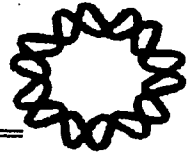


00551

13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PURIFICACION Y CARACTERIZACION
BIOQUIMICA DE UNA POLIFENOLOXIDASA
BACTERIANA CON ACTIVIDAD DE LACASA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

NURIA JIMENEZ JUAREZ

TUTORA: DRA. BRENDA VALDERRAMA

Cuernavaca, Morelos 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

**A Violeta y Fidel por darme tanto amor
y guiarme en esta aventura.**

**A Tama, Tany, Gunter y Yara
por enseñarme que vivir es compartir.**

**A todos los que de alguna forma
están día a día conmigo.**

**La ciencia es como la vida misma.
Experimentamos sin saber que sucederá.
Suponemos y razonamos posibilidades,
a veces acertamos y otras tantas erramos.
Avanzamos o nos detenemos.
Es parte del proceso de crecer.
Hoy quisiera que el tiempo se detuviera.
Nada puedo hacer...
¡Amo la ciencia, amo vivir!**

Nuria Jiménez

**TRABAJA CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Brenda Valderrama, por orientarme durante mi formación como investigadora y por brindarme la oportunidad de aprender a ser mejor persona cada día.

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y contribuir a mi formación académica.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Gloria Saab Rincón, Dr. Rafael Vázquez Duhalt y Dr. Guillermo Gossett, por participar en el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Guadalupe Espín Ocampo, Dr. Agustín López-Munguía Canales, Dr. Joel Osuna Quintero y Dr. Ernesto Pérez Rueda, por las críticas y sugerencias realizadas durante la revisión del trabajo.

A la Biol. Rosa Román Miranda y al M. en C. Raunel Tinoco Valencia, por el apoyo técnico brindado durante mi estancia en el laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la UNAM, por las becas otorgadas durante el periodo Septiembre 2001-Agosto 2003.

A los recalcitrantes, por los momentos compartidos durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos, por todo.

Nuria Jiménez
- Juárez
21 de Noviembre 2003
~~Jiménez~~

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	7
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. ¿LACASAS O POLIFENOLOXIDASAS?	9
1.2 <i>Marinomonas mediterranea</i>	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1 <i>BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL</i>	12
2.2 <i>LACASAS Y SUS APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS</i>	13
2.2.1 Degradación de residuos contaminantes.	13
2.2.2 Industria	14
2.2.3 Inmunosensores, microelectrodos y celdas bioenergéticas	15
2.3 <i>ENZIMAS OXIDASAS DEPENDIENTES DE COBRE</i>	16
2.3.1 Enzimas oxidasas mononucleares	16
2.3.2 Enzimas oxidasas multicobre	18
2.4 <i>LACASAS</i>	20
2.4.1 Origen, distribución y función en la naturaleza.	20
2.4.2 Actividad enzimática	23
2.4.3 Estructura del sitio catalítico	24
2.4.4 Mecanismo catalítico	27
2.4.5 Propiedades redox	29
2.4.6 Inhibidores	31
2.4.7 Efecto del pH sobre la actividad enzimática	31
2.5 <i>LACASAS INTRACELULARES</i>	32
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	34
5.1. <i>OBJETIVO GENERAL</i>	34
5.2 <i>OBJETIVOS ESPECIFICOS</i>	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1 <i>Reactivos</i>	35
6.2 <i>Cepa y condiciones de cultivo</i>	35
6.3 <i>Extracción celular</i>	35
6.4 <i>Purificación de la enzima</i>	35
6.5 <i>Actividades enzimáticas</i>	36

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

<i>6.6 Perfiles de pH</i>	36
<i>6.7 Perfiles de tolerancia a sal</i>	37
<i>6.8 Degradación de colorantes y otros sustratos</i>	37
<i>6.9 Constantes cinéticas</i>	38
<i>6.10 Perfil de temperatura</i>	39
<i>6.11 Ensayos de Termoestabilidad</i>	39
<i>6.12 Ensayos de Inhibición</i>	39
<i>6.13 Cuantificación de proteína</i>	39
<i>6.14 Electroforesis y tinción de geles</i>	39
<i>6.15 Cálculo del potencial redox</i>	40
<i>6.16 Cálculo de sitios activos de la enzima</i>	40
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
7.1 PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA	41
7.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	52
7.2.1 Perfiles de pH	53
7.2.2 Tolerancia a sales	55
7.2.3 Determinación de constantes cinéticas	59
7.2.4 Potencial redox	60
7.2.5 Ensayos de inhibición	61
7.2.5 Ensayos de termoestabilidad	62
8. CONCLUSIONES	65
9. BIBLIOGRAFIA	69

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE FIGURAS

1. Actividad cresolasa y catecolasa de las tirosinasas	18
2. Oxidación de p-fenol	24
3. Estructura cristalográfica de la lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	26
4. Esquema del sitio catalítico de la lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	26
5. Ciclo catalítico de las lacasas	28
6. Esquema del perfil de pH hipotético de las lacasas fungales	32
7. Curva de crecimiento de la lacasa de <i>Marinomonas mediterranea</i> (MmPPO1)	41
8. Geles desnaturalizante y nativo de la MmPPO1 a diferentes valores de pH	43
9. Cromatografía de intercambio aniónico	44
10. Geles desnaturalizante y nativo de la purificación de MmPPO1	46
11. Electroforesis de una purificación típica de MmPPO1	47
12. Gel nativo de MmPPO1 pura teñido por actividad y con coomasie	48
13. Gel nativo de MmPPO1 incubada con diferentes concentraciones de SDS teñido con azul de coomasie	49
14. Gel nativo de MmPPO1 incubada con diferentes concentraciones de SDS teñido por actividad	50
15. Esquema mostrando la disociación de MmPPO1 promovida por SDS	51
16. Crecimiento de MmPPO1 y producción de proteína total, lacasa y tirosinasa	52
17. Perfiles de pH para la MmPPO1	54
18. Tolerancia a diferentes sales para la MmPPO1	56
19. Tolerancia a haluros para la MmPPO1	57
20. Perfil de temperatura para la MmPPO1	63
21. Termoestabilidad de la MmPPO1	64

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE TABLAS

1. Características morfológicas de la bacteria <i>Marinomonas mediterranea</i>	11
2. Lacasas inmovilizadas	14
3. Propiedades fisicoquímicas de lacasas de hongos y plantas	22
4. Constantes catalíticas de lacasas fungales para sustratos fenólicos y no fenólicos	25
5. Potencial redox de lacasas fungales	30
6. Listado de colorantes comerciales	38
7. Actividad de lacasa después de incubar el extracto a diferentes valores de pH	42
8. Actividades específicas de los picos A y B con sustratos de lacasa y tirosinasa	44
9. Resumen de una purificación típica de MmPPO1	47
10. Tabla comparativa de I_{50} de MmPPO1 y lacasas de hongos	58
11. Constantes cinéticas de la MmPPO1 y la lacasa de <i>Coriolus hirsutus</i>	60
12. Potencial redox de diferentes enzimas dependientes de cobre	61
13. Inhibición de MmPPO1 comparada con una lacasa de hongo	62

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

En los últimos años, los grupos de investigación dedicados a la Biotecnología ambiental han aplicado las propiedades de diversas enzimas como una alternativa para contrarrestar los problemas de contaminación. Un ejemplo son las lacasas, las cuales son sistemas eficientes para la remoción de colorantes sintéticos y ácidos húmicos, así como para la degradación de algunos herbicidas y alquenos, entre otros compuestos.

En este trabajo presentamos la purificación y caracterización bioquímica de la lacasa de *M. mediterranea*. Dentro de los resultados obtenidos, respecto a las constantes cinéticas, la enzima tuvo una baja eficiencia catalítica para la mayoría de sustratos que son típicos de lacasas de hongos, mientras que oxidó sustratos como L-dopa que no son oxidados por ninguna lacasa fungal. Además, la enzima caracterizada presenta propiedades interesantes pues es activa a pH mayor de 6 y tolera elevadas concentraciones de sal, a diferencia de las lacasas fungales que no muestran actividad a pH básico y que son inhibidas por haluros.

Aunado a estas propiedades, cabe mencionar que la temperatura óptima de la enzima fue de 75 °C y que mostró ser termotolerante, ya que a 70°C su tiempo de vida media estimado fue de 27 minutos. Todas estas propiedades, junto con su elevado potencial redox (0.9 V) la convierten en una enzima potencialmente importante en biotecnología ambiental.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas (bencediol: oxígeno-oxidoreductasas, E.C. 1.10.3.2) son enzimas que oxidan varios sustratos orgánicos, principalmente fenoles, aunque también llegan a oxidar sustratos no fenólicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos en presencia de mediadores. Se ha demostrado que son sistemas eficientes para la remoción de colorantes sintéticos y ácidos húmicos, así como para la degradación de algunos herbicidas y alquenos, entre otros compuestos [75].

Las lacasas utilizadas para estos fines provienen de hongos, no obstante presentan ciertas desventajas, pues oxidan pocos sustratos dada su restringida especificidad además de que requieren mediadores potencialmente tóxicos. Es por ello que, con el objetivo de encontrar una opción que rebase estas limitaciones, proponemos utilizar la polifenoloxidasasa de *M. mediterranea*, que se distingue de las demás lacasas porque tiene la capacidad de oxidar una mayor variedad de sustratos orgánicos, característicos tanto de monofenoloxidasasa como de difenoloxidasasa [100].

1.1. ¿LACASAS O POLIFENOLOXIDASAS?

Dentro de las polifenoloxidasas se agrupan tres subgrupos enzimáticos: lacasas, tirosinasas y catecolasas. En el caso de las lacasas, se incluye a aquellas enzimas que oxidan sustratos como o-difenoles, p-difenoles, monofenoles metoxi-sustituídos, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, lignina, algunos iones inorgánicos y arildiaminas, pero que no oxidan sustratos específicos de otras polifenoloxidasas como tirosina [111]. Las catecolasas catalizan la oxidación de o-difenoles sustituidos dando lugar a la formación de las quinonas correspondientes, se diferencian de las lacasas en que no oxidan p-difenoles y son inhibidas por inhibidores específicos distintos a los de las lacasas [16]. Las tirosinasas son enzimas que tienen actividad de catecolasa y cresolasa, es decir que catalizan la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles, además de catalizar la oxidación de o-difenoles [33] pero no oxidan compuestos p-fenólicos como las lacasas.

Hasta la fecha solo se ha reportado la caracterización bioquímica de dos lacasas bacterianas: *Bacillus subtilis* [74] y *Streptomyces griseus* [28]. En el primer caso, aunque se demuestra que la enzima tiene un centro de cobre tipo I, el reporte resulta incompleto puesto

TEGIS CON
FALLA DE ORIGEN

que solo se presentan las constantes cinéticas para dos sustratos que son siringaldazina y ABTS, no se reporta si la enzima actúa con otros sustratos comunes a las lacasas fungales o a los de otras polifenoloxidasas ni qué tipo de inhibidores son específicos para esta [74]. En cuanto al reporte de *S. griseus*, aunque la enzima muestra un espectro de absorción alrededor de los 600 nm, lo que es indicativo de la presencia de un centro de cobre tipo 1, no fue capaz de oxidar sustratos como 2,6-DMP, 2,3-DMP, guayacol, p-hidroquinona, catecol, o-fenilendiamina, cresol, ácido gálico o siringaldazina, los cuales son sustratos comunes a todas las lacasas; aunado a esto, la enzima utiliza L-dopa que es un sustrato típico de catecolasas y que no es utilizado por lacasas [28].

Con base en la información anterior sugerimos que es factible el hecho de que las lacasas bacterianas pertenezcan a un grupo diferente de polifenoloxidasas. Si bien, el criterio bioquímico ha servido como herramienta para clasificar estas enzimas como lacasas, también resultaría muy útil el estudio de las relaciones filogenéticas que guardan entre ellas, con las lacasas bacterianas y con otras polifenoloxidasas o enzimas multicobre.

1.2 *Marinomonas mediterranea*

Marinomonas mediterranea es una bacteria que contiene todas las actividades relacionadas con las polifenoloxidasas: cresolasa (EC 1.18.14.1), catecolasa (EC 1.10.3.1) y lacasa (EC 1.10.3.2) [107], característica que la convierte en una bacteria interesante a estudiar. Las enzimas que presentan estas actividades son dos y fueron identificadas como PPO1 y PPO2. Se reportó que PPO1 es una enzima con actividad de cresolasa, catecolasa y lacasa; mientras que la PPO2 tiene actividad de catecol oxidasa y tirosina hidroxilasa pero no de lacasa [100]. Ambas enzimas fueron separadas, aunque en el reporte no se muestra evidencia fehaciente acerca de la purificación. No obstante, dentro de las características reportadas para cada enzima, se confirmó que PPO2 es activada en presencia de SDS y no tiene coloración azul, las cuales son propiedades distintivas de las tirosinasas; mientras que la PPO1 fue capaz de degradar tirosina y dopa que son sustratos de tirosinasas, pero además presentó mayor actividad con sustratos como siringaldazina y 2,6-DMP típicos de las lacasas fungales, lo cual indica que la enzima presenta una doble actividad de lacasa y tirosinasa [100]. Dadas las características de PPO1 en este trabajo enfocaremos nuestra atención al estudio de esta enzima.

En cuanto a las características morfológicas y fisiológicas de la bacteria melanogénica *Marinomonas mediterranea* (cepa MMB-1) podemos mencionar que es una bacteria gram negativa, móvil, con un solo flagelo polar y descubierta; crece a 25°C y presenta pigmentación [107].. Las características más importantes de esta bacteria se resumen en la tabla 1.

La cepa MMB-1, que fue aislada del mar mediterráneo, sintetiza un pigmento oscuro que aparece durante la fase estacionaria, después de dos días de incubación en medio complejo (agar marino o caldo 2216). El único precursor de melanina que induce su producción al agregarlo al medio es L-tirosina. En cuanto a la actividad oxidasa, en un reporte preliminar se sugirió que extractos de la cepa MMB-1 presenta actividades de lacasa y de tirosinasa [107].

Con base en su morfología y demás características descritas, la cepa MMB-1 fue inicialmente clasificada dentro del género *Alteromonas*, según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey. No obstante, aunque esta cepa comparte características con otras especies del género, también tiene propiedades únicas, diferentes a las del resto del grupo, razón por la que fue reclasificada dentro del género *Marinomonas* [108].

Tabla 1. Características morfológicas de la bacteria *Marinomonas mediterranea* (cepa MMB-1)[107].

Característica	<i>Marinomonas mediterranea</i> (MMB-1)
Morfología	Bacilar
Movilidad	+
Flagelo	polar
Crecimiento	25 °C
Crecimiento anaerobio	requiere Na+
Reducción de NO ₃ ⁻ a NO ₂ ⁻	+
Pigmentación	+
Enzimas	lipasa, gelatinasa
Utilización de	D-glucosa, D-manosa, D-sorbitol, citrato, malato, succinato, glicerol, β-hidroxibutirato, m-hidroxibenzoato
% G+C (Promedio± Desv. Std.)	46.3±0.9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. ANTECEDENTES

2.1 BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

La contaminación ocasionada por la acumulación de herbicidas, pesticidas, solventes y otros productos industriales es un problema con gran impacto ecológico y económico. Durante las últimas dos décadas se ha explorado la posibilidad de utilizar sistemas biológicos para prevenir y disminuir los niveles de contaminación. En este ámbito, la biotecnología ambiental ha tenido un papel importante en el desarrollo de nuevas tecnologías que utilizan sistemas enzimáticos para transformar contaminantes en sustancias no tóxicas, la evaluación del estado de los ecosistemas, la generación de compuestos biodegradables a partir de recursos renovables y el desarrollo de procesos de manufactura y manejo de desechos ambientalmente seguros.

Las enzimas son catalizadores biológicos altamente eficientes con varias ventajas sobre los catalizadores no biológicos. Por ejemplo, son biodegradables y no son tóxicas, trabajan bien en condiciones fisiológicas y son altamente específicas. Además, pueden manipularse sus propiedades catalíticas mediante el diseño de proteínas para aumentar su estabilidad a temperatura o en solventes no acuosos; también puede incrementarse su actividad o manipularse ambas propiedades según el proceso lo requiera. Todo esto las convierte en herramientas potencialmente aprovechables en cualquier área biotecnológica.

Diversas enzimas utilizan como sustratos naturales contaminantes como fenoles, pesticidas, residuos de cianuro, metales pesados, residuos generados por la industria alimentaria entre otros, las cuales dependiendo de su especificidad, disminuyen o eliminan totalmente su toxicidad. De todos estos, los fenoles y otros compuestos aromáticos, constituyen una de las clases más tóxicos de contaminantes, ya que están presentes en aguas residuales de varias industrias que incluyen la del petróleo, resinas y plásticos, manufactura de metales, colorantes y otros químicos, textil, de la pulpa del papel y la minera [59].

Entre los grupos enzimáticos más importantes que han sido utilizados para la degradación de fenoles y otros compuestos relacionados, podemos mencionar las peroxidasas y las polifenoloxidasas. Las peroxidasas son oxidoreductasas que catalizan una gran variedad de reacciones en presencia de peróxidos. Estas enzimas son producidas por microorganismos y plantas. Entre las peroxidasas más importantes podemos mencionar la peroxidasa de rábano, la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

lignino peroxidasa, la cloroperoxidasa, y la manganeso peroxidasa. Por otro lado, dentro del grupo de las polifenoloxidasas, las cuales son oxidoreductasas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos en presencia de oxígeno, se agrupan dos subclases: tirosinasas y lacasas. De estas subclases, las lacasas son uno de los grupos más promisorios, con aplicaciones en diversos procesos biotecnológicos incluyendo biotecnología ambiental. Estas son enzimas oxidasas dependientes de cobre que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos, específicamente fenoles y anilinas [39].

2.2 LACASAS Y SUS APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS

Las lacasas (bencendiol:oxígeno-oxidoreductasas, EC. 1.10.3.2) fungales y de plantas, al igual que otras enzimas oxidasas dependientes de cobre, han sido ampliamente estudiadas y dada su versatilidad para oxidar una amplia gama de sustratos, se han utilizado en diversas aplicaciones biotecnológicas. Estas incluyen la biotecnología ambiental, las industrias textil y del papel, la producción y el tratamiento de bebidas, la industria farmacéutica y recientemente, la fabricación de microelectrodos [75].

2.2.1 Degradación de residuos contaminantes.

Se han empleado lacasas fungales para la degradación de contaminantes del tipo de los clorofenoles, carbazoles, alquenos, fluorenos, fenoles, colorantes, herbicidas, entre otros. Se ha reportado que las lacasas de *Coriolus versicolor* y *Panus tigrinus* degradan triclorofenoles dando lugar a la formación de las quinonas correspondientes [67, 68]. Otra lacasa purificada de *Trametes hirsuta* ha sido aplicada para la remoción de alquenos, los cuales fueron convertidos a una cetona o aldehído en presencia de mediadores [83].

