., GARBAYE, J., MARTIN, F. & KUES, U. 2009. Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 182, 736-750.

- COUTO, S. R., GUNDIN, M., LORENZO, M. & SANROMAN, M. N. 2002. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*, 38, 249-255.
- COUTO, S. R., SANROMAN, M. A., HOFER, D. & GUBITZ, G. M. 2004. Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorization of dyes from a leather factory. *Engineering in Life Sciences*, 4, 233-238.
- CHRISTENSON, A., DIMCHEVA, N., FERAPONTOVA, E. E., GORTON, L., RUZGAS, T., STOICA, L., SHLEEV, S., YAROLOPOV, A. L., HALTRICH, D., THORNELEY, R. N. F. & AUST, S. D. 2004. Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes. *Electroanalysis*, 16, 1074-1092.
- DE SOUZA, C. G., TYCHANOWICZ, G. K., DE SOUZA, D. F. & PERALTA, R. M. 2004. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J Basic Microbiol*, 44, 129-36.
- DE SOUZA, D. F., TYCHANOWICZ, G. K., DE SOUZA, C. G. & PERALTA, R. M. 2006. Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. *J Basic Microbiol*, 46, 126-34.
- DEKKER, R. F. H., BARBOSA, A. M., GIESE, E. C., GODOY, S. D. S. & COVIZZI, L. G. 2007. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Microbiology*, 10, 177-185.
- DITTMER, N. T., SUDERMAN, R. J., JIANG, H. B., ZHU, Y. C., GORMAN, M. J., KRAMER, K. J. & KANOST, M. R. 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.
- DUCROS, V., BRZOSOWSKI, A. M., WILSON, K. S., BROWN, S. H., OSTERGAARD, P., SCHNEIDER, P., YAVER, D. S., PEDERSEN, A. H. & DAVIES, G. J. 1998. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat Struct Biol*, 5, 310-6.
- EGGERT, C., TEMP, U. & ERIKSSON, K. E. L. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1151-1158.
- EISENMAN, H. C., MUES, M., WEBER, S. E., FRASES, S., CHASKES, S., GERFEN, G. & CASADEVALL, A. 2007. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology-Sgm*, 153, 3954-3962.
- ELISASHVILI, V. & KACHLISHVILI, E. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, 144, 37-42.
- ENGUITA, F. J., MARTINS, L. O., HENRIQUES, A. O. & CARRONDO, M. A. 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component - A laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 19416-19425.

- FARACO, V., GIARDINA, P. & SANNIA, G. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology-Sgm*, 149, 2155-2162.
- FERRARONI, M., MYASOEDOVA, N. M., SCHMATCHENKO, V., LEONTIEVSKY, A. A., GOLOVLEVA, L. A., SCOZZAFAVA, A. & BRIGANTI, F. 2007. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. *Bmc Structural Biology*, 7.
- FOGARTY, R. V. & TOBIN, J. M. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 311-317.
- FOMINA, M. & GADD, G. M. 2003. Metal sorption by biomass of melanin-producing fungi grown in clay-containing medium. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78, 23-34.
- GALHAUP, C., GOLLER, S., PETERBAUER, C. K., STRAUSS, J. & HALTRICH, D. 2002a. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology-Sgm*, 148, 2159-2169.
- GALHAUP, C. & HALTRICH, D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 225-232.
- GALHAUP, C., WAGNER, H., HINTERSTOISSER, B. & HALTRICH, D. 2002b. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 529-536.
- GARAVAGLIA, S., CAMBRIA, M. T., MIGLIO, M., RAGUSA, S., LACOBAZZI, V., PALMIERI, F., D'AMBROSIO, C., SCALONI, A. & RIZZI, M. 2004. The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *Journal of Molecular Biology*, 342, 1519-1531.
- GE, H. H., GAO, Y. X., HONG, Y. Z., ZHANG, M., XIAO, Y. Z., TENG, M. K. & NIU, L. W. 2010. Structure of native laccase B from *Trametes* sp AH28-2. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications*, 66, 254-258.
- GIANFREDA, L., XU, F. & BOLLAG, J. 1999. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*, 3, 1-25.
- GIARDINA, P., AURILIA, V., CANNIO, R., MARZULLO, L., AMORESANO, A., SICILIANO, R., PUCCI, P. & SANNIA, G. 1996. The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Eur J Biochem*, 235, 508-15.
- GIARDINA, P., CANNIO, R., MARTIRANI, L., MARZULLO, L., PALMIERI, G. & SANNIA, G. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol*, 61, 2408-13.
- GIARDINA, P., FARACO, V., PEZZELLA, C., PISCITELLI, A., VANHULLE, S. & SANNIA, G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci*, 67, 369-85.

- GIARDINA, P., PALMIERI, G., SCALONI, A., FONTANELLA, B., FARACO, V., CENNAMO, G. & SANNIA, G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*1. *Biochem J*, 341 (Pt 3), 655-63.
- GOUDOPOULOU, A., KRIMITZAS, A. & TYPAS, M. A. 2010. Differential gene expression of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* grown on olive oil mill wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol*, 88, 541-51.
- 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 Biology*, 9, 601-605.
- HOSHIDA, H., NAKAO, M., KANAZAWA, H., KUBO, K., HAKUKAWA, T., MORIMASA, K., AKADA, R. & NISHIZAWA, Y. 2001. Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 372-380.
- JIANG, N., SUN, N. Y., XIAO, D. G., PAN, J., WANG, Y. J. & ZHU, X. D. 2009. A copper-responsive factor gene CUF1 is required for copper induction of laccase in *Cryptococcus neoformans*. *Fems Microbiology Letters*, 296, 84-90.
- KILARU, S., HOEGGER, P. J. & KUES, U. 2006. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics*, 50, 45-60.
- KUMAR, S. V., PHALE, P. S., DURANI, S. & WANGIKAR, P. P. 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol Bioeng*, 83, 386-94.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LETTERA, V., PISCITELLI, A., LEO, G., BIROLO, L., PEZZELLA, C. & SANNIA, G. 2010. Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. *Fungal Biol*, 114, 724-30.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 25, 402-408.
- LU, X. & DING, S. J. 2010. Effect of Cu(2+), Mn(2+) and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus*. *Mycoscience*, 51, 68-74.
- MANSUR, M., SUAREZ, T., FERNANDEZ-LARREA, J. B., BRIZUELA, M. A. & GONZALEZ, A. E. 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Appl Environ Microbiol*, 63, 2637-46.
- MARZLUF, G. A. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 17-&.
- MATERA, I., GULLOTTO, A., TILLI, S., FERRARONI, M., SCOZZAFAVA, A. & BRIGANTI, F. 2008. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the

- white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate. *Inorganica Chimica Acta*, 361, 4129-4137.
- MAYER, A. M. & STAPLES, R. C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 551-565.
- MESSERSCHMIDT, A., LADENSTEIN, R., HUBER, R., BOLOGNESI, M., AVIGLIANO, L., PETRUZZELLI, R., ROSSI, A. & FINAZZIAGRO, A. 1992. Refined Crystal-Structure of Ascorbate Oxidase at 1.9 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 224, 179-205.
- MINUSSI, R. C., MIRANDA, M. A., SILVA, J. A., FERREIRA, C. V., AOYAMA, H., MARANGONI, S., ROTILIO, D., PASTORE, G. M. & DURAN, 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, R. C., PASTORE, G. M. & DURAN, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 205-216.
- MOROZOVA, V., SHUMAKOVICH, G. P., GORBACHEVA, M. A., SHLIEEV, S. V. & YAROLOV, A. I. 2007. "Blue" laccases. *Biochemistry-Moscow*, 72, 1136-1150.
- MOUSSA, T. A. A. 2009. Molecular characterization of the phenol oxidase (*pox2*) gene from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Fems Microbiology Letters*, 298, 131-142.
- NYANHONGO, G. S., GOMES, J., GUBITZ, G., ZVAUYA, R., READ, J. S. & STEINER, W. 2002. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Technology*, 84, 259-263.
- PALMIERI, G., CENNAMO, G., FARACO, V., AMORESANO, A., SANNIA, G. & GIARDINA, P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 220-230.
- PALMIERI, G., GIARDINA, P., BIANCO, C., FONTANELLA, B. & SANNIA, G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 920-924.
- 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, 31301-7.
- PEZZELLA, C., AUTORE, F., GIARDINA, P., PISCITELLI, A., SANNIA, G. & FARACO, V. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics*, 55, 45-57.
- PIONTEK, K., ANTORINI, M. & CHOINOWSKI, T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 37663-37669.