En cuanto a los colorantes, se ha reportado que la lacasa de *Flavodon flavus* decolora colorantes sintéticos que incluyen el verde brillante, el rojo congo, el violeta cristal y el azul brillante ramazol R [97]. Otras lacasas purificadas de *Trametes versicolor* decoloran colorantes poliméricos del tipo del poli R-478; además se han usado para decolorar ácidos húmicos derivados de lignita [29]. También fue reportado que algunos cultivos de *Pycnoporus sanguineus* producen lacasas que se utilizan para la decoloración de colorantes azo y trifenilmetano [88].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Respecto a la degradación de herbicidas, se ha reportado que las lacasas de *Phanerochaete chrysosporium* y *T. versicolor* se utilizan para la degradación de dicetonitrilo, el cual es un derivado del herbicida isoxafutol. La reacción ocurre en presencia de un mediador redox [81].

Por otra parte, se ha reportado que para fines de biorremediación y tratamiento de aguas residuales, el uso de enzimas inmovilizadas proporciona ciertas ventajas sobre las enzimas libres, esto es, es más fácil su recuperación y son menos susceptibles a agentes desnaturizantes y toxicológicos [24]. Diversas lacasas han sido inmovilizadas sobre varios soportes, de los cuales los polímeros catiónicos son los que han resultado mejores agentes entrecruzantes. En cuanto a la parte analítica, las lacasas inmovilizadas también han sido utilizadas en el desarrollo de biosensores para monitorear una amplia gama de compuestos (Tabla 2) [24].

Tabla 2. Lacasas inmovilizadas [24]

Origen de la enzima	Soporte	Propiedades
<i>Aspergillus sp.</i>	Silica gel, vidrio, membrana nylon-66	Incremento en la actividad
<i>Botrytis cinerea</i>	Silica gel, DEAE-celulosa, alumina-G	5-28% de actividad
<i>Cerrena máxima</i>	Matrices sólidas	95% de actividad, estabilidad a temperatura
<i>Corioloopsis gallica</i>	Esferas de vidrio	85% de actividad, estabilidad a temperatura
<i>Coriolus hirsutus</i>	Matrices sólidas	Estabilidad a temperatura
<i>Coriolus versicolor</i>	Copolímeros	89% de actividad
<i>Fomes fonetarius</i>	Vidrio poroso (activado)	Estabilidad a pH
<i>Trametes versicolor</i>	Esferas de vidrio poroso	90% de actividad, estabilidad a temperatura
<i>Lentinula edodes</i>	Quitano (activado)	Estabilidad a pH y temperatura
<i>Neurospora crassa</i>	Sepharosa 4B (activada)	Estabilidad a pH
<i>Phlebia radiata</i>	Esferas de vidrio activadas	96% de actividad
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Eupergit C	Estabilidad a pH y temperatura
<i>Pleurotus eryngii</i>	Gel de alginatos	63% de actividad

2.2.2 Industria

Son varias las áreas industriales en donde se han utilizado las lacasas para optimizar y mejorar la producción de sus productos, estas incluyen la industria del papel, farmacéutica y de bebidas.

La industria del papel libera anualmente una gran cantidad de lignina que es utilizada parcialmente para diversas aplicaciones. Una de las limitaciones para una transformación biológica completa de este material es su muy baja solubilidad en agua, por lo que no puede ser transformada eficientemente por enzimas. No obstante, el uso de lacasas y otras polifenoloxidasas como lignino y manganeso peroxidasas, ha permitido vencer esta limitante [39], ya que utilizan como sustrato común la lignocelulosa, facilitando su solubilización para procesos subsecuentes [70].

En cuanto al tratamiento de bebidas, diferentes compuestos fenólicos están usualmente presentes en estas causando su deterioro, decoloración, cambios en el sabor y demás propiedades [15]. Para resolver este problema se han utilizado lacasas que degradan compuestos fenólicos, permitiendo con esto la obtención de productos de mejor calidad. Respecto a la producción de etanol, se sabe que ciertos compuestos fenólicos interfieren con la síntesis de etanol inhibiendo el metabolismo de los microorganismos empleados para tales fines. Para resolver este problema, la lacasa de *Trametes versicolor* ha sido expresada en *Saccharomyces cerevisiae* con la finalidad de incrementar la resistencia del microorganismo a inhibidores fenólicos presentes en los hidrolizados de lignocelulosa utilizados [66].

Por último, en la industria farmacéutica, se han usado lacasas para fabricar sensores enzimáticos que ayuden a la identificación de diferentes fármacos presentes en una misma mezcla. Un ejemplo es el sensor enzimático basado en lacasas usado para distinguir morfina de codeína [75].

2.2.3 Inmunosensores, microelectrodos y celdas bioenergéticas

La habilidad de las lacasas para catalizar la electroreducción de oxígeno en ausencia de mediadores es usada para la fabricación de inmunosensores potenciométricos [38]. Un ejemplo, es el sensor de fase gas-oxígeno basado en la lacasa de *Rhus vernicifera* con ascorbato como sustrato reductor, que es utilizado para medir niveles de oxígeno en productos empacados con bajas concentraciones del mismo [36]. También se han desarrollado inmunoensayos altamente sensibles basados en el uso de lacasas, los cuales han permitido realizar análisis de insulina [8].

Por otra parte, las celdas energéticas trabajan convirtiendo la energía química en eléctrica. Las reacciones se efectúan dentro de una cámara que tiene dos electrodos separados por un electrolito que mantiene los reactantes químicos separados. Los átomos de hidrógeno son

introducidos a la cámara en el electrodo con carga negativa (ánodo) donde es catalizada la pérdida de electrones; los electrones son impulsados a un circuito eléctrico donde realizarán un trabajo; mientras que los protones son dirigidos a través del electrolito –típicamente una red plástica que bloquea los electrones libres para que pasen al otro lado- al electrodo cargado positivamente (cátodo), donde se combinan con los electrones (que recirculan en el circuito) y con moléculas de oxígeno del aire para formar agua.

Las celdas bioenergéticas funcionan de la misma manera, pero la diferencia radica en que usan catalizadores enzimáticos para generar un potencial eléctrico. Un ejemplo es la biocelda construida con dos enzimas: glucosa oxidasa y lacasa. Estas enzimas son colocadas en dos electrodos, la glucosa oxidasa en el ánodo y la lacasa en el cátodo, por un lado la glucosa oxidasa, al oxidar su sustrato, libera un protón (H+) y un electrón, mientras que los electrones se utilizan para realizar un trabajo; los protones son transferidos al cátodo, donde la lacasa, al recibir los electrones que han recirculado en la celda, los utiliza para catalizar la reducción de oxígeno a agua. En el caso de los microelectrodos, estos funcionan con el mismo principio de las bioceldas, pero la diferencia es que no se utilizan electrodos sino microfibras a las cuales se acoplan las enzimas oxidoreductoras [71].

2.3 ENZIMAS OXIDASAS DEPENDIENTES DE COBRE

Las oxidasas dependientes de cobre catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos, que incluyen desde Fe^{2+} solvatado hasta péptidos, acoplada a la reducción de oxígeno a peróxido o a agua. Hay dos subgrupos de oxidasas dependientes de cobre, uno que incluye a aquellas enzimas con sitios de cobre mononucleares y el otro que agrupa a las enzimas oxidasas multicobre [76].

2.3.1 Enzimas oxidasas mononucleares

Las enzimas con sitios de cobre mononucleares o enzimas azules, no funcionan como oxidasas propiamente, más bien son proteínas que transfieren electrones. Algunos ejemplos son tirosinasa, amino oxidasa, galactosa oxidasa y algunas monooxigenasas (peptidilglicina α -hidroxilasa monooxigenasa y dopamina- β -monooxigenasa) [76]. En seguida se describirán algunas generalidades de la tirosinasa, como representante de este grupo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3.1.1 Tirosinasa

Al igual que las lacasas, las tirosinasas pertenecen a la familia de las polifenoloxidasas. Son monooxigenasas que catalizan la orto-hidroxilación de monofenoles con la reducción de oxígeno molecular a agua (actividad de cresolasa o monofenol L-dopa:oxígeno oxidoreductasa, EC 1.14.18.1), así como la oxidación de catecoles a orto-quinonas (actividad de catecolasa o 1,2-bencenodiol oxígeno: oxidoreductasa, EC 1.10.3.1) (Figura 1) [21]. Los principales sustratos de las tirosinasas son L-tirosina, p-aminofenol y su producto de condensación con glutamato es γ -glutaminil-4-hidroxi-benceno [31-33].

Estas enzimas contienen un centro de cobre mononuclear T3, en el que los dos cobres (Cu_A y Cu_B) están ligados cada uno por dos o tres residuos de histidina. Dependiendo de la valencia de los cobres, la enzima puede presentar dos estados catalíticos: met y oxi. En la forma oxi, los iones de cobre monovalentes interactúan con una molécula de oxígeno generando peróxido. La forma met contiene cobres bivalentes y cataliza la deshidrogenación de difenoles. Durante la reacción los iones de cobre son reducidos al estado monovalente generando una deoxi-tirosinasa. La forma deoxi se une fácilmente a una molécula de oxígeno, hasta transformarse en la forma oxi. El ciclo completo de oxidación de monofenoles incluye su transformación a quinonas. Las quinonas son compuestos lábiles que después pueden someterse a transformaciones químicas [43].

Hasta la fecha se conocen alrededor de veinte secuencias de tirosinasas que pertenecen a diversos grupos de organismos, que incluyen plantas, hongos, bacterias, insectos y mamíferos. En plantas, su función se asocia con la protección en contra de insectos y otros microorganismos mediante la síntesis de melanina. En insectos, están involucradas en la esclerotización del exoesqueleto y en la protección contra otros organismos encapsulándolos en melanina. En mamíferos, es responsable de la pigmentación de la piel. Por otro lado, en la mayoría de frutas y vegetales, participa en el proceso de oscurecimiento de la fruta después del corte o algún otro daño celular [112].

En general, se han identificado tres dominios conservados en la secuencias de todas las tirosinasas, de los cuales el central contiene los ligandos para la unión de cobre llamados Cu_A y Cu_B , los cuales forman el sitio de interacción de la tirosinasa con el oxígeno molecular y los sustratos [112]. Una de las características más distintivas de las tirosinasas es que existen como enzimas latentes que tienen que ser activadas. Algunos activadores probados *in vitro* agrupan

detergentes aniónicos como SDS, ambientes ácidos y lípidos. La activación parece deberse a cambios conformacionales de la enzima, solubilización o a la remoción de un inhibidor [56].

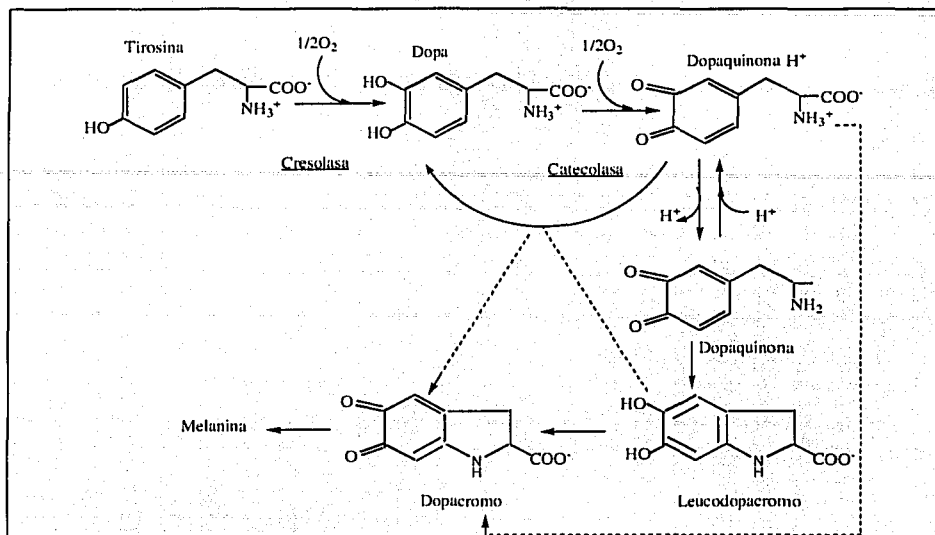


Figura 1. Actividad cresolasa (orto-hidroxilación) y catecolasa (oxidación) de las tirosinasas.

2.3.2 Enzimas oxidasas multicobre

El grupo de las oxidasas multicobre incluye enzimas como lacasa, ascorbato oxidasa, ceruloplasmina, fenoxazinona sintasa, bilirrubina oxidasa, dihidrogeodina oxidasa, sulocrina oxidasa y FET3. Todas contienen al menos un cobre azul o sitio T1 y un cluster trinuclear T2/T3 [109]. A continuación se describirán brevemente algunas propiedades de las enzimas más representativas de este grupo, enfocándonos finalmente al grupo de las lacasas, las cuales son el tema de interés en este trabajo.

2.3.2.1 Ascorbato oxidasa

La ascorbato oxidasa (L-ascorbato:dioxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.3) cataliza la oxidación de ascorbato a dehidroascorbato. Es un homodímero que contiene en cada subunidad un cobre T1 y un cluster trinuclear T2/T3. Se encuentra ampliamente distribuida en plantas y también ha sido aislada de eubacterias y hongos. Algunas ascorbato oxidasas caracterizadas han sido

aisladas de la calabacita (*Cucurbita pepo medullosa*) [73] y el pepino (*Cucumis sativus*) [1]; también se han aislado de bacterias como *Acremonium sp* HI-25 [51]. La actividad de ascorbato oxidasa se correlaciona con la velocidad de crecimiento de plantas vía la elongación celular [109].

2.3.2.2 Ceruloplasmina

La ceruloplasmina (Ferrooxidasa, hierro(II): dioxígeno oxidoreductasa, EC 1.16.3.1) es la oxidasa multicobre más compleja, a pesar de ser monomérica. Ha sido postulado por Ryden y Björk que la ceruloplasmina humana contiene seis cobres por molécula, aunque esto no es válido para todas las ceruloplasminas caracterizadas [98]. Se encuentra distribuida en todos los vertebrados y ha sido aislada de aves, reptiles y mamíferos, incluyendo el hombre. La ceruloplasmina humana tiene dos formas que solo difieren en el grado de glicosilación. Oxida sustratos como hierro II, diaminas aromáticas y otros aromáticos activados. Su función principal *in vivo* es transportar cobre, participando en el metabolismo del hierro al facilitar su captura vía transferrina [49].

2.3.2.3 Otras oxidasas multicobre

En este grupo se incluyen enzimas que han sido aisladas y caracterizadas como oxidasas multicobre pero que son poco abundantes en la naturaleza. Los ejemplos más representativos son la bilirrubina oxidasa (bilirrubina:dioxígeno oxidoreductasa, EC 1.3.3.5), sulocrina oxidasa (Sulocrina: O₂ oxidoreductasa, EC 2.10.3.8) y FET3. La bilirrubina oxidasa ha sido aislada de varias especies de hongos del género *Myrothecium*, de las cuales la más estudiada es la de *Myrothecium verrucaria* [44], la cual tiene dos cobres por molécula, un peso de 64 kDa y oxida tetrapirroles del tipo de la bilirrubina. En cuanto a la sulocrina oxidasa, ha sido aislada de hongos como *Penicillium frequentans* [52] y *Oospora sulphurea* [84]. Esta enzima es homodimérica con peso molecular de 128 a 157 kDa y está involucrada en la síntesis de grisanos, además de catalizar la formación de (+)-geodina y de oxidar sustratos que incluyen difenoles, arildiaminas y ascorbato. Finalmente, FET3 es una proteína de membrana extracelular aislada de *Saccharomyces cerevisiae* [47], cuya función se asocia al transporte de hierro.

2.4 LACASAS

2.4.1 Origen, distribución y función en la naturaleza.

Las lacasas son enzimas multicobre que se agrupan dentro de la familia de las polifenoloxidasas. Fueron descritas por primera vez por Yoshida en 1883, quien demostró la existencia de estas en el árbol de laca (*Rhus vernicifera*) [123]. Pero fue hasta 1985 cuando Bertrand las caracterizó como enzimas oxidasas que contienen metal [7].

Se ha detectado actividad de lacasa en todos los grupos de organismos, excepto en animales, donde la proteína relacionada es la ceruloplasmina [49]. En general se distinguen dos grandes grupos de lacasas que han sido estudiados y caracterizados a detalle: de plantas y de hongos.

Las lacasas de plantas son proteínas monoméricas extracelulares y la mayoría están glicosiladas (de 22 a 45% de glicosilación) salvo algunas excepciones (Tabla 3) [90]. La lacasa de plantas más estudiada y catacterizada ha sido la de *Rhus vernicifera* (árbol de laca) [91]. La actividad de lacasa se ha encontrado en otros miembros de la familia *Anacardiaceae* (a esta familia pertenece el árbol de laca), en los ductos de resina y en la resina secretada [54]. También se ha detectado en la pared celular de *Acer pseudoplatanus* [10] y *Populus euramericana* [90]. De *Pinus taeda* se han aislado ocho lacasas diferentes que se expresan preferencialmente en xilema [101]. Se ha encontrado actividad de lacasa en las hojas y primordios foliares de *Aesculus parviflora* [41]. *Populus euramericana* tiene cinco lacasas que se han aislado del xilema de diferentes órganos [90]. Otras especies de plantas también parecen presentar actividad de lacasa pero su caracterización es poco convincente, pues los ensayos de actividad se han realizado en extractos donde hay actividades de otras polifenoloxidasas.

Por otra parte, se sabe que las lacasas de plantas utilizan preferentemente sustratos como alcohol cumárflico, coniferílico y sináplico, los cuales son precursores para la formación de lignina [90]. En cuanto a la función de estas enzimas, se piensa que participan en la síntesis de lignina, mediante el acoplamiento oxidativo de monolignoles (precursores de lignina) a oligolignoles, durante procesos de regeneración por daños mecánicos [90].

En cuanto a las lacasas fungales, éstas constituyen el grupo mejor estudiado y caracterizado. Han sido aisladas de diversas especies de hongos, algunas de las cuales producen múltiples

isoformas. Todas son monómeros u homodímeros, con la excepción de la isoforma I de *Podospora anserina* que es un homotetrámero [79]. También son glicoproteínas, pero están glicosiladas en menor proporción que las lacasas de plantas, teniendo de 10 a 25% de glicosilación (Tabla 3) [111]. Los sustratos más comunes para estas enzimas son fenoles como guaiacol, 2,6-dimetoxifenol y siringaldazina; difenoles simples como catecol e hidroquinona; y algunas diaminas como p-fenilendiamina [111].

Las lacasas fungales desempeñan diferentes funciones. Una de estas es participar en la formación de pigmentos, lo cual ha sido confirmado experimentalmente mediante mutantes de *Aspergillus nidulans* deficientes en lacasa, las cuales no producen el pigmento natural de las esporas silvestres [18]. También se ha sugerido que las lacasas están involucradas en la producción de melanina [55] y en la detoxificación de compuestos fenólicos tóxicos [45].

Otra función es participar en la degradación de lignina oxidando grupos fenólicos libres a radicales catiónicos fenoxi [48]. Se ha demostrado que las lacasas también degradan compuestos de lignina no fenólicos en presencia de mediadores [14]. En el caso de *Pycnoporus cinnabarinus*, el hongo que produce varias enzimas que participan en la degradación de lignina, incluyendo la lacasa, sintetiza un metabolito llamado 3-hidroxiantranilato que actúa como mediador para la despolimerización de lignina [27].

Las lacasas fungales también han sido asociadas con funciones de crecimiento y desarrollo. En el basidiomiceto *Pleurotus florida*, se han relacionado con el desarrollo de rizoformas [19] y en *Phlebia spp.* con la diferenciación de micelio cenocítico a septado [115]. En algunos basidiomicetos saprotróficos, la expresión de genes de lacasa o la acumulación de éstas ocurre durante el crecimiento vegetativo, pero decae durante la formación del basidio [116]. En *Agaricus bisporus*, oscilaciones en la actividad de lacasa se relaciona con ciclos de actividad ligninolítica, y con la producción del basidioma [12]. Por otro lado, se ha detectado actividad de lacasa durante la formación de cuerpos fructíferos en *Aspergillus* y *Sordaria spp* y hay evidencia de que está regulada espacial y temporalmente durante la diferenciación de conidios y ascas [13, 50]. En *Aspergillus nidulans*, diferentes isoformas de lacasa son expresadas durante las fases sexual y asexual; la lacasa I se expresa durante desarrollo asexual y es requerida para la

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de lacasas de hongos y plantas.

Grupo	Subunidades	Peso molecular (KDa)	% carbohidratos	Referencia
Lacasas de Plantas				
<i>Rhus vernicifera</i>	1	110	45	[91]
<i>Acer pseudoplatanus</i>	1	97	40-45	[10]
<i>Pinus taeda</i>	1	90	22	
Lacasas de Hongos				
<i>Polyporus versicolor I</i>	1	60	14	[80]
<i>Polyporus versicolor II</i>	1	65	-	[80]
<i>Neurospora crassa</i>	1	65	11	[34]
<i>Pleurotus ostreatus I</i>	1	56-59	-	[37]
<i>Pleurotus ostreatus II</i>	1	56-61	-	[37]
<i>Rigidoporus lignosus I</i>	1	54-59	-	[37]
<i>Rigidoporus lignosus II</i>	1	55-60	-	[37]
<i>Trametes trogii</i>	1	53-60	-	[37]
<i>Rhizoctonia solani IV</i>	2	66	10	[113]
<i>Myceliophthora thermophila</i>	2	100-140	40	[5]
<i>Scytalidium thermophilum</i>	1	75-80	-	[6]
<i>Phlebia radiata</i>	1	64	12	[82]
<i>Podospora anserina I</i>	4	390	22	[25]
<i>Podospora anserina II</i>	1	70	25	[25]
<i>Podospora anserina III</i>	1	80	23	[25]
<i>Agaricus bisporus I</i>	2	100	15	[86, 117]
<i>Agaricus bisporus II</i>	2	65	-	[86, 117]
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	110	12	[65]
<i>Botrytis cinerea I</i>	1	72	80	[72]
<i>Botrytis cinerea II</i>	1	72	-	[72]
<i>Schizophyllum commune</i>	1	62-64	-	[20]
<i>Commucytenoporus coccineus</i>	1	70	-	[85]
<i>Lentinus edodes</i>	1	66	-	[62]
<i>Armillaria mellea I</i>	1	59	-	[94]
<i>Monocillium indicum</i>	1	100	-	[110]
<i>Coriolus hirsutus</i>	1	80	11	[105]
<i>Coriolisimus fulvocinerea</i>	1	54	32	[106]
<i>Coriolus zonatus</i>	1	62	10	[106]
<i>Cerrena maxima</i>	1	57	13	[106]
<i>Phellinus ribis</i>	2	140	28	[78]

formación de pigmentos [3], mientras la lacasa II es expresada durante el desarrollo cleistotecial y probablemente esté involucrada en la agregación de hifas o en la conversión de pigmentos [102]. Por último, las lacasas también han sido implicadas en el entrecruzamiento químico de hifas vía polimerización oxidativa de metabolitos secundarios y proteínas [42].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las lacasas fungales también participan en procesos de patogenicidad. Un ejemplo es *Cryptococcus neoformans*, el cual es un patógeno humano que utiliza lacasas para oxidar sustratos aromáticos a productos que polimerizan formando melanina, misma que se une a proteínas microbicidas y que funciona como mecanismo protector contra la respuesta inmune oxidativa del hospedero [23, 114]. Además, ha sido demostrado que la lacasa de *C. neoformans* también lo protege del ataque mediado por radicales hidroxilo efectuado por macrófagos vía oxidación del hierro fagosomal a Fe^{3+} y la reducción del radical hidroxilo formado [69]. Las lacasas de varios hongos patógenos de plantas como *Botrytis cinerea* [4], *Cryphonectria parasitica* [95], *Ophiostoma novo-ulmi* [9] y *Gaeumannomyces graminis* [26] han sido implicadas en la patogenicidad, pero el papel de las lacasas en las interacciones planta-patógeno no ha sido comprendido del todo.

Por otra parte, son pocos los grupos bacterianos en los que se han detectado la actividad de lacasa, entre los cuales se encuentran *Marinomonas mediterranea* [100], *Azospirillum lipoferum* [40], *Bacillus sphaericus* [17], *Phormidium valderianum* [104], *Bacillus subtilis* [53] y *Streptomyces griseus* [28]. Se ha relacionado la lacasa de *Azospirillum* con la función de pigmentación celular, en la utilización de compuestos fenólicos [30], y en el transporte de electrones [2]; mientras que la lacasa de *Bacillus sphaericus* tiene como función participar en la formación de pigmentos que protegen las esporas contra estrés causado por radiación UV o por peróxido de hidrógeno [74]. El tema de las lacasas bacterianas será tratado a detalle posteriormente.

2.4.2 Actividad enzimática

Las lacasas catalizan la oxidación de diferentes compuestos orgánicos acoplada a la reducción de oxígeno molecular a agua sin formación de peróxido de hidrógeno [122] (Figura 2). La oxidación del sustrato es una reacción de un electrón, con la consecuente generación de un radical libre. Como ejemplo, está la oxidación del 1,2,4,5-tetrametoxibenceno que da lugar a la formación de un radical catiónico que puede sufrir una segunda oxidación catalizada por la enzima, puede ser sustrato de reacciones no enzimáticas como hidratación o polimerizar formando un producto del tipo de la melanina [61].

Las lacasas pueden oxidar una amplia gama de compuestos, incluyendo o-difenoles, p-difenoles, monofenoles metoxi-sustituídos, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, lignina, algunos iones inorgánicos y arildiaminas [111]. En general, difenoles como hidroquinona, catecol, guaiacol y 2,6-dimetoxifenol son sustratos oxidados por la mayoría de las lacasas fungales [106]; además

pueden oxidar compuestos no fenólicos del tipo de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) en presencia de mediadores como 2,2'azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) y 1-hidroxibenzo-triazol (HBT) [58]. No obstante, las lacasas no oxidan sustratos típicos de otras polifenoloxidasas como la tirosina [111].

En la tabla 4 se enlistan las constantes catalíticas obtenidas con lacasas de diferentes hongos, dónde se observa que la especificidad de cada una varía dependiendo de la fuente, es decir, no todas oxidan los mismos sustratos. En general, los sustratos que son oxidados 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 ferulico, guaiacol, dimetoxihidroxiacetofenona, catecol y p-fenilendiamina.

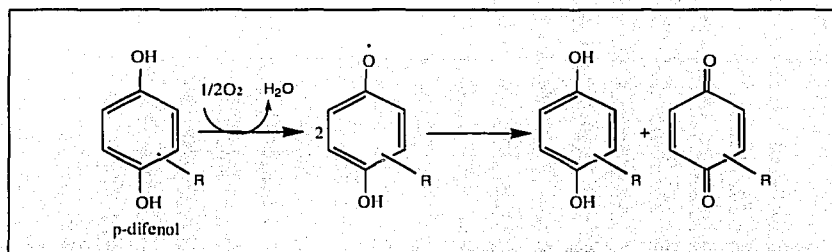


Figura 2. Oxidación de p-fenol acoplada a la reducción de oxígeno molecular a agua.

2.4.3 Estructura del sitio catalítico

El sitio catalítico de las lacasas está formado por cuatro átomos de cobre, los cuales se distribuyen en tres sitios redox: T1, T2 y T3 [39] (Figura 3). Estos sitios están formados por átomos de cobre que difieren en su espectro. El sitio T1 está formado por un átomo de cobre tipo 1, que está disponible a la acción de solventes, incluyendo el agua, tiene una banda de absorción a 600 nm y emite señal en el espectro de resonancia paramagnética (EPR). Además, la presencia de este sitio confiere a la enzima una coloración azul característica. El átomo de cobre tipo 2 que forma el sitio T2 no emite señal óptica en el espectro de luz visible, pero es activo en el EPR. Los dos cobres tipo 3, que forman el sitio T3 son silenciosos en el EPR puesto que están acoplados antiferromagnéticamente, pero emiten señal a 330 nm. Los sitios T2-T3 forman el llamado grupo trinuclear, donde ocurre la reducción del oxígeno molecular a agua [109].

Tabla 4. Constantes catalíticas de lacasas fungales con varios sustratos fenólicos y no fenólicos.

Sustratos	Fuente de lacasa	Km (μM)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km	Referencia
ABTS	<i>Trametes trogii</i>	1.5	4.6×10^5	3.06×10^5	[37]
	<i>Pleurotus ostreatus I</i>	39	6.7×10^6	1.71×10^5	[37]
	<i>Rigidoporus lignosus I</i>	23	1.02×10^6	4.43×10^4	[37]
	<i>Rigidoporus lignosus II</i>	30	1.12×10^5	3.73×10^4	[37]
	<i>Phellinus ribis</i>	207	480×10^4	2.31×10^4	[78]
	<i>Pleurotus ostreatus II</i>	470	4.3×10^6	9.1×10^3	[37]
	<i>Coriolus hirsutus</i>	56.7	260	4.59	[105]
Dimetoxifenol	<i>Pleurotus ostreatus I</i>	7.6	4.14×10^6	5.44×10^5	[37]
	<i>Phellinus ribis</i>	38	7.8×10^6	2.05×10^5	[78]
	<i>Trametes trogii</i>	1.9	1.83×10^5	9.63×10^4	[37]
	<i>Pleurotus ostreatus II</i>	380	8.8×10^6	2.31×10^4	[37]
	<i>Rigidoporus lignosus II</i>	550	1.70×10^5	3.09×10^2	[37]
	<i>Rigidoporus lignosus I</i>	340	1.04×10^5	3.04×10^2	[37]
	<i>Coriolus hirsutus</i>	53	126	2.38	[105]
Acido ferúlico	<i>Cerrena maxima</i>	34	285	8.4	[106]
	<i>Coriolus hirsutus</i>	16.8	83.7	4.98	[105]
	<i>Coriolus zonatus</i>	25	100	4	[106]
	<i>Coriolisimus fulvocinerea</i>	50	110	2.2	[106]
Guaiacol	<i>Coriolisimus fulvocinerea</i>	70	95	1.4	[106]
	<i>Cerrena maxima</i>	255	210	0.93	[106]
	<i>Coriolus zonatus</i>	90	70	0.77	[106]
	<i>Coriolus hirsutus</i>	10.9	2.24	0.21	[105]
Acido sinapínico	<i>Cerrena maxima</i>	13	360	27.7	[106]
	<i>Coriolus zonatus</i>	10	160	16	[106]
	<i>Coriolus hirsutus</i>	11.2	127	11.3	[105]
	<i>Coriolisimus fulvocinerea</i>	21	150	7.1	[106]
Siringaldazina	<i>Phellinus ribis</i>	11	4.32×10^6	3.92×10^5	[78]
	<i>Coriolus hirsutus</i>	142.7	107	0.75	[105]
p-fenilendiamina	<i>Coriolus hirsutus</i>	50.1	0.46	0.01	[105]
Catecol	<i>Coriolus hirsutus</i>	39.9	7.49	0.19	[105]
Dimetoxihidroxi-Acetofenona	<i>Coriolus hirsutus</i>	60.5	45	0.74	[105]

Con base en la comparación de estructuras primarias de diferentes oxidasas dependientes de cobre, se han definido los aminoácidos que coordinan los cobres del sitio activo. En todas las lacasas, los sitios de unión a cobre están altamente conservados, en general el cobre tipo 1 está coordinado por dos residuos de histidina y uno de cisteína; el cobre tipo 2 es coordinado por dos residuos de histidina; y los ligandos de los iones de cobre del grupo binuclear son ocho residuos de histidina, coordinando cuatro a cada átomo del sitio [111].

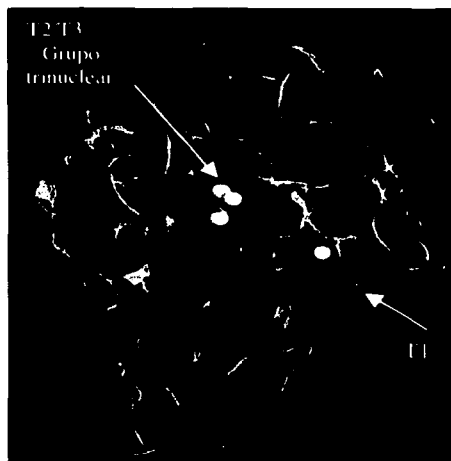


Figura 3. Estructura cristalográfica de la lacasa de *Trametes versicolor*. En amarillo se muestran los cobres que forman parte de los tres sitios redox (T1, T2/T3 o grupo trinuclear).

En la figura 4 se muestra a detalle un esquema del sitio catalítico de la lacasa del hongo *Trametes versicolor* en la cual se indican las histidinas que coordinan los cuatro cobres en el grupo trinuclear (T2/T3) y el sitio T1 coordinado por dos histidinas y una cisteína [87]. En general, todas las lacasas tienen conservados los sitios de unión a cobre, mostrando poca diferencia en los ligandos que los coordinan.

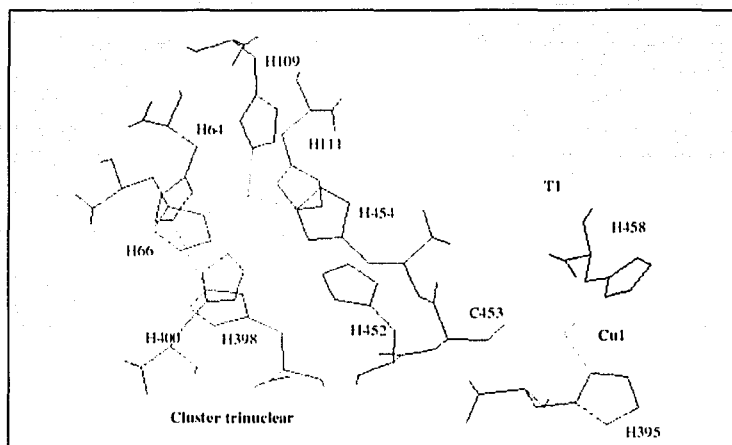


Figura 4. Esquema del sitio catalítico de la lacasa de *Trametes versicolor* [87].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.4.4 Mecanismo catalítico

La catálisis de las lacasas puede dividirse en tres pasos: 1) reducción del sustrato en el sitio T1; 2) transferencia interna de electrones del sitio T1 al cluster trinuclear o sitio T2-T3; y 3) reducción de O₂ a H₂O en el sitio T3 [77, 109, 111, 122].

En la figura 5 se presenta un modelo en el que se propone el mecanismo catalítico de las lacasas [109]. Comenzando en el intermediario nativo, la primera molécula de sustrato, transfiere un electrón al sitio T1 reduciéndolo. Hasta este punto, pueden ser posibles dos rutas o mecanismos: A (azul) y B (rojo) [109]. En A, se propone que en la transferencia de electrones del sustrato hacia el sitio T3 participan T1 y T2. Inicialmente T1 se oxida al transferir su electrón a T2 reduciéndolo (A-1); después una segunda molécula de sustrato transfiere un electrón a T1 reduciéndolo nuevamente, quedando ahora reducidos T1 y T2 (A-2); posteriormente T1 y T2 se oxidan cuando transfieren dos electrones a T3, quedando éste último reducido (A-3); a continuación una tercera molécula de sustrato transfiere un electrón a T1 y es rereducido (A-4); en seguida T1 se vuelve a oxidar al transferir su electrón al T2 reduciéndolo nuevamente; por último, con la entrada de una cuarta molécula de sustrato, T1 es reducido otra vez, dando lugar a la forma completamente reducida de la enzima. Este mecanismo está sustentado en el hecho de que cuando la enzima se encuentra en el estado "completamente oxidado en reposo", el T3 actúa como un aceptor de dos electrones, ya que no se ha observado un par T3 "a la mitad".

Por otra parte, en B, el cluster trinuclear es reducido secuencialmente por tres transferencias de un electrón del sitio T1 a T3, en donde T2 no participa. Primero, en B1 se observa que el sitio T1, que fue reducido por la primera molécula de sustrato, transfiere un electrón al sitio T3, reduciéndolo parcialmente; con la entrada de una segunda molécula de sustrato, T1 vuelve a ser reducido (B-2); después T1 transfiere un electrón a T2 reduciéndolo (B-3); en seguida, una tercera molécula de sustrato reduce nuevamente a T1 al transferirle un electrón (B-4); después T1 vuelve a transferir un electrón al sitio T3 reduciéndolo completamente; finalmente con la transferencia de un electrón efectuada por una cuarta molécula de sustrato, T1 es reducido nuevamente, dando lugar a la formación del estado completamente reducido de la enzima. Este segundo mecanismo podría sustentarse en dos hechos, primero que aunque la reducción del intermediario nativo no ha sido estudiada sistemáticamente, existe la posibilidad de que interacciones adicionales entre los centros T2 y T3 en el intermediario nativo permitan a los cobres de T3 actuar como aceptores de un electrón. En segundo lugar, Reinhammar ha reportado un nuevo EPR para la formación del

intermediario nativo en presencia de un exceso de reductor, que se forma debido a la reducción rápida del intermediario nativo, dando sustento a este último mecanismo [92].