- PISCITELLI, A., GIARDINA, P., LETTERA, V., PEZZELLA, C., SANNIA, G. & FARACO, V. 2011. Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. *Current Genomics*, 12, 104-112.
- REVANKAR, M. S. & LELE, S. S. 2006. Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 921-926.
- RODRIGUEZ, E., PICKARD, M. A. & VAZQUEZ-DUHALT, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*, 38, 27-32.
- RODRIGUEZ, E., RUIZ-DUENAS, F. J., KOOISTRA, R., RAM, A., MARTINEZ, A. T. & MARTINEZ, M. J. 2008. Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the *pel3* encoded protein. *Journal of Biotechnology*, 134, 9-19.
- SAPARRAT, M., BALATTI, P. A., MARTINEZ, M. J. & JURADO, M. 2010. Differential regulation of laccase gene expression in *Coriolopsis rigida* LPSC No. 232. *Fungal Biology*, 114, 999-1006.
- SHLIEV, S., CHRISTENSON, A., SEREZHENKOV, V., BURBAEV, D., YAROLOV, A., GORTON, L. & RUZGAS, T. 2005. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. *Biochemical Journal*, 385, 745-754.
- SHUTOVA, V. V., REVIN, V. V. & MYAKUSHINA, Y. A. 2008. The Effect of Copper Ions on the Production of Laccase by the Fungus *Lentinus (Panus) tigrinus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44, 619-623.
- SMITH, M., SHNYREVA, A., WOOD, D. A. & THURSTON, C. F. 1998. Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology-Uk*, 144, 1063-1069.
- SODEN, D. M. & DOBSON, A. D. W. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology-Sgm*, 147, 1755-1763.
- SODEN, D. M. & DOBSON, A. D. W. 2003. The use of amplified flanking region-PCR in the isolation of laccase promoter sequences from the edible fungus *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 553-562.
- SOLOMON, E. I., SUNDARAM, U. M. & MACHONKIN, T. E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96, 2563-2605.
- STRAUSS, J., HORVATH, H. K., ABDALLAH, B. M., KINDERMANN, J., MACH, R. L. & KUBICEK, C. P. 1999. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol Microbiol*, 32, 169-78.
- TEN HAVE, R. & TEUNISSEN, P. J. M. 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chemical Reviews*, 101, 3397-3413.
- TERRON, M. C., GONZALEZ, T., CARBAJO, J. M., YAGUE, S., ARANA-CUENCA, A., TELLEZ, A., DOBSON, A. D. W. & GONZALEZ, A. E. 2004. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and