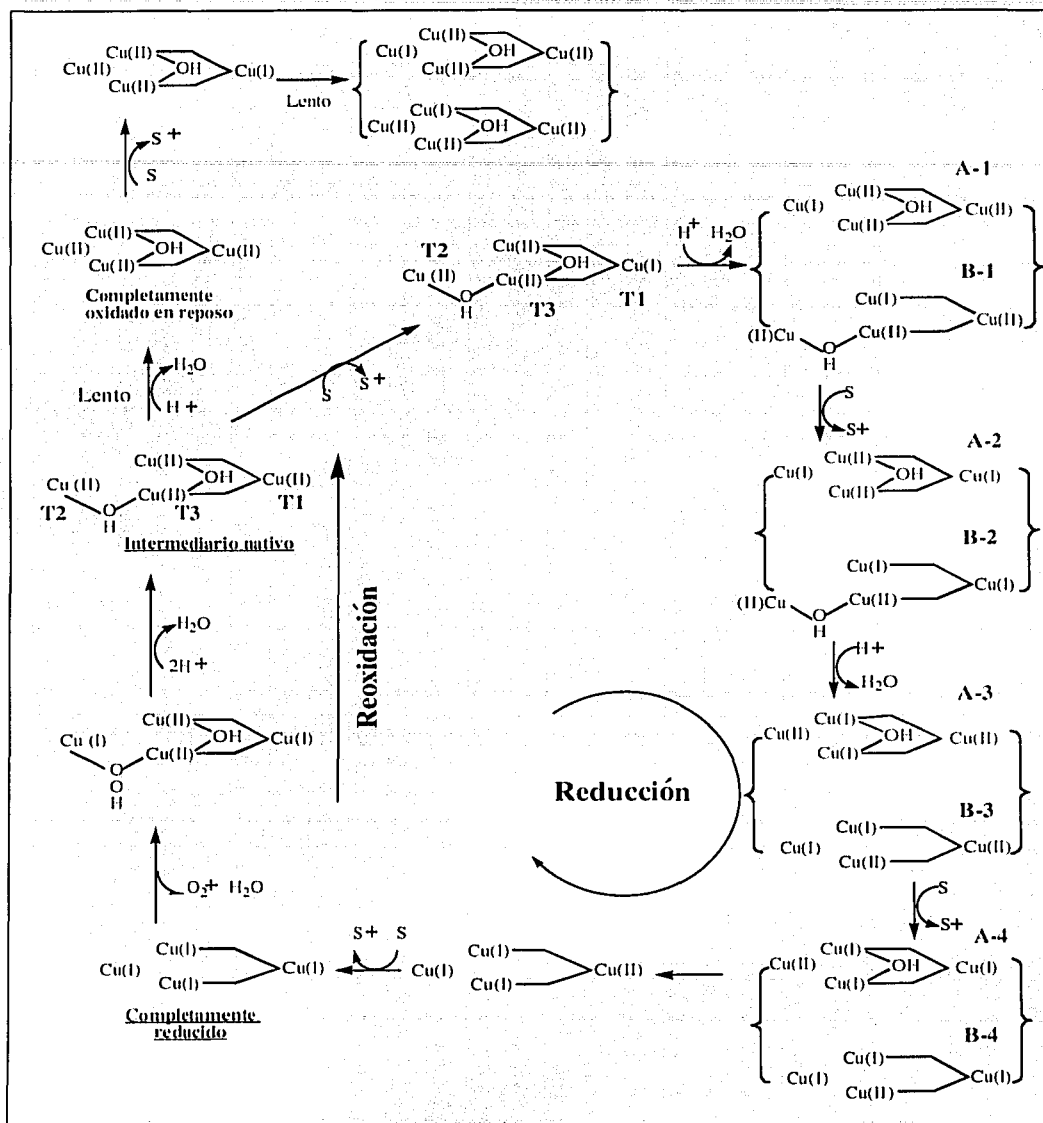


Figura 5. Ciclo catalítico de las lacunas . Mecanismo catalítico propuesto para la reducción y reoxidación de los sitios de cobre.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.4.5 Propiedades redox

El potencial redox del sitio T1 en las lacasas es un factor importante que determina la velocidad a la cual ocurre la reacción y por lo tanto delimita el rango de sustratos que la enzima es capaz de oxidar. En general, el valor de potencial redox de las lacasas va de 0.3 a 0.8 V [120] y se sabe que los potenciales de lacasas fungales son más altos que los de lacasas de plantas y otras oxidasas de cobre azul [91, 93]. Son varios los factores que determinan el potencial redox de una enzima, entre los cuales podemos mencionar el tipo de aminoácidos que coordinan al cobre del sitio T1, la unión interna de hidrógeno a los ligandos del sitio T1, la accesibilidad a solvente, residuos cargados cercanos al sitio T1, entre otros [121].

Como mencionamos anteriormente, en las lacasas los sitios de unión a cobre están coordinados por histidinas, los cuales en términos de secuencia primaria, están conservados guardando homología con otras enzimas dependientes de cobre como la ascorbato oxidasa de Zucchini (zAO) y la ceruloplasmina de suero humano (hCP) [77]. Sin embargo, al alinear las secuencias de lacasas con otras enzimas multicobre, hay diferencias importantes, una de ellas es el tipo de ligando axial que coordina al cobre T1, pues mientras en la ascorbato oxidasa, en la azurina y en otras enzimas multicobre este corresponde a una metionina, en las lacasas es una fenilalanina o leucina. La importancia de este ligando fue demostrada en un trabajo realizado con una mutante de azurina de *Pseudomonas aeruginosa* a la cual se le cambió la metionina por una leucina, encontrando que el potencia redox del sitio T1 incrementó alrededor de 70 mV [60].

En otro trabajo posterior Xu, F. después de analizar la secuencia más próxima al sitio de coordinación al Cu T1 de varias lacasas fungales y otras oxidasas multicobre, estableció una correlación entre la secuencia y el potencial redox, observando que las lacasas que presentaban una fenilalanina en la posición correspondiente a metionina en la zAO, eran las que tenían valores de potencial redox más altos (Tabla 5). También encontró que algunas lacasas con potencial redox elevado tenían una leucina en la posición correspondiente a fenilalanina pero que ciertas lacasas con leucina tenían potencial bajo, tal es el caso de la lacasa de *Myceliophthora thermophila*. Para tratar de responder cual era la importancia de la fenilalanina en esta posición efectuó experimentos en aquellas lacasas con bajo potencial redox que tenían leucina en lugar de fenilalanina, sustituyendo leucina por fenilalanina, no obstante tras este cambio no se observó efecto alguno sobre el potencial. En un segundo intento, con base en el supuesto de que los aminoácidos cercanos las histidinas que coordina a T1 influyen en su potencial, realizó mutaciones en bloques de tres aminoácidos cercanos a una de las histidinas que coordinan T1, correspondientes a la secuencia

LEA en *Rhizoctonia solani* (E° 0.71 V) y a VSG en *Myceliophthora thermophila* (E° 0.47 V), las mutaciones consistieron en cambiar el bloque LEA por VSG en *R. Solani* (RsL) y VSG por LEA en *M. thermophila* (MtL); esto se hizo esperando que la lacasa con mayor potencial (RsL) experimentara una disminución en el mismo, al colocar el triplete de la lacasa con bajo potencial; mientras que en la de menor potencial (MtL), al colocar el triplete de la lacasa con mayor potencial, se esperaba el efecto contrario (Tabla 5). Lo anterior no ocurrió, pues el cambio en el potencial redox no fue significativo para ninguna de las dos triples mutantes; sin embargo, las mutaciones afectaron de manera importante las constantes cinéticas en ambos casos, observándose un decremento tanto en la k_{cat} como en K_m . [120].

Tabla 5. Potencial redox de lacasas fungales y alineamiento de secuencias de los aminoácidos del sitio T1 [120].

Lacasa	Potencial redox E° (V)	Alineamiento de secuencia
<i>Scytalidium thermophilum</i>	0.51	⁵⁰⁶ H C H I A W H V S G G L ⁵¹⁷
<i>Myceliophthora thermophila</i>	0.47	⁵⁰² H C H I A W H V S G G L ⁵¹³
<i>Rhizoctonia solani</i> (4)	0.71	⁴⁵⁹ H C H I D W H L E A G L ⁴⁷⁰
<i>Trametes villosa</i>	0.78	⁴⁵² H C H I D F H L E A G F ⁴⁶³
<i>Trametes versicolor</i>	0.79	⁴⁵¹ H C H I D F H L E A G F ⁴⁶²
Ascorbato oxidasa de Zucchini	0.34	⁵⁰⁶ H C H I E P H L H M G M ⁵¹⁷

Con el antecedente de que la pérdida del ligando axial correspondiente a metionina en la zAO ocasionaba un aumento del potencial redox en algunas lacasas de hongos, Xu realizó experimentos con la lacasa de *Trametes villosa* en donde mediante mutagénesis sitio-dirigida cambió la fenilalanina, correspondiente a la metionina axial de zAO por leucina (mutante F463L) y metionina (mutante F463M); además, también mutó otros dos residuos (Glu-460 y Ala-461), cercanos a una de las histidinas del sitio T1, correspondientes a His-514 y Met-515 en zAO. Como resultado, encontró que la mutante F463L no sufrió alteraciones en la estructura electrónica de T1 y que el potencial redox experimentó un decremento de solo 0.05 V; en cuanto a las constantes cinéticas y el pH estos no fueron afectados significativamente. Respecto a la mutante F463M, la introducción de metionina ocasionó cambios importantes en el sitio T1, que conllevaron a un decremento importante en el potencial (0.1 V), lo cual correlaciona con estudios previos que

soportan la hipótesis de que la ligación del aminoácido axial puede regular el potencial redox de estas enzimas. No obstante, es importante mencionar que el potencial de la mutante F463M resultó aún mayor que el de otras enzimas multicobre como bilirrubin oxidasa y zAO, esto aunado a los resultados de trabajos anteriores nos conduce a la conclusión de que el potencial redox de las lacasas es dependiente de otros factores que no necesariamente están determinados por la secuencia primaria, por lo que es indispensable el análisis de la estructura para establecer una correlación con la función.

2.4.6 Inhibidores

Algunos aniones como haluros, azida, cianuro, e hidróxido, tienen un efecto inhibitorio sobre las lacasas, ya que se unen al cobre del sitio T2 interrumpiendo la transferencia interna de electrones [57]. También ha sido reportado que la inhibición por hidroxilo puede dominar la catálisis a pHs básicos [119]. Otros inhibidores incluyen iones metálicos (Hg^{2+}), ácidos grasos, compuestos sulfhidrilo, ácido kojico, desferal y detergentes catiónicos de amonio cuaternario, los cuales involucran la modificación de residuos aminoácidos, quelación del cobre o cambios conformacionales [39].

2.4.7 Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Diversos trabajos han reportado una dependencia de la especificidad y afinidad por el sustrato respecto al pH. Para sustratos como ABTS, cuya oxidación no involucra intercambio de protones, la actividad de lacasa decrece conforme el pH es incrementado; mientras que para sustratos del tipo de los fenoles, cuya oxidación involucra el intercambio de protones, el perfil de pH tiene un óptimo que depende de la lacasa más que del sustrato. En este último caso, la actividad de lacasa sigue un perfil bifásico (forma de campana), cuyo máximo varía considerablemente entre lacasas de diferentes fuentes. Este comportamiento está determinado por dos efectos opuestos: uno es el potencial redox del sustrato y el segundo es la inhibición del sitio T2 por hidroxilos. En el caso de sustratos como ABTS, que no se protonan, la actividad es independiente del pH, observándose solo un efecto inhibitorio ocasionado por hidroxilos (Figura 6) [119].

Se ha reportado que en el caso de fenoles, el rango de pH óptimo es entre 3 y 7 para lacasas fungales y que se incrementa hasta 9 para lacasas de plantas [11]. Por ejemplo, el pH óptimo de actividad para la lacasa de *Coriolus hirsutus* es de 3.5-4; el de *Schinus molle*, 6.2; el de

Schizophyllum commune, 5.4 a 6; el de *Rhizoctonia praticola*, de 6-7 y el de *Coriolus versicolor*, de 4-5 [39].

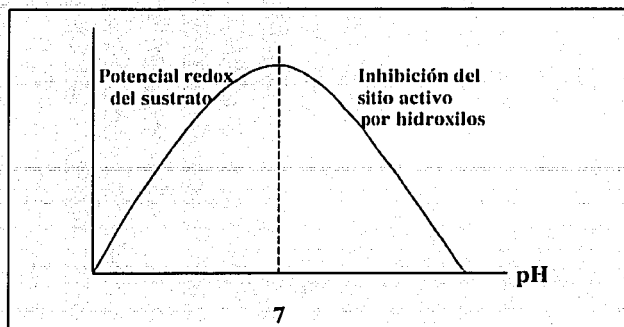


Figura 6. Esquema de perfil de pH hipotético de las lacasas fungales para sustratos ionizables.

2.5 LACASAS INTRACELULARES

Hasta este momento hemos descrito las características más importantes de las lacasas fungales y de plantas. Como mencionamos, en ambos casos se trata de proteínas extracelulares, pero también es importante destacar la existencia de lacasas intracelulares.

Se ha reportado que algunos hongos de pudrición blanca producen lacasas intra y extracelulares [45, 46, 89]. En algunos hongos como el basidiomiceto *Trametes versicolor* [96] y el hongo parásito de la castaña *Cryphonectria parasitica* [95] se ha encontrado actividad de lacasas intracelulares. Estas lacasas oxidan el mismo tipo de sustratos comunes a todas las lacasas, y han sido diferenciadas de las extracelulares en función de su pH óptimo, punto isoelectrico y peso molecular. Acerca del origen de estas enzimas se ha propuesto que pueden ser lacasas intracelulares verdaderas, lacasas extracelulares antes de ser secretadas, o una combinación de ambas. No obstante se requiere más información sobre su síntesis y actividad, así como de su función fisiológica y localización en compartimentos subcelulares, para llegar a una conclusión [103].

3. JUSTIFICACIÓN

Hasta aquí se han descrito las características físicas y bioquímicas de las lacasas, así como las funciones que tienen en la naturaleza y algunas de sus aplicaciones biotecnológicas. Dentro de los puntos más importantes y distintivos de este grupo de enzimas mencionamos que las lacasas mejor caracterizadas y que se han utilizado en diversas aplicaciones biotecnológicas son las fungales. Estas enzimas oxidan diversos sustratos en ausencia de peróxido y su especificidad varía de una fuente a otra aunque la mayoría no oxidan tirosina o sustratos comunes a los de otras polifenoloxidasas [111].

En biotecnología ambiental se han utilizado diversas lacasas fungales para oxidar compuestos contaminantes, pero se ha encontrado que estas presentan desventajas pues oxidan pocos sustratos además de que requieren mediadores potencialmente tóxicos [58]. Pensando en la posibilidad de encontrar una opción que rebase estas limitantes, proponemos utilizar lacasas bacterianas, específicamente la lacasa de *M. mediterranea*.

En este trabajo nos enfocaremos en el estudio de la enzima PPO1 de *M. mediterranea* que se distingue de las demás lacasas porque oxida una mayor variedad de sustratos orgánicos [100]. Esta proteína no ha sido caracterizada bioquímicamente, pero como se mencionó con anterioridad se ha reportado que es una enzima con actividad de monofenoloxidasas y difenoloxidasas [100]. La secuencia deducida para esta enzima muestra que tiene un grupo de histidinas adicional que se piensa está relacionado con la doble función de lacasa y tirosinasa [99]. Así, la versatilidad de esta enzima para hidroxilar tirosina y oxidar fenoles, aunado a su tolerancia intrínseca a elevadas concentraciones de sal, la hace potencialmente importante en biotecnología.

4. HIPÓTESIS

Dado que la lacasa de *Marinomonas mediterranea*, a diferencia de las fungales, utiliza naturalmente sustratos tanto de lacasa como de tirosinasa, proponemos que puede ser una herramienta útil para la degradación o transformación de una mayor diversidad de sustratos de interés biotecnológico.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar bioquímicamente la lacasa de *Marinomonas mediterranea*.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Verificar la fase de crecimiento bacteriano en la que se produce la enzima de manera eficiente.
2. Extraer y purificar la enzima.
3. Evaluar el efecto del pH, sales, temperatura e inhibidores sobre la actividad enzimática.
4. Determinar la actividad de lacasa con diferentes sustratos típicos de lacasa y tirosinasa.
5. Calcular las constantes cinéticas para aquellos sustratos que sean oxidados.
6. Determinar el potencial redox de la enzima.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados como sustratos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. Los reactivos para la preparación de los medios de cultivo fueron obtenidos de J.T. Baker, lo mismo que las sales utilizadas para los ensayos de tolerancia a sal y para la preparación de los diferentes Buffers. Los colorantes fueron obtenidos de BASF y ANIL-FRANC S.A. Los inhibidores fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. y J.T.Baker. Los reactivos utilizados para la cuantificación de proteínas fueron obtenidos de BIO-RAD.

6.2 Cepa y condiciones de cultivo

La bacteria *Marinomonas mediterranea* [100] fue cultivada en Medio Marino Complejo (MMC), compuesto por 20 g de NaCl, 7g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.3 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.7 g de KCl, 1.25 g de $CaCl_2$, 5 g de peptona y 1 g de extracto de levadura, en un litro de agua. La solución fue ajustada a pH 7.4 con NaOH, y después de autoclavarla, fue suplementada con 75 mg de K_2HPO_4 y con 0.1 g de $FeCl_3$ por litro. La cepa fue mantenida en placas de MMC con agar y sembrada cada 30 días.

6.3 Extracción celular

Para la preparación del extracto, la cepa fue transferida a MMC líquido y cultivada en un fermentador de 10 litros a 30°C, 0.5 vvm y 300 rpm. Después de incubar 10 horas, al inicio de la fase estacionaria (DO 0.66), las células fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 20 minutos y lavadas con Buffer Tris 10 mM pH 8, el paquete celular fue recuperado y la biomasa fue pesada. Un gramo de biomasa fue resuspendido en 3 ml de Buffer Tris 10 mM pH 8 sacarosa al 25%; se agregaron 6 µl de lisozima (0.1 mg/ml) y se incubó durante 10 minutos en hielo; se agregaron 36 µl de $MgCl_2$ (1 M), 19 µl de PMSF (0.2 M) y 75 µl de Brij (200 mg/ml); se incubó por 10 minutos a 37°C. Posteriormente, las células fueron sonicadas y centrifugadas a 13,000 rpm durante 25 minutos, el sobrenadante fue recuperado (extracto inicial).

6.4 Purificación de la enzima

El extracto fue precipitado con sulfato de amonio, el cual se agregó lentamente agitando a 4°C, hasta alcanzar 40% de saturación. Se dejó equilibrar la mezcla durante 2 horas a 4°C y se centrifugó posteriormente recuperando el sobrenadante. Este fue dializado toda la noche contra 15 volúmenes de Buffer Tris 10 mM pH 8 a 4°C. A continuación se pasó por una columna DEAE

Sepharosa fast flow (30 ml de resina) equilibrada con Buffer Tris pH 8 10 mM, eluyendo con un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl en buffer. Las fracciones con actividad fueron colectadas, se dializaron toda la noche contra 15 volúmenes de Buffer Tris 10 mM pH 8 y se concentraron en una celda de ultrafiltración (membrana 30,000 Da). El concentrado se pasó por un cartucho de Interacción hidrofóbica (t-butyl) de 5 ml, equilibrada con Buffer Tris pH 8 10 mM, eluyendo con sulfato de amonio 2M. Las fracciones con actividad fueron colectadas y se centrifugaron dos veces a 13,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue recuperado y concentrado en una celda de ultrafiltración (membrana 30,000 Da). Por último, la preparación se sometió dos veces a permeación en gel (Sephacryl S-200) equilibrada con Buffer Tris pH 8 10 mM. Durante todas las cromatografías, el monitoreo de la enzima se realizó de manera cualitativa observando la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP 2 mM), colocando 100 μ l de sustrato en cada pozo de una placa de poliestireno y añadiendo en seguida 100 μ l de muestra de cada fracción colectada; las fracciones con actividad presentaron color por la formación de producto. La actividad en las fracciones positivas también fue cuantificada espectrofotométricamente. La concentración de proteína fue determinada espectrofotométricamente para verificar el valor de la actividad específica obtenida después de cada paso de purificación, utilizando el método de Bradford que se describe en un apartado posterior.

6.5 Actividades enzimáticas

La actividad de lacasa fue cuantificada espectrofotométricamente a 468 nm, monitoreando la oxidación de 2,6-DMP a 3,3',5,5'-tetrametoxidifenilquinona ($\epsilon = 14\ 800\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$). La actividad de tirosinasa fue evaluada a 475 nm, midiendo la oxidación de L-tirosina y L-dopa a L-dopacromo ($\epsilon = 3\ 700\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$). Los ensayos de actividad de lacasa fueron realizados en 1 ml de Buffer fosfatos 0.1 M pH 5 con 2,6-DMP 2 mM, agregando 10 μ l de extracto. Los ensayos de actividad de tirosinasa se realizaron en 1 ml de Buffer fosfatos 0.1 M pH 5 con L-tirosina 1 mM y 25 μ l de L-dopa (2 mM), más 10 μ l de extracto. Una unidad de actividad (U) fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la aparición de 1 μ mol de producto por minuto, por mililitro. Todas las mediciones se realizaron con el espectrofotómetro Beckman DU 650.

6.6 Perfiles de pH

Se determinó la actividad de lacasa a diferentes pHs (de 3 a 10) con sustratos fenólicos (2,6-DMP, siringaldazina, catecol y guayacol) y no fenólicos (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) ó ABTS y ferrocianuro de potasio). Los buffers utilizados fueron: succinatos 50 mM pH3, acetatos 60 mM pH 4, fosfatos 100 mM pH 5, fosfatos 60 mM pH 6, fosfatos 100 mM pH

7, Tris 10 mM pH 8, boratos 50 mM pH 9 y 10. La actividad fue monitoreada espectrofotométricamente a la absorbancia correspondiente para cada sustrato: 2,6-DMP (468 nm, $\epsilon=14.8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), siringaldazina (530 nm, $\epsilon=64\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), catecol (388 nm, $\epsilon=1.3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ABTS (436 nm, $\epsilon=29.3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), ferrocianuro de potasio (405 nm, $\epsilon=0.90\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y guayacol (470 nm, $\epsilon=26.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Todas las reacciones fueron realizadas a los distintos valores de pH, en un mililitro de buffer agregando 0.3 U de enzima y el sustrato a la concentración final correspondiente (2,6-DMP 2mM, siringaldazina 0.05 mM, catecol 2 mM, ABTS 5 mM y ferrocianuro de potasio 20 mM). Los ensayos fueron realizados por triplicado a 30°C, verificando que el pH no fuese alterado al agregar el sustrato o la enzima.

6.7 Perfiles de tolerancia a sal

Se determinó la tolerancia a NaCl, KBr, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaH_2PO_4 y NaF a diferentes concentraciones (50, 100, 200, 500 y 1000 mM), para lo cual se incubó la enzima (0.16 U) en 1 ml de buffer fosfatos 100 mM pH 5 a la concentración de sal correspondiente. Se determinó la actividad residual después de incubar cinco minutos ó una hora con la sal, colocando 990 μl de la mezcla de enzima y 10 μl de sustrato (2,6-DMP 200 mM). Los mismos ensayos se efectuaron a pH 7, usando buffer fosfatos 100 mM. El valor de I_{50} corresponde a la concentración de sal a la cual se reduce la actividad enzimática inicial en un 50%. Todas las mediciones se hicieron por triplicado a 30°C.

6.8 Degradación de colorantes y otros sustratos

Se determinó la capacidad de la enzima para degradar diferentes sustratos fenólicos y no fenólicos típicos de lacasas fungales: catequina, ácido elágico, naringenina, ácido ferúlico, ácido vanillico, ácido siríngeo, n-propilgalato, epicatequina, 1-hidroxibenzotriazol y ácido gálico. Para realizar los ensayos, se incubó la enzima con cada sustrato durante una hora y se observó si ocurría algún cambio colorimétrico, que indicara actividad de la enzima. Los ensayos se efectuaron en buffer fosfatos 100 mM pH 5.

Se probaron diversos colorantes comerciales, el listado se muestra en la Tabla 6. Cada colorante se disolvió en buffer fosfatos 100 mM pH 5. Para determinar si la enzima pura podía degradarlos, se realizó un barrido en el espectrofotómetro (λ 250nm a 800 nm) para establecer cuál era el pico de absorbancia máxima de cada colorante. El valor de absorbancia obtenido, fue ajustado a 1 unidad de absorbancia para cada colorante y después de incubar cada uno con la

enzima pura (4 U), en buffer fosfatos 100 mM pH 5, se midió la disminución del pico máximo de absorbancia, después de 1, 2, 6 y 12 horas.

Tabla 6. Listado de colorantes comerciales probados en este trabajo.

MARCA COMERCIAL DEL COLORANTE			
BASF	BASF	ANIL-FRANC. S.A.	ANIL-FRANC. S.A.
Negro ácido 194	Azul Vat	Amarillo disperso 3	Rojo foron
Azul ácido 185	Amarillo Vat	Amarillo foron 4D-4GRL	Rojo disperso 60
Negro directo 22	Rojo Vat	Amarillo reactivo BR	Rojo reactivo 19
Azul disperso 56		Amarillo oriosol	Turquesa oriosol
Azul disperso 79		Azul foron	Verde oriosol
Rojo disperso 60		Azul marino foron	Verde reactivo
Rojo disperso 161		Amarillo reactivo	
Anaranjado disperso 30		Amarillo reactivo X6	
Amarillo disperso 54		Azul oriosol	
Azul reactivo 198		Escarlata oriosol	
Azul reactivo 19		Naranja oriosol	
Rojo reactivo 180		Naranja reactivo	
Rojo reactivo 141		Negro oriosol	
Amarillo reactivo 84		Negro disperso	
Negro sulfuro 1		Rojo disperso 1	

6.9 Constantes cinéticas

Se determinaron las constantes cinéticas de la enzima para los siguientes sustratos: 2,6-DMP, siringaldazina, catecol, guayacol, L-dopa, tirosina, ferrocianuro de potasio y ABTS. Para ello se midió la actividad de la enzima purificada con diferentes concentraciones de sustrato, hasta llegar a la concentración de saturación. Todas las reacciones se efectuaron en un mililitro de buffer fosfatos al pH óptimo de cada sustrato y se midieron espectrofotométricamente a la longitud de onda correspondiente. Los pHs óptimos para cada sustrato fueron los siguientes: 2,6-DMP pH 5, siringaldazina pH 7, catecol pH 5, guayacol pH 3, L-dopa pH 6.5, tirosina pH 6.5, ferrocianuro de potasio pH 5, ABTS pH 5. Las constantes cinéticas k_{cat} y K_m se calcularon con las velocidades iniciales específicas, obtenidas mediante la ecuación de Michaelis-Menten, utilizando el programa Enzfitter. Los ensayos se realizaron por triplicado a 30°C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.10 Perfil de temperatura

Se midió la actividad de la enzima pura en un rango de temperaturas de 25 a 85°C utilizando como sustrato 2,6-DMP. Los ensayos se realizaron en un mililitro de Buffer fosfatos 100 mM pH 5 el cual fue atemperado en un baño de agua (Fisher Scientific Isotemp 1016S) a la temperatura correspondiente, inmediatamente se agregaron 10 μ l de 2,6-DMP (200 mM) y 20 μ l de enzima. Las mediciones se efectuaron a 30°C dos veces por triplicado.

6.11 Ensayos de Termoestabilidad

La enzima pura fue incubada a 40, 50, 60, 70 o 80°C, en un baño de agua (Fisher Scientific Isotemp 1016S) durante una hora. Para cada temperatura, cada diez minutos se determinó la actividad de la enzima midiendo en el espectrofotómetro actividad residual, a una absorbancia de 468 nm, usando como sustrato 2,6-DMP (2 mM). Las mediciones se realizaron colocando 20 μ l de enzima en 970 μ l de Buffer fosfatos 100 mM pH 5, ambos a la temperatura correspondiente y 10 μ l de 2,6-DMP 200 mM. Cada reacción fue realizada por triplicado y monitoreada a 468 nm.

6.12 Ensayos de Inhibición

Se probaron los siguientes compuestos: azida de sodio (NaN_3), etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA), cianuro de potasio (KCN) y sodio dodecil sulfato (SDS), a diferentes concentraciones (0.1 a 200 mM). Para realizar los ensayos se incubó la enzima pura con cada inhibidor a cada concentración durante 10 minutos y posteriormente se midió la actividad residual espectrofotométricamente, a 468 nm, usando como sustrato 2,6-DMP, para cada reacción se colocaron 0.2 U de enzima en 1 ml de Buffer fosfatos 100 mM pH 5 más el inhibidor a la concentración deseada. Las reacciones se realizaron por triplicado y las mediciones se hicieron a 30°C.

6.13 Cuantificación de proteína

Se utilizó el método de Bradford para cuantificación de proteínas, usando una curva estandar de albúmina de suero bovino. Esto se hizo durante todos los pasos de la purificación y para corroborar la concentración final de la enzima pura [35].

6.14 Electroforesis y tinción de geles

Durante el proceso de purificación se realizó el seguimiento de la enzima mediante electroforesis, para lo cual se prepararon geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%. Las muestras fueron preparadas colocando una mezcla 1:1 de enzima y solución lítica (Tris-Cl 0.5 M pH 6.8,

20% de glicerol y 0.01% de SDS). Los geles se corrieron durante una hora y cuarenta minutos a una corriente constante de 19 mA y 250 V, utilizando buffer de corrida compuesto de Tris base, glicina y SDS 10%. De igual forma se corrieron geles nativos, los cuales a diferencia de los desnaturalizantes, fueron preparados con SDS al 0.1%; la misma concentración de SDS fue agregada al buffer de corrida y a la solución lítica. Los geles desnaturalizantes fueron teñidos con azul de coomasie, para lo cual primero fueron colocados en solución fijadora (metanol al 50% y ácido acético al 10%); en seguida se adicionó solución de teñir (azul de coomasie R-250 al 0.05%, metanol al 50% y ácido acético al 10%); por último, después de cuatro horas se agregó solución para desteñir hasta visualizar las bandas de proteína. Los geles nativos fueron teñidos por actividad utilizando como sustratos 2,6-DMP (0.2 mM), tirosina (1 mM) y L-Dopa (1 mM), para lo cual primero fueron equilibrados en buffer fosfatos 100 mM pH 5 durante 10 minutos y después el sustrato fue adicionado efectuándose la reacción a pH 5.

6.15 Cálculo del potencial redox

La determinación del potencial redox se realizó con la enzima pura a una concentración de 0.38 mg/ml en Buffer Tris 10 mM pH 8, midiendo con un electrodo de platino a una velocidad de 500 mV/min, usando como estandar una solución de KNO_3 0.1 M (1 ml) + $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1 ml).

6.16 Cálculo de sitios activos de la enzima

Para realizar el cálculo de los sitios activos en la enzima se utilizaron diferentes concentraciones del inhibidor azida de sodio (0-0.1 mM). Los ensayos se realizaron en 1 ml de buffer fosfatos 100 mM pH 5, colocando 0.7 U de enzima y el inhibidor a la concentración correspondiente. Después de incubar durante 30 minutos, se colocaron 990 μl de la mezcla y 10 μl de sustrato (2,6-DMP 200 mM) y se determinó la actividad residual espectrofotométricamente. Cada reacción se hizo por triplicado y con los datos obtenidos se realizó un ajuste lineal, obteniendo el valor correspondiente a la concentración de los sitios activos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA

Como primer paso verificamos en qué fase de crecimiento bacteriano se producía la polifenoloxidasas de *Marinomonas mediterranea* (MmPPO1) eficientemente. Para esto se cultivó la bacteria en un fermentador de 10 litros, se midió turbidez cada dos horas en el espectrofotómetro (600 nm) y actividad de lacasa usando como sustrato 2,6-DMP. El resultado se muestra en la figura 7, en donde observamos que la acumulación de la actividad alcanza un máximo al inicio de la fase estacionaria, diez horas después de la inoculación. Por lo tanto, decidimos que la recolección de las células para la preparación posterior del extracto se realizaría en esta fase, con una absorbancia aproximada del cultivo de 0.66 Uabs a 600 nm.

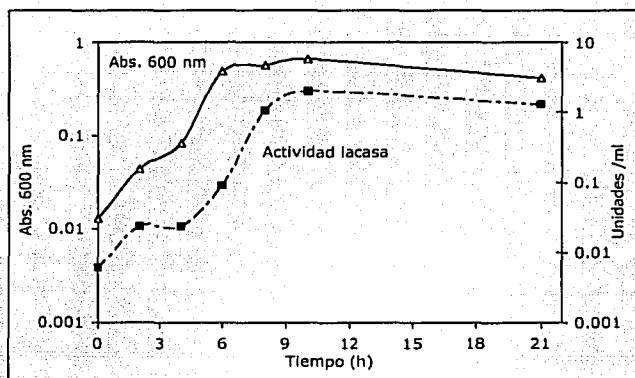


Figura 7. Crecimiento de *M. mediterranea* y acumulación de la actividad de MmPPO1.

El extracto se preparó tal como se explica en la metodología, y con base en el punto isoeléctrico deducido para la enzima (4.7) se comenzó la purificación a pH 6. Durante el procedimiento observamos una pérdida significativa de la actividad y pensamos que podría deberse a proteólisis enzimática, por lo cual se realizó el siguiente experimento: se incubó el extracto durante 24 horas en diferentes buffers: pH 4.5, 5, 6, 8 y 10; pasado este tiempo se midió actividad y se realizó una electroforesis para observar si ocurría algún cambio en el patrón proteico. Lo mismo se hizo a pH 6 en presencia de inhibidores de proteasas (quimiotripsina, tripsina, papaina, termolisina y pronasa). En cuanto a la actividad, ésta disminuyó a todos los valores de pH pero su reducción fue más notoria para el extracto incubado a pH 6 sin inhibidor ya que solo se conservó el 65% de actividad, mientras que en el extracto incubado al mismo pH con inhibidores de proteasas

se retuvo el 78% de actividad, por lo anterior confirmamos que la disminución de actividad se debía a la acción de alguna proteasa. Sin embargo, a pH 8 y 10, en ausencia de inhibidores de proteasas, hubo una disminución en la actividad mucho menor que el registrado a pH 6 con inhibidores de proteasas, lo cual sugirió que el pH también era un factor determinante (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad de MmPPO1 (U) después de incubar el extracto a diferentes valores de pH.

PH	Actividad (U)	(%)
1. Extracto inicial	1.28 ± 0.061	100
2. pH 4.5	0.98 ± 0.004	76.5
3. pH 5	0.97 ± 0.031	75.7
4. pH 6	0.84 ± 0.052	65.7
5. pH 8	1.09 ± 0.080	85.15
6. pH 10	1.09 ± 0.032	85.15
7. pH 6 con inhibidor de proteasas	1.01 ± 0.040	78.9

El resultado anterior se confirmó con electroforesis nativa y desnaturalizante, observándose algunos cambios que llamaron nuestra atención. Primero, en el gel desnaturalizante encontramos que a pH 6 sin inhibidor ocurría la degradación de la enzima, cuyo peso estimado fue de 59 kDa, pues la banda correspondiente a la MmPPO1 desaparecía, mientras que aparecían dos bandas más pequeñas que no estaban presentes ni en el extracto original ni en el resto de las muestras (Figura 8A). Para confirmar estos resultados, se corrió un gel nativo teñido por actividad (Figura 8B), en el cual se observó claramente que en el carril correspondiente al extracto incubado a pH 6 sin inhibidor, en lugar de una banda de actividad aparecían dos bandas, a diferencia de todas las demás muestras en las que solo se observaba una banda. Esto último nos pareció interesante pues teníamos una proteína cuya proteólisis era promovida a pH 6 en ausencia de inhibidores de proteasas y que generaba como producto una proteína más pequeña que seguía siendo activa. Con los resultados obtenidos y dado que a pH 8 no ocurrió degradación de la enzima y la actividad fue conservada decidimos cambiar el pH al cual se realizaría la purificación de 6 a 8, además de agregar inhibidores de proteasas durante la preparación del extracto.

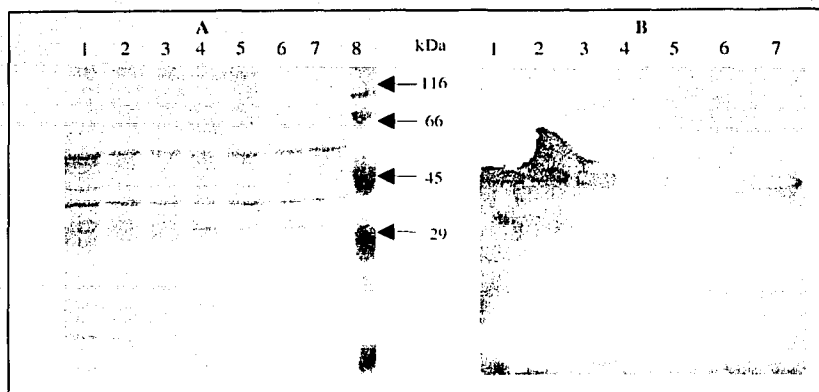


Figura 8. El panel A corresponde al gel de poliacrilamida desnaturalizante con las muestras incubadas a diferentes valores de pH. En B se muestra el gel nativo teñido por actividad. Carril: 1) extracto inicial, 2) pH 4.5, 3) pH 5, 4) pH 6, 5) pH 8, 6) pH 10, 7) pH6 con inhibidores de proteasas, 8) marcador de peso molecular.

Posteriormente, se realizó la purificación de la enzima con base en el siguiente esquema: realizar la extracción, precipitar con sulfato de amonio al 30 %, dializar el sobrenadante, después pasarlo por una columna de permeación en gel (Sephacryl S-200) y por último una cromatografía de intercambio iónico. Este protocolo fue probado utilizando diferentes matrices de permeación en gel y resinas de intercambio aniónico y catiónico; se probaron también matrices de interacción hidrofóbica en lugar del intercambio iónico. Sorprendentemente y a pesar de la predicción de propiedades basada en la secuencia, con ninguna de estas columnas se logró retener la actividad.

Con esta información, decidimos cambiar el esquema de purificación al siguiente: preparar el extracto y precipitarlo con sulfato de amonio al 30%, recuperar el sobrenadante y dializarlo contra quince volúmenes de buffer Tris 10 mM pH 8, pasar el dializado por la columna de intercambio aniónico (DEAE Sepharosa fast flow) utilizando un gradiente de elución de 0 a 1 M de NaCl; y por último realizar dos permeaciones en gel con la resina Sephadex G-100. Los resultados de aplicar este protocolo se reflejaron en una reducción significativa de la proteína total (de 2,051 a 55 mg), logrando un rendimiento de 15.12% y una actividad específica de 322.09 mU/mg. Otro resultado importante que obtuvimos fue que aplicar la cromatografía de intercambio aniónico antes de la permeación en gel, nos permitió separar dos picos diferentes (A y B) que oxidaron 2,6-DMP pero que fueron colectados uno al inicio y otro al final del gradiente (Figura 9).

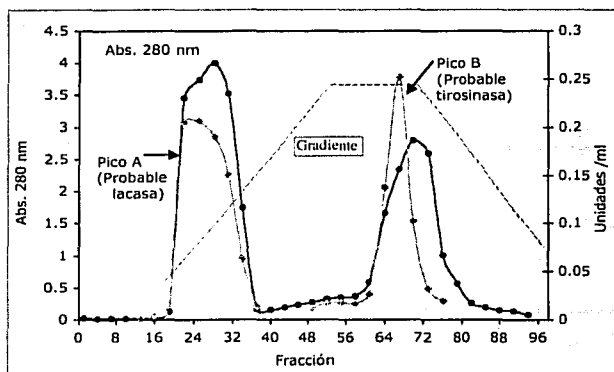


Figura 9. Cromatografía de intercambio aniónico mostrando los picos A y B con actividad de lacasa, colectadas al inicio y al final del gradiente respectivamente.

Con el antecedente de que la bacteria *M. mediterranea* produce dos polifenoloxidasas, una que oxida preferentemente sustratos de lacasa (PPO1) y otra que oxida sustratos de tirosinasa (PPO2) [100], decidimos verificar si las actividades de los picos A y B correspondían a estas enzimas, para lo cual se determinó su capacidad de oxidar sustratos tanto de lacasa (2,6-DMP) como de tirosinasa (L-tirosina y L-dopa), encontrando que en cada fracción se presentaba una relación de actividad distinta para ambos (Tabla 8). El pico A presentó un perfil de actividad típico de lacasa ya que oxidó preferentemente 2,6-DMP, mientras que el pico B mostró una menor actividad para este sustrato y una relación casi equivalente para los dos sustratos por lo que concluimos que la actividad correspondía a la tirosinasa. Dado que el pico A oxidó preferentemente sustratos de lacasa, decidimos hacer el seguimiento de estas fracciones y concluir con su purificación. Para ello, el pico A fue pasado por dos cromatografías de permeación en gel (Sephacryl S-200 y Sephadex G-100).

Tabla 8. Actividades específicas (mU/mg) de los picos A y B con sustratos de lacasa (2,6-DMP) y tirosinasa (L-tirosina y L-dopa).

	2,6-dimetoxifenol	L-tirosina + L-dopa	Relación 2,6-DMP/tirosina
Pico A	221.2	14.37	15
Pico B	29.74	28.89	1.05

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Durante toda la purificación, realizamos el seguimiento del proceso mediante electroforesis, utilizando geles desnaturizantes y nativos. En el gel desnaturizante (Figura 10A) es importante observar la reducción en el contenido total de proteína conforme avanza la purificación, hasta llegar al paso final en donde se observan solo dos bandas de proteína, una mayoritaria de aproximadamente 59 kDa (correspondiente a la MmPPO1) y otra minoritaria de aprox. 50 kDa. Por otra parte, en el gel nativo teñido por actividad (Figura 10B) se aprecia claramente que en los carriles correspondientes al extracto inicial, precipitación y diálisis aparece una banda de actividad única, misma que no aparece en el carril correspondiente al pico B (carril 4); mientras que en los carriles correspondientes al pico A (6, 7 y 8) se observan dos bandas con actividad. Respecto a la aparición de estas dos bandas de actividad, y con el antecedente de que la proteína bajo ciertas condiciones era susceptible a proteólisis, pensamos que la polifenoloxidasas (59 kDa) podría estar siendo proteolizada después del paso de diálisis, dado que en primer lugar en el extracto inicial solo era visible una banda de actividad mientras que después de la diálisis aparecían dos bandas; y en segunda instancia, al sobrelapar los geles nativo y desnaturizante que se habían corrido simultáneamente, mientras que la banda de actividad más grande del gel nativo sí alineaba con la proteína de 59 kDa correspondiente a la MmPPO1 en el gel desnaturizante, la banda pequeña de actividad presente en el gel nativo no correspondía a la proteína de 50 kDa que aparecía en el gel desnaturizante. Por lo anterior, pensamos en la posibilidad de que la MmPPO1 de 59 kDa estuviera siendo proteolizada generando dos productos, uno de aproximadamente 50 kDa representada por la banda pequeña presente en el gel desnaturizante que no era activa y otro de 9 kDa que no era visible en el gel desnaturizante pero que al ser activa sí podíamos visualizarla en el gel nativo.

Hasta aquí habíamos logrado tener una enzima que aparentemente era proteolizada generando dos productos contaminantes: una proteína de 50 kDa y otra de 9 kDa, por lo que era indispensable separar la enzima completa (59 kDa) de sus productos de proteólisis, para esto probamos otras cromatografías, pero al hacer el seguimiento mediante geles desnaturizantes, al parecer las enzimas de 59 y 50 kDa copurificaban, ya sea que usáramos la columna cromatográfica que fuera, incluso columnas de interacción hidrofóbica, ambas proteínas siempre eran retenidas o eluidas al mismo tiempo. Respecto a la proteína activa de 9 kDa, encontramos que la interacción hidrofóbica era un buen método para separarla de la enzima completa (59 kDa). Por esta razón una vez más replanteamos el esquema de purificación que consistió en los siguientes pasos: preparación del extracto inicial, precipitación con sulfato de amonio, diálisis, intercambio aniónico, interacción

hidrofóbica, ultrafiltración y filtración en gel. Este fue el protocolo de purificación final usado para todas las purificaciones y se realizó tal como se describe en la metodología.

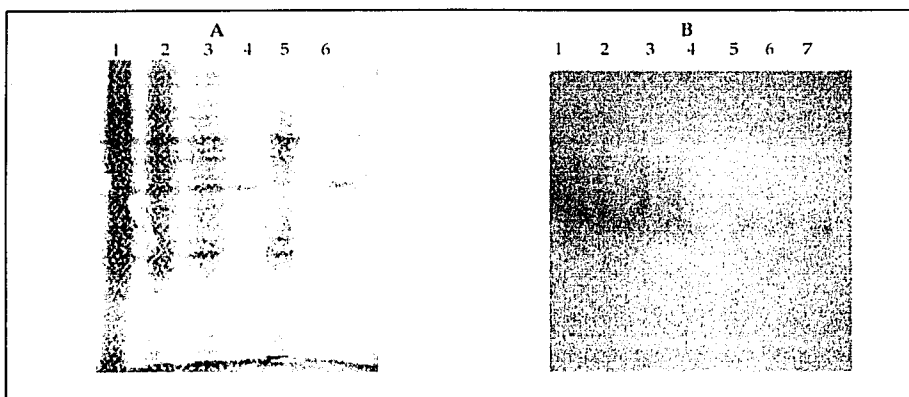


Figura 10. El panel A muestra la electroforesis en gel desnaturizante de los intermediarios de la purificación, carril: 1) extracto inicial, 2) precipitación, 3) diálisis, 4) intercambio aniónico (pico A), 5) int. aniónico (pico B) y 6) permeación en gel. Panel B corresponde a la electroforesis en gel nativo, carril: 1) extracto inicial, 2) precipitación, 3) diálisis, 4) int. aniónico (pico A), 5) int. aniónico (pico B), 6) permeación en gel I, 7) permeación en gel II.

Los resultados de la purificación usando este nuevo protocolo se resumen en la tabla 10. En este caso se obtuvo una preparación con actividad específica de 250 mU/mg y un rendimiento del 12.15%. Es importante mencionar que aunque la proteína total disminuyó de manera importante, de 4 a 0.116 g, y la actividad total inicial (25 U) se conservó al final de la purificación casi en un 100 %, esto no se reflejó en el rendimiento, debido a que después del paso de diálisis, se obtuvo un incremento importante en la actividad, mismo que pudo ser resultado de que al dializar se removieran compuestos que interferían con el ensayo de medición de actividad.

En la figura 11 se observan los geles correspondientes a esta purificación. En 11A se muestra un gel desnaturizante teñido con coomassie en donde se puede ver una reducción de la proteína conforme se avanza en la purificación hasta el paso final donde se aprecian solo dos bandas, una mayoritaria correspondiente a la MmPPOI completa (59 KDa) y otra minoritaria de menor peso molecular (50 KDa) representando el producto de proteólisis inactivo. En 11B se observa el gel nativo teñido por actividad con las muestras en el mismo orden que 11A, en donde es importante notar que en el paso final de la purificación se observa solo una banda de actividad, con

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

lo cual demostramos que después de pasar la proteína por interacción hidrofóbica logramos separar la enzima completa del producto de proteólisis con actividad.

Tabla 9. Resumen de una purificación típica de la enzima MmPPO1.

	Extracto Inicial	Precip. sulfato de amonio 40%	Diálisis	Intercambio aniónico	Interacción Hidrofóbica	Filtración en gel
Actividad (mU/ml)	509	573	1,520	1,030	196	415
Proteína (mg/ml)	94.74	47.56	27.37	5.56	4.09	1.93
Actividad esp. (mU/mg)	5.37	12.04	55.53	185.25	47.92	215
Volumen (ml)	50	52	135	137	185	60
Actividad total (mU)	25.46	29.8	205	142.2	35.15	24.91
Proteína total (mg)	4,737	2,473	3,696	761.72	756.65	116.1
Factor de purificación	1	2.24	10.34	34.49	8.92	40.03
Rendimiento (%)	12.41	14.53	100	69.36	17.14	12.15

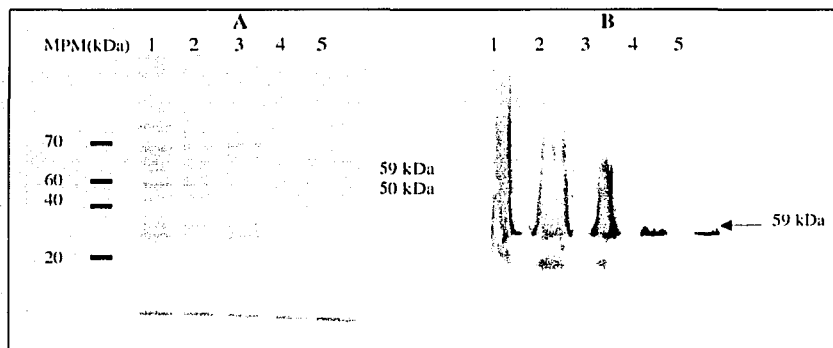


Figura 11. Electroforesis de una purificación típica de la MmPPO1. En el panel A se muestra un gel desnaturalizante teñido con coomasie; B corresponde al gel nativo teñido por actividad. Carriles: 1) extracto inicial, 2) precipitación con sulfato de amonio al 40%, 3) diálisis, 4) intercambio aniónico (pico A), 5) interacción hidrofóbica (pico A).

Así pues, como mencionamos anteriormente aunque habíamos logrado separar el producto de proteólisis activo (9 kDa) de la proteína completa mediante interacción hidrofóbica, al correr los geles desnaturalizantes seguíamos obteniendo dos proteínas, la MmPPO y un producto de proteólisis inactivo (50 kDa), ambas al parecer copurificaban. Los mismos resultados fueron obtenidos en purificaciones posteriores, sin embargo encontramos que si corríamos las mismas muestras en geles nativos, solo observábamos una banda de proteína y de actividad al tñirlos con coomasie y por actividad respectivamente (Figura 12).

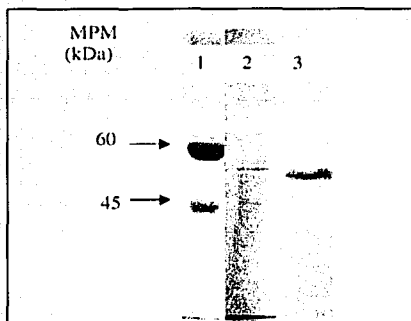


Figura 12. Gel nativo de la MmPPOI pura teñido por actividad (3) y con coomasie (2).

Para responder a la pregunta evidente de porqué en el gel nativo observábamos solo una banda de proteína mientras que en el desnaturalizante aparecían dos bandas y dado que la única diferencia importante entre ambos geles es que este último tiene SDS, pensamos en la posibilidad de que la MmPPOI estuviera formada por varias subunidades y que su disociación fuera promovida por la presencia de SDS durante la electroforesis desnaturalizante. Para corroborar o descartar esta idea realizamos un experimento en el cual se colocó una alícuota de la enzima con diferentes concentraciones de SDS (0.069-17.3 mM), las preparaciones se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se corrieron en geles nativos con 0.346 mM de SDS (Figura 13). Lo que observamos fue que a medida que aumentaba la concentración de SDS, la banda correspondiente a la proteína pequeña (50 kDa) se hacía más visible, hasta establecerse una relación estequiométrica uno a uno entre las dos bandas, esto es evidente sobre todo en la última muestra, la cual había sido calentada en solución lítica con una concentración de SDS de 34.6 mM. No obstante, a ninguna concentración de SDS logramos ver la disociación total, razón por la que

decidimos incubarla a mayores concentraciones de SDS (1-500 mM), pero tampoco logramos disociarla totalmente, ni siquiera al calentar las muestras (datos no mostrados).

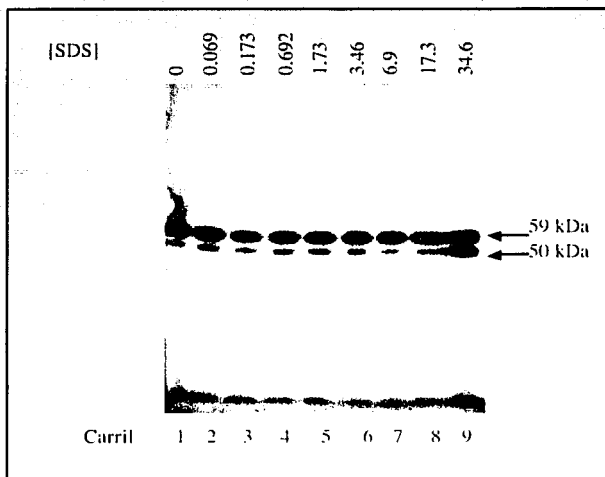


Figura 13. Gel nativo con 0.1% de SDS teñido con coomasie con la MmPPO1 incubada a diferentes concentraciones de SDS (mM).

En relación al SDS, este compuesto ha sido reportado como inhibidor de lacasas fungales [105], por lo que surgió la pregunta de cuál sería el efecto sobre la actividad de la MmPPO1. Para responder a este cuestionamiento realizamos otro experimento que consistió en incubarla con diferentes concentraciones de SDS y después las muestras se corrieron en un gel nativo que fue teñido por actividad. En la figura 14 se muestra el gel correspondiente, en el cual es claro que para todas las concentraciones de SDS, la proteína se disoció y que en ambas bandas se conservó la actividad, incluso para aquella muestra con mayor concentración de SDS que había sido incubada a 85 °C y a la cual se le había agregado solución lítica (carril 8). Esto indicaba que el SDS a esas concentraciones no afectaba la actividad enzimática, por lo que para corroborarlo, con las mismas muestras se midió la actividad de lacasa espectrofotométricamente usando como sustrato 2,6-DMP. Los valores de actividad para cada muestra fueron muy parecidos, en la mayoría de las concentraciones se conservó casi el 100% de actividad, por lo que concluimos que la actividad no sufrió una disminución importante por efecto del SDS a las concentraciones probadas.

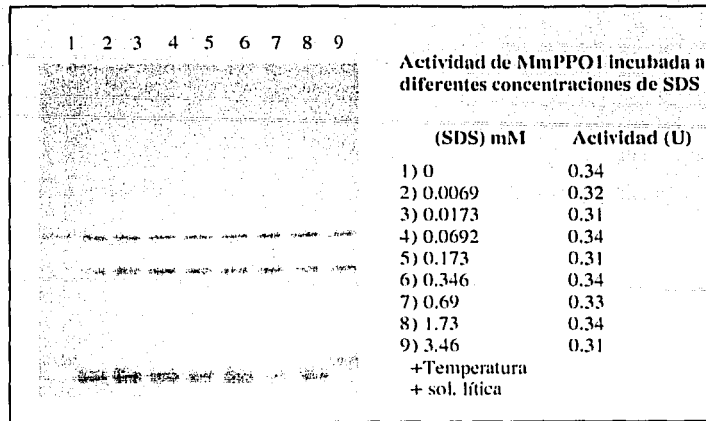


Figura 14. Gel nativo (0.1% SDS) teñido por actividad con la MmPPO1 incubada a diferentes concentraciones de SDS (mM): carril 1) 0, 2) 0.69, 3) 1.73, 4) 6.92, 5) 17.3, 6) 34.6, 7) 69, 8) 173, 9) 346.

Con los resultados de los experimentos anteriores llegamos a dos conclusiones importantes: primero que la disociación de la proteína MmPPO1 era promovida por la presencia de SDS y en segundo lugar que la acción de este detergente sobre la enzima daba lugar a la formación de dos productos, los mismos que ya habíamos obtenido anteriormente, uno pequeño de 9 kDa activo y otro grande de 50 kDa inactivo, cuyo origen atribuímos a una actividad proteolítica endógena del extracto. El tamaño de los productos lo verificamos al correr simultáneamente dos geles, uno desnaturizante y otro nativo con las muestras incubadas a diferentes concentraciones de SDS, que después fueron sobrelapados. Encontramos nuevamente que la banda de 59 kDa (MmPPO1) alineaba con la banda más grande del gel nativo, mientras que la pequeña (50 kDa) no correspondía a la banda inferior del gel nativo. Con base a estas evidencias retomamos la hipótesis de que la enzima MmPPO1 estaba siendo disociada, dando lugar a la formación de dos productos, una proteína de 50 kDa que era inactiva y a otro producto de 9 kDa con actividad, por acción del SDS y no de una proteasa (Figura 15).

Por otro lado, una vez que obtuvimos la enzima pura siguiendo el esquema de purificación descrito en la metodología, realizamos su caracterización bioquímica. Para asegurarnos de que la enzima a caracterizar realmente fuera la correspondiente a la MmPPO1 completa y no a sus productos de proteólisis verificamos su estado mediante geles desnaturizantes y nativos cada vez que se efectuaba un experimento. Además es importante dejar claro que para realizar los cálculos

de las constantes cinéticas cuantificamos la concentración de la enzima utilizando la técnica del cálculo de sitios activos con el inhibidor azida de sodio, que se describe en la metodología, asegurando con esto que el valor de concentración correspondiera únicamente a la concentración de la MmPPO1 completa.

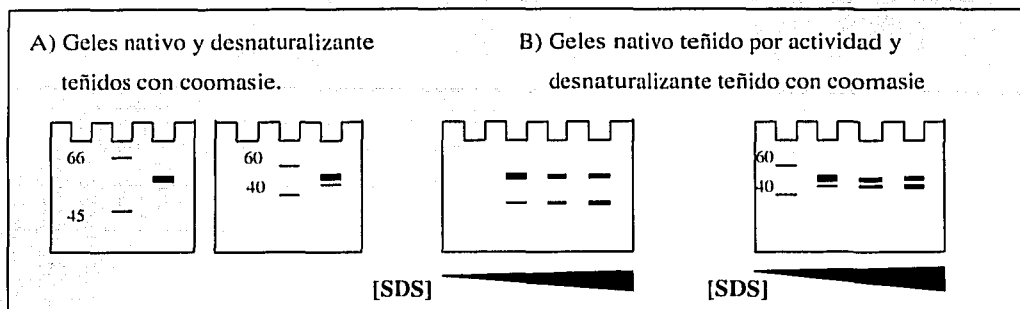


Figura 15. Esquema mostrando la disociación de la MmPPO1 promovida por la presencia de SDS. A corresponde a los esquemas de los geles nativo y desnaturalizante con la enzima purificada teñidos con coomasie; y en B se muestran dos esquemas que corresponden al gel nativo teñido por actividad y al desnaturalizante teñido con coomasie, ambos con la enzima incubada a diferentes concentraciones de SDS.

Por último, retomando el punto de que la bacteria *M. mediterranea* expresa dos polifenoloxidasas y considerando que durante el intercambio aniónico separamos dos picos, uno con actividad de lacasa y el otro con actividad de tirosinasa, decidimos realizar un experimento para determinar sus cinéticas de inducción durante el crecimiento del cultivo, ya que de ser diferentes se simplificaría la purificación. Para lograr esto, hicimos el seguimiento del crecimiento del cultivo cuantificando el contenido total de proteína, además de medir la actividad de lacasa y la de tirosinasa (Figura 16).

Es importante notar que la curva de crecimiento (Abs 600 nm) siguió el mismo comportamiento que la curva para proteína, con lo cual pudimos descartar la posibilidad de que ciertos polímeros producidos por la bacteria pudieran interferir con la medición espectrofotométrica. En cuanto a la actividad de la MmPPO1, observamos que esta se induce a las tres horas de cultivo y llega a su máximo al inicio de la fase estacionaria, doce horas después de la inoculación. En contraste, la actividad de tirosinasa se induce más lentamente al llegar a la fase pre-estacionaria y se incrementa finalmente en fase estacionaria. Este comportamiento coincide con la melanización del cultivo, uno de los efectos esperados de la presencia de la tirosina. Con este

experimento pudimos concluir que preparar el extracto cuando el cultivo entraba en fase estacionaria seguía siendo la mejor opción pues es en este momento cuando se obtiene la mejor relación entre las dos actividades.

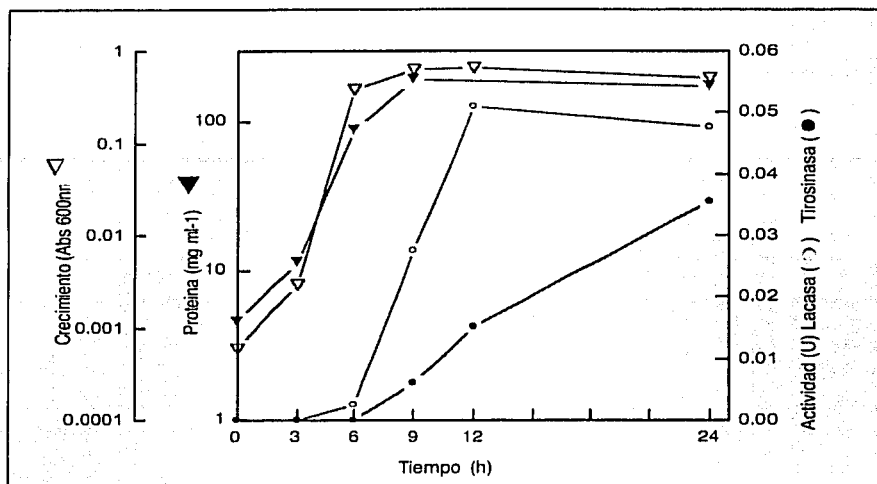


Figura 16. Gráfico en el que se muestra el crecimiento de la bacteria *M. mediterranea* y la producción de proteína total, lacasa y tirosinasa durante las diferentes fases de su crecimiento.

7.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Una vez que la enzima fue purificada, comenzamos con su caracterización bioquímica. Con el objetivo de verificar su rango de actividad, se probaron sustratos típicos de lacasa y tirosinasa [100]. Los sustratos típicos de lacasa fungal que se usaron fueron: 2,6-DMP, catecol, siringaldazina, guayacol, ferrocianuro de potasio, ABTS, catequina, ácido elágico, narigenina, ácido ferúlico, n-propilgalato, epicatequina, 1-hidroxibenzotriazol y ácido gálico, de los cuales solo los seis primeros fueron oxidados por la enzima. Los sustratos típicos de tirosinasa que se probaron fueron: L-dopa, tirosina, ácido vanílico y ácido síringico, de los cuales solo L-dopa fue oxidado. Otros sustratos probados fueron una serie de colorantes comerciales (ver listado en materiales y métodos) que se ha reportado son oxidados por lacasas fungales, sin embargo, ninguno de ellos fue sustrato para la enzima MmPPO1.

7.2.1 Perfiles de pH

Para los sustratos fenólicos (2,6-DMP, siringaldazina y catecol) y no fenólicos (ABTS y ferrocianuro de potasio) que fueron oxidados por la enzima se realizaron los perfiles de pH. Al mismo tiempo se hicieron los perfiles de pH para los mismos sustratos pero usando una lacasa fungal (*Coriolopsis gallica*), con la finalidad de compararla con MmPPOI (Figura 17).

En cuanto a los sustratos fenólicos, la MmPPOI siguió el mismo comportamiento bifásico común a todas las lacasas fungales pero con ciertas particularidades. En primera instancia, los valores de pH óptimo para todos los sustratos se desfasaron hacia lo básico en por lo menos una unidad, por ejemplo para sustratos como 2,6-DMP y catecol, el pH óptimo de la lacasa fungal fué 4 mientras que el pH óptimo para la MmPPOI fue 5 (Figuras 17A y 17B); respecto a la siringaldazina, el valor de pH óptimo se desfasó en tres unidades, ya que para la fungal fué 4, mientras que para la polifenoloxidasas de *M. mediterranea* fué 7 (Figura 17C). En cuanto a los sustratos no fenólicos, los valores de pH óptimo para la MmPPOI respecto a la lacasa fungal también se desfasaron hacia lo básico en dos unidades tanto para el ABTS como para el ferrocianuro de potasio (Figuras 17D y 17E). La otra diferencia importante que encontramos fué que las lacasas fungales, incluyendo la de *C. gallica*, no son activas a pH 7, mientras que la MmPPOI si presentó actividad importante a este pH, por ejemplo para catecol y 2,6-DMP la enzima conservó alrededor del 80 % de actividad, mientras que para siringaldazina éste fué su pH óptimo; en cuanto al ferrocianuro de potasio y ABTS, la MmPPOI conservó el 20 % de actividad a pH 6, mientras que la de *C. gallica* estaba ya completamente inactivada (Figura 17).

Respecto a las diferencias encontradas entre los perfiles bifásicos que ambas enzimas presentaron para sustratos que se protonan, en la figura 17 se observa que el valor de pH óptimo varía dependiendo de la enzima y el sustrato, no obstante hay una tendencia de la enzima MmPPOI a ser activa a valores de pH más básicos a diferencia de la lacasa fungal la cual a pH 6 está totalmente inactivada. Esta diferencia puede explicarse en función de dos efectos opuestos: uno es el potencial redox del sustrato y el segundo es la inhibición del sitio T2 por hidroxilos. En cuanto al primer componente, a medida que aumenta el pH, los sustratos se desprotonan teniendo como consecuencia una disminución en su potencial redox, lo que hace cada vez más fácil su oxidación, este efecto se refleja en la primera parte de la curva pues a medida que aumenta el pH, incrementa la actividad hasta llegar a un valor máximo. El segundo factor que es dependiente unicamente

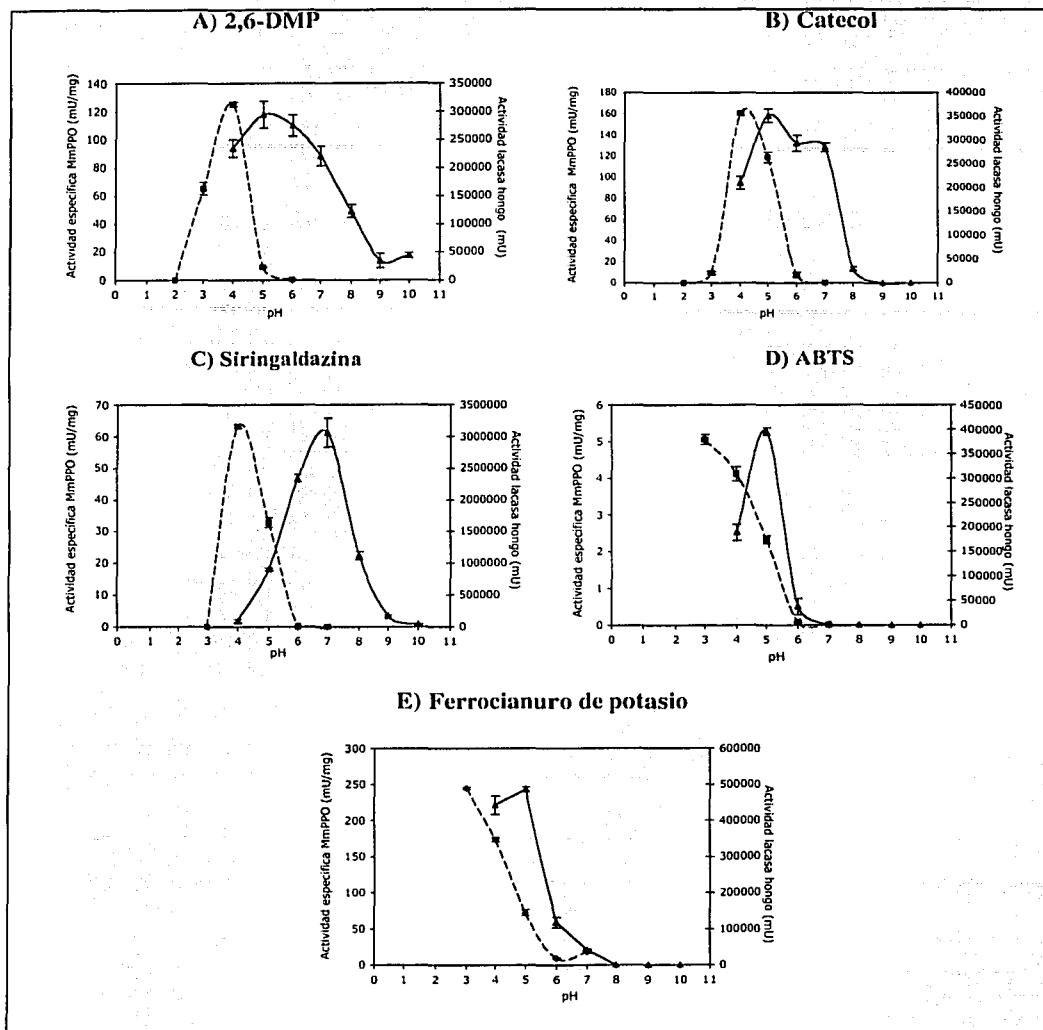


Figura 17. Perfiles de pH para la polifenoloxidasas de *M. mediterranea* (MmPPO) (—▲—) y de la (—●—) lacasa de *Corioloopsis gallica* con sustratos fenólicos: A) 2,6-DMP, B) catecol y C) stringaldazina; y no fenólicos: D) ABTS y E) ferrocianuro de potasio.

de la enzima se refiere a la inhibición por acción del ión hidroxilo, el cual se une al cobre del sitio T2 interfiriendo con la transferencia de electrones al interior de la enzima. Este efecto se observa después de alcanzar el máximo de actividad, de tal forma que a medida que el pH se alcaliniza con la consecuente acumulación de hidroxilos, se incrementa el efecto inhibitorio hasta llegar a la

pérdida total de la actividad. En el caso de sustratos que no se protonan como ABTS, la actividad es independiente del potencial redox del sustrato, observándose solo el efecto inhibitorio ocasionado por hidroxilos, correspondiente a la segunda fase en la curva bimodal, el cual dependerá de las características de la enzima únicamente. Para los dos sustratos no protonables ensayados con la MmPPO1 se observó un comportamiento diferente al de las lacasas fungales, ya que las curvas para ambos sustratos son bimodales, si bien la primera parte de la curva no es un efecto debido al pH sobre los sustratos ya que estos no se protonan, lo que indica es que en la MmPPO1 hay diferencias estructurales que afectan el comportamiento de la enzima de manera distinta a las lacasas fungales.

7.2.2 Tolerancia a sales

Hasta aquí habíamos demostrado que la PPO de *M. mediterranea* es activa a pH 7, la cual es una propiedad que muy pocas lacasas presentan, ya que la gran mayoría trabajan a valores de pH menores a 7 por lo que son llamadas enzimas ácidas. Esto llamó nuestra atención pues las lacasas que son activas a pH neutro son utilizadas en la fabricación de microelectrodos. Sin embargo, las lacasas usadas para esta aplicación además de ser activas a pH neutro, también deben tolerar concentraciones de cloruro de sodio de alrededor de 100 mM, lo cual resulta otra limitante pues las lacasas son inhibidas por haluros. Dado que la PPO de *M. mediterranea* cumplía con el primer requerimiento y pensando en que por su origen marino podría ser una enzima tolerante a elevadas concentraciones de sal decidimos realizar experimentos de tolerancia a sales para corroborar o descartar esta hipótesis.

Para los experimentos de tolerancia a sal, probamos sales como NaCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NaH_2PO_4 . Para esto se tomaron alícuotas de la enzima, se incubaron con cada sal a diferentes concentraciones (0-1 M) y después de cinco o sesenta minutos su actividad residual fue evaluada espectrofotométricamente a pH 5, usando 2,6-DMP como sustrato. Los resultados se muestran en la figura 18, en donde se observa que después de incubar con las diferentes sales durante cinco minutos para el caso de sulfato de amonio (Fig. 18C) y fosfato de sodio (Fig. 18D), la actividad se mantuvo casi en su totalidad a concentraciones de 0.05 a 0.2 M aunque se observó un decremento significativo a concentraciones de 0.5 y 1 M. En cuanto al cloruro de potasio (Fig. 18A) y cloruro de sodio (Fig. 18B), la actividad enzimática disminuyó conforme la concentración de sal fue aumentada e incluso a concentraciones muy altas de sal (1M), se conservó alrededor del 10% de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

actividad. El mismo efecto ocurrió después de incubar la enzima durante sesenta minutos, por lo que concluimos que su estabilidad no era afectada después de una hora de incubación.

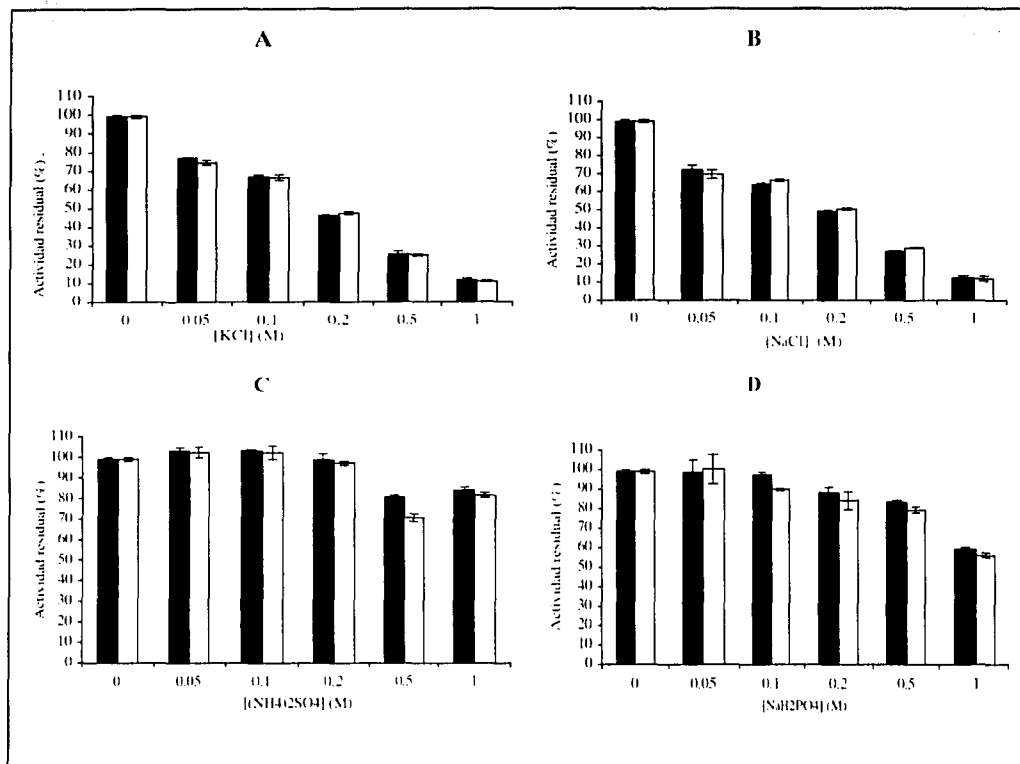


Figura 18. Tolerancia a diferentes sales para la lacasa de *M. mediterranea* después de incubar durante cinco (■) y sesenta minutos (□).

Una vez que demostramos que la lacasa de *M. mediterranea* es activa a concentraciones de NaCl mayores a 0.1 M, realizamos nuevamente los experimentos de tolerancia a sal tanto a pH 5 como a pH 7 usando diferentes haluros (cloruro de sodio, fluoruro de sodio y bromuro de potasio). Para efectuar estos ensayos, la enzima fue incubada durante diez minutos en presencia del haluro a concentraciones de 0.05 a 1 M, y después se midió la actividad residual espectrofotométricamente usando como sustrato 2,6-DMP.

En la figura 19A se muestran los resultados del experimento realizado a pH 5, en este gráfico se observa que el fluoruro de sodio inhibió de manera importante la actividad de la

MmpPO1, ya que a concentraciones de 0.05 M sólo se conservó el 1% de actividad; en el caso del cloruro de sodio, a medida que se aumentó su concentración, la actividad disminuyó. No obstante a 0.1 M la enzima conservó el 83% de su actividad e incluso a 1 M de sal retuvo el 27% de actividad. Para el bromuro de potasio, la actividad se mantuvo casi al 100% en todas las concentraciones pero disminuyó en un 44% con 1 M de sal. En cuanto al experimento efectuado a pH 7, los resultados se muestran en la figura 19B, en donde se aprecia que con fluoruro de sodio, a la concentración más baja se conservó el 11% de actividad, es decir, la enzima fue más activa que a pH 5; en cuanto al cloruro de sodio, la actividad no experimentó cambios importantes ya que a todas las concentraciones esta pareció mantenerse del 70 al 80%; por último para el caso del bromuro de potasio la actividad pareció no haber experimentado disminución significativa, oscilando entre valores del 88 al 95%.

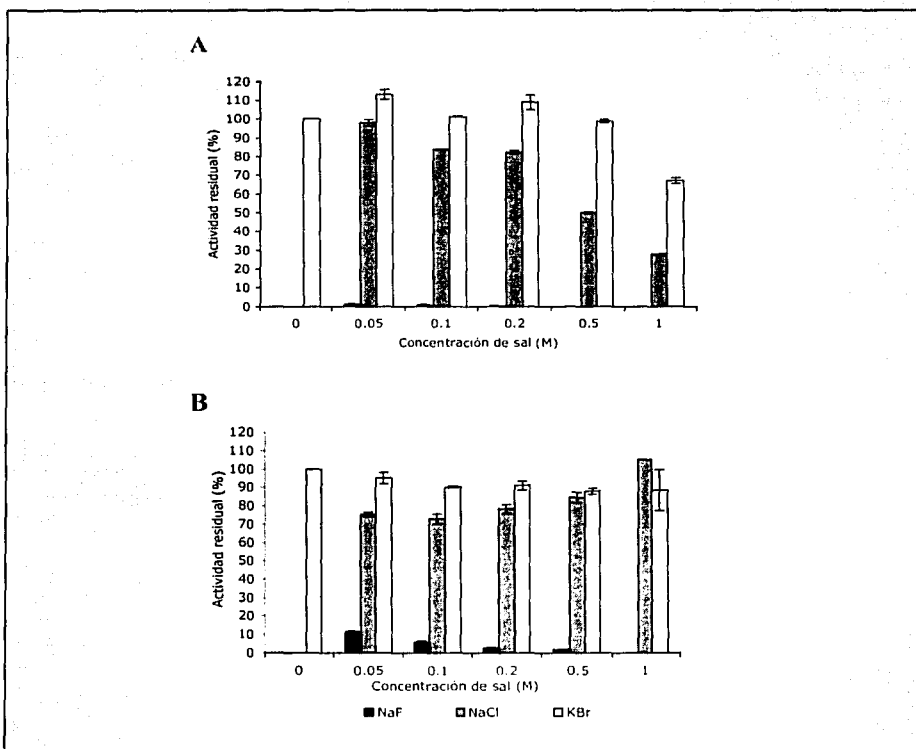


Figura 19. Tolerancia a haluros (NaF, NaCl y KBr) para la MmpPO. Panel A: incubación y ensayos a pH 5. Panel B: incubación y ensayos a pH 7.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con base en la información obtenida en este último experimento pudimos observar un claro efecto inhibitorio a los dos valores de pH probados, ocasionado por la presencia de los diferentes halogenuros. Este tipo de inhibición ha sido reportado para polifenoloxidasas del tipo de las lacasas, y se ha confirmado que iones como el fluoruro se unen al sitio T2 de estas enzimas interrumpiendo así la transferencia de electrones del sitio T1 al T2/T3 [64]. En el caso de este experimento, aunque a ambos valores de pH hubo inhibición, es importante notar que a pH 5 este efecto fué mayor que el obtenido a pH 7 para todas los haluros a todas las concentraciones (Figura 19). Esto podría explicarse en función de que a pH neutro la concentración de hidroxilos es más elevada y dado que estos, al igual que los halógenos se unen al sitio T2 inhibiendo la actividad enzimática, podría estar ocurriendo una competencia entre ambos iones por ocupar el sitio T2, efecto que se ve reflejado en el incremento de la actividad enzimática. Este mismo resultado fue reportado por Xu, quien comprobó que para diferentes lacasas fungales a medida que se alcalinizaba el pH en presencia de fluoruro, se hacía más débil la inhibición por este ión debido a que los hidroxilos se unían de manera competitiva al centro T2/T3 [119].

Después de realizar los ensayos de tolerancia a halogenuros, se efectuó el cálculo del valor de I_{50} , definido como la concentración de sal a la cual es inhibida la actividad enzimática en un 50%. Los valores calculados para la MmPPO1 se compararon con I_{50} de lacasas fungales (Tabla 10), encontrando que la polifenoloxidasa de *M. mediterranea* es significativamente más estable que las lacasas fungales en todos los tratamientos, lo cual indica que la enzima necesita mayores concentraciones de sal para ser inhibida y por tanto su tolerancia a sal es mayor que la presente en el resto de las lacasas fungales.

Tabla 10. Tabla comparativa de I_{50} de la MmPPO1 y lacasas fungales con diferentes halogenuros [118].

I_{50} (mM)	<i>Marinomonas mediterranea</i>	<i>Trametes villosa</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>Scytalidium thermophilum</i>
NaF	8.1	0.02	0.02	0.05	0.5
NaCl	547	40	50	600	0.4
NaBr	-	200	200	1600	5
KBr	2000	-	-	-	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En función de los resultados obtenidos, llegamos a la conclusión de que la PPO1 de *M. mediterranea* es una enzima que muestra propiedades muy interesantes distintas a las de las lacasas fungales ya que es activa a pH neutro además de ser tolerante a diferentes halogenuros. Ambas características la convierten en una enzima potencialmente importante en biotecnología.

7.2.3 Determinación de constantes cinéticas

Para aquellos sustratos que fueron oxidados por la MmPPO1, y cuyo pH óptimo había sido determinado, se realizó el cálculo de las constantes cinéticas. Para lo cual primero se obtuvo la concentración de la enzima mediante el cálculo de los sitios activos utilizando un inhibidor (azida de sodio). El cálculo de los sitios activos se realizó como se explica en la metodología y se obtuvo un valor de concentración de 1.03 μ M.

Los valores de las constantes cinéticas para la PPO1 de *M. mediterranea* y una lacasa fungal (*Coriolus hirsutus*) se resumen en la tabla 11. Es importante notar que la MmPPO1 fue capaz de oxidar sustratos fenólicos (siringaldazina, catecol y 2,6-DMP) y no fenólicos (ABTS y ferrocianuro de potasio) típicos de lacasas fungales, mostrando mayor eficiencia catalítica para los fenólicos (siringaldazina, seguida de catecol y 2,6-DMP); a diferencia de la lacasa fungal la cual oxidó con mayor eficiencia catalítica un sustrato no fenólico (ABTS) seguido de los fenólicos (2,6-DMP, siringaldazina, guayacol y catecol). Interesantemente, no todos los sustratos fenólicos típicos de lacasas fungales fueron oxidados por la enzima, tal es el caso del guayacol. Otro resultado interesante fue que esta enzima oxidó L-dopa, que es un sustrato típico de tirosinasa, con mayor eficiencia catalítica que otros sustratos como ABTS, a diferencia de la lacasa fungal, la cual no fue capaz de oxidarlo. También la tirosina, que es sustrato típico de las tirosinasas fue oxidado por la MmPPO1 pero solo en presencia de L-Dopa, por lo que sus constantes cinéticas no fueron determinadas. En función de este análisis comparativo llegamos a las siguientes conclusiones, primero que aunque la MmPPO1 oxidó sustratos típicos de lacasas fungales, presentando preferencia por sustratos que no son típicos de lacasas de hongo, tal es el caso de la L-dopa; en segunda instancia que las eficiencias catalíticas de la MmPPO1 para sustratos como ABTS y 2,6-DMP que son sustratos usados con elevadas eficiencias catalíticas por lacasas fungales, fueron muy bajas a comparación de las mostradas por la lacasa fungal; y finalmente que la MmPPO1 oxidó un mayor número de sustratos que no son comunes a las lacasas fungales (L-dopa y ferrocianuro de potasio).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 11. Constantes cinéticas para la polifenoloxidasas de *M. mediterranea* y la lacasa de *Coriolus hirsutus* [105].

Sustrato	Polifenoloxidasas <i>M. mediterranea</i>			Lacasa <i>Coriolus hirsutus</i>		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m
Siringaldazina	1.57	19.14	12.19	142.7	107	0.75
Catecol	99.5	50.28	0.505	39.9	7.49	0.19
2,6-DMP	173.2	28.8	0.166	53	126	2.38
L-Dopa	208	20.73	0.099	ND	-	-
Ferrocianuro de potasio	1936	161.34	0.0833	ND	-	-
ABTS	4837	28.74	0.0059	56.7	260	4.59
Guaiacol	-	-	-	10.9	2.24	0.21
Tirosina	-	-	-	-	-	-

7.2.4 Potencial redox

Al realizar el análisis de secuencia primaria de MmPPO1 y compararlo con las secuencias de la ascorbato oxidasa y otras lacasas fungales, encontramos que la enzima presentaba como ligando axial, que coordina una de las histidinas del sitio T1, una metionina, al igual que la ascorbato oxidasa, en lugar de tener una fenilalanina o leucina como ocurre en el resto de las lacasas fungales con elevado potencial redox, lo cual aunado al hecho de que esta enzima presenta además un grupo de histidinas adicional ausente en otras lacasas, era indicativo de que la geometría de coordinación a histidinas en el sitio T1 sería distinta a la de las otras lacasas.

Además del análisis de secuencia, la evidencia bioquímica obtenida hasta el momento nos llevo a preguntarnos cuál sería el potencial redox de la MmPPO. Para efectuar su determinación se utilizó un electrodo de platino midiendo a una velocidad de 500 mV/min, usando como estandar una solución de KNO_3 0.1 M (1 ml) y $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1 ml). El valor de potencial redox para la polifenoloxidasas de *M. mediterranea* fue de 0.9 V, el cual fue elevado, ya que los valores de potencial reportados para las lacasas fungales están dentro del rango que va de 0.4 a 0.8 V (Tabla 12) [120].

El potencial redox elevado, de cierta manera había sido inferido con base a la evidencia bioquímica encontrada y al hecho de que la MmPPO1 tiene un grupo de histidinas adicional ausente en las demás lacasas, no obstante el hecho de que la enzima presentara una metionina coordinando

una de las histidinas del sitio T1, nos hace pensar que si bien en las lacasas fungales tiene gran influencia sobre el potencial redox, en este caso no podemos explicarlo en función de la secuencia primaria. No obstante, es importante dejar claro que la MmPPO1 tiene un potencial redox más elevado que el resto de las lacasas fungales hasta ahora reportadas.

Tabla 12. Potencial redox de diferentes enzimas dependientes de cobre [120].

Enzima	Potencial redox E° (V)	Alineamiento de secuencia de dos ligandos del sitio T1
Ascorbato oxidasa de Zucchini	0.34	⁵⁰⁶ H C H I E P H L H M G M ⁵¹⁷
<i>Myceliophthora thermophila</i>	0.47	⁵⁰² H C H I A W H V S G G L ⁵¹³
<i>Scytalidium thermophilum</i>	0.51	⁵⁰⁶ H C H I A W H V S G G L ⁵¹⁷
<i>Rhizoctonia solani</i> (4)	0.71	⁴⁵⁹ H C H I D W H L E A G L ⁴⁷⁰
<i>Trametes villosa</i>	0.78	⁴⁵² H C H I D F H L E A G F ⁴⁶³
<i>Trametes versicolor</i>	0.79	⁴⁵¹ H C H I D F H L E A G F ⁴⁶²
<i>Coriolus hirsutus</i>	-	⁴⁷¹ H C H I D F H L E G G F ⁴⁸²
PPO1 <i>Marinomonas mediterranea</i>	0.9	⁶⁴⁷ H C H I L D H E D Q G M ⁶⁵⁸

7.2.5 Ensayos de inhibición

Con el conocimiento de que algunos inhibidores de enzimas dependientes de cobre inhiben la actividad de lacasa, probamos su efecto sobre la MmPPO1. Los inhibidores utilizados fueron azida de sodio, cianuro de potasio, EDTA, L-cisteína y SDS. Los ensayos de inhibición se efectuaron incubando la enzima con diferentes concentraciones de inhibidor (0.1-200 mM) durante 10 minutos y después se determinó la actividad residual espectrofotométricamente utilizando como sustrato 2,6-DMP. En la tabla 13 se presentan los resultados de este experimento, donde es importante destacar que todos los inhibidores tuvieron un efecto en la disminución de la actividad enzimática, siendo la azida de sodio, L-cisteína y cianuro de potasio los que inhibieron totalmente a concentraciones de 0.1, 1 y 5 mM respectivamente; mientras que el SDS a la concentración de 5 mM inhibió en menor grado (56%). De todos los inhibidores, el EDTA fue el único que mostró tener un efecto diferente sobre la actividad de esta enzima, ya que mientras que para otras lacasas fungales, la actividad fué inhibida en un 100% a una concentración de 0.1 mM, para esta enzima se requirieron concentraciones de 20 mM para inhibir solo el 68% de la actividad (dato no mostrado).

El hecho de que inhibidores como EDTA, que quelan cobre, inhibieran a MmPPO1 a concentraciones más altas que las de lacasas fungales sugiere que la unión del cobre en la PPO1 de *M. mediterranea* es mucho más fuerte que en otras lacasas. En general, MmPPO1 fue inhibida por inhibidores típicos de enzimas oxidasas dependientes de cobre.

Tabla 13. Inhibición de la MmPPO1 comparada con una lacasa fungal (*C. hirsutus*) [105].

Inhibidor	<i>Marinomonas mediterranea</i>		<i>Coriolus hirsutus</i>	
	Inhibición (%)	Concentración (mM)	Inhibición (%)	Concentración (mM)
Azida de sodio	100	0.1	100	0.1
Cianuro de potasio	100	5	97	5
EDTA	0	0.1	100	0.1
L-cisteína	85	0.1	100	0.1
SDS	56	5	41	5

7.2.5 Ensayos de termoestabilidad

Durante los experimentos que efectuamos para corroborar si la proteína era un multímero encontramos que la enzima, aún después de ser incubada a 85°C con SDS y mercaptoetanol, seguía siendo activa, lo cual sugirió la posibilidad de que se tratara de una proteína termoestable, por lo que se determinó el perfil de temperatura y se realizaron ensayos de termoestabilidad con la enzima.

Para determinar el perfil de temperatura de la enzima, se midió espectrofotométricamente la actividad enzimática en un rango de temperaturas de 25 a 85 °C, utilizando como sustrato 2,6-DMP, tal como se indica en la metodología. El resultado de estos experimentos se muestra en la figura 20, en la cual puede verse primero, que la temperatura óptima para la enzima fue de 75 °C y en segundo lugar, que a 85 °C la enzima conservó el 68% de actividad. Existen algunos reportes de lacasas bacterianas [74] y fungales [63] que tienen temperaturas óptimas por encima de 60 °C, las cuales son la excepción a la regla ya que en general, las lacasas tienen temperaturas óptimas entre de 30 y 60 °C y por encima de 70 °C hay una pérdida total de la actividad [63].

En general, se ha reportado que las lacasas siguen un perfil de temperatura muy peculiar, ya que a medida que aumenta la temperatura también la actividad enzimática se incrementa hasta llegar al valor de temperatura al cual se pierde el plegamiento y como consecuencia la actividad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

disminuye rápidamente. La pérdida abrupta de actividad generalmente ocurre a temperaturas de alrededor de 55°C y es debida a un efecto de termoinactivación. Se piensa que la rápida pérdida de actividad que ocurre a temperaturas que van de 55 a 65°C puede deberse a la liberación del cobre tipo 2, el cual está completamente ausente a 70°C [63]. En cuanto a los sitios T1 y T3, ha sido comprobado que son completamente desintegrados a temperaturas mayores de 70°C, pero que estos permanecen íntegros a temperaturas entre 60 y 70°C, condiciones bajo las que también la estructura proteica es mantenida [63].

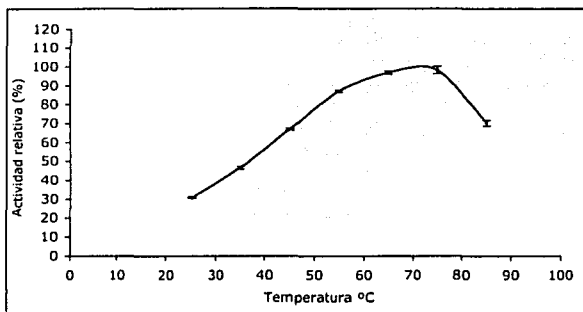


Figura 20. Perfil de temperatura para la lacasa de *M. mediterranea*.

Dado que esta enzima mostró un perfil de temperatura interesante, decidimos verificar su termoestabilidad, para lo cual fue incubada a 40, 50, 60, 70 y 80°C durante una hora, y cada diez minutos se determinó espectrofotométricamente la actividad enzimática, usando como sustrato 2,6-DMP. El resultado de estos ensayos se muestra en la figura 21, en la cual es importante observar que los tiempos de vida media estimados para la enzima fueron los siguientes: 60.9 min, 50°C; 43.4 min, 60°C; 27.5 min, 70°C; y 3.8 min, 80°C. Con estos resultados concluimos que la enzima mostró una termoestabilidad importante a 70 °C, mientras que la mayoría de las lacasas fungales ya no son activas a esta temperatura [63].

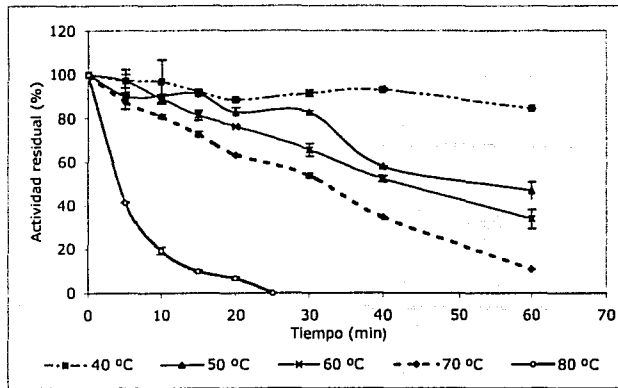


Figura 21. Termoestabilidad de la polifenoloxidas a diferentes temperaturas. El valor en cada curva corresponde al tiempo de vida medio estimado para cada temperatura.

8. CONCLUSIONES

El estudio de las lacasas bacterianas es reciente, y por esta razón se desconocen muchas de sus características bioquímicas y relaciones filogenéticas. Como ya se mencionó, se han reportado pocas especies de bacterias que presentan actividad de lacasa: *Marinomonas mediterranea* [100], *Azospirillum lipoferum* [40], *Bacillus sphaericus* [17], *Phormidium valderianum* [104], *Bacillus subtilis* [53] y *Streptomyces griseus* [28].

En este trabajo reportamos los resultados de la purificación y caracterización bioquímica de la lacasa de *M. mediterranea* (MmPPO1), la cual es capaz de oxidar sustratos típicos de lacasa y tirosinasa [100]. La evidencia bioquímica nos permitió compararla con otras lacasas bacterianas y fúngicas, encontrando algunas similitudes así como diferencias significativas.

En cuanto a los perfiles de pH para los sustratos ensayados con la polifenoloxidasas bacteriana, mencionamos con anterioridad que en el caso de sustratos fenólicos obtuvimos curvas bimodales típicas de lacasas fúngicas pero con características únicas, ya que el pH óptimo de la MmPPO1 para todos los sustratos se desfasó hacia valores más básicos, conservando su actividad a pH neutro, valor al cual las lacasas fúngicas ya no son activas. Para los sustratos no fenólicos ensayados, las curvas de pH fueron bimodales, a diferencia de las fúngicas, cuyo perfil típico corresponde solo a la segunda parte de la curva, ya que se trata de sustratos que no se ionizan. Este comportamiento pensamos que se debe a características estructurales únicas de la enzima. Adicionalmente, el pH óptimo de la MmPPO1 para estos sustratos se desfasó hacia valores básicos, tal como ocurrió con los sustratos fenólicos. Respecto a las lacasas bacterianas, se ha reportado que la lacasa de *Streptomyces griseus* sigue un perfil de pH bimodal típico de lacasa fúngica para el sustrato dimetoxifenol, mostrando las mismas peculiaridades que la MmPPO1 en los siguientes aspectos: primero, su pH óptimo fue 6; y el segundo