- on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp I-62. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 954-962.
- THIELE, D. J. 1992. Metal-Regulated Transcription in Eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 20, 1183-1191.
- THURSTON, C. F. 1994. The Structure and Function of Fungal Laccases. *Microbiology-Sgm*, 140, 19-26.
- TINOCO, R., ACEVEDO, A., GALINDO, E. & SERRANO-CARREON, L. 2011. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38, 531-540.
- TORRES, E., BUSTOS-JAIMES, I. & LE BORGNE, S. 2003. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B-Environmental*, 46, 1-15.
- VANHULLE, S., TROVASLET, M., ENAUD, E., LUCAS, M., SONVEAUX, M., DECOCK, C., ONDERWATER, R., SCHNEIDER, Y. J. & CORBISIER, A. M. 2008. Cytotoxicity and genotoxicity evolution during decolorization of dyes by White Rot Fungi. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24, 337-344.
- WAHLEITHNER, J. A., XU, F., BROWN, K. M., BROWN, S. H., GOLIGHTLY, E. J., HALKIER, T., KAUPPINEN, S., PEDERSON, A. & SCHNEIDER, P. 1996. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 29, 395-403.
- WINGE, D. R., GRADEN, J. A., POSEWITZ, M. C., MARTINS, L. J., JENSEN, L. T. & SIMON, J. R. 1997. Sensors that mediate copper-specific activation and repression of gene expression. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2, 2-10.
- WITAYAKRAN, S. & RAGAUSKAS, A. J. 2009. Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 351, 1187-1209.
- WONG, D. W. S. 2009. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, 174-209.
- XIAO, Y. Z., CHEN, Q., HANG, J., SHI, Y. Y., XIAO, Y. Z., WU, J., HONG, Y. Z. & WANG, Y. P. 2004. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp AH28-2. *Mycologia*, 96, 26-35.
- XIAO, Y. Z., HONG, Y. Z., LI, J. F., HANG, J., TONG, P. G., FANG, W. & ZHOU, C. Z. 2006. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp AH28-2 and analyses of their differential expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 493-501.
- YAROLOPOV, A. I., SKOROBOGATKO, O. V., VARTANOV, S. S. & VARFOLOMEYEV, S. D. 1994. Laccase - Properties, Catalytic Mechanism, and Applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49, 257-280.
- YAVER, D. S., XU, F., GOLIGHTLY, E. J., BROWN, K. M., BROWN, S. H., REY, M. W., SCHNEIDER, P., HALKIER, T., MONDORF, K. & DALBOGE, H. 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase

genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 834-841.

ZHUKHLISTOVA, N. E., ZHUKOVA, Y. N., LYASHENKO, A. V., ZAITSEV, V. N. & MIKHAILOV, A. M. 2008. Three-dimensional organization of three-domain copper oxidases: A review. *Crystallography Reports*, 53, 92-109.

Apéndice A: Cálculos del Análisis Transcripcional

El método doble delta es la manera más apropiada para analizar la cuantificación relativa de la expresión génica utilizando PCR a tiempo real. Una de las condiciones que se debe cumplir para aplicar éste método es que las eficiencias de amplificación del gen de estudio y el gen de referencia deben ser iguales. La eficiencia de amplificación (E) se calculó mediante un ajuste de mínimos cuadrados, usando la pendiente (S) en la siguiente ecuación:

$$E = 10^{-1/s} - 1$$

Si las eficiencias son aproximadamente iguales y muy cercanas a 1, la expresión del gen problema normalizada al gen de referencia y relativa al calibrador está dada por: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El valor $\Delta\Delta Ct$ muestra la diferencia entre ΔCt de la muestra en estudio (cultivo con inducción) y el ΔCt del calibrador (cultivo control):

$$\Delta\Delta Ct = \overbrace{(Cq_{\text{objetivo}} - Cq_{\text{referencia}})}^{\Delta Ct \text{ muestra problema}} - \overbrace{(Cq_{\text{objetivo}} - Cq_{\text{referencia}})}^{\Delta Ct \text{ muestra calibrador}}$$

Al tratarse de una cuantificación relativa de la expresión génica es importante considerar que una expresión génica de 1 supone que dicha expresión no cambia respecto de la situación que se tomó como calibrador (cultivo control). Si la expresión es mayor o menor de 1, implica que hay mayor o menor expresión que en el cultivo control, respectivamente. Los datos son presentados como las veces de cambio de la expresión del gen problema normalizado al gen de referencia y relativo a la muestra calibrador. Por lo tanto, al analizar los resultados hay que considerar que los datos de cambio de expresión son relativos al cultivo control en cada tiempo que se hizo en análisis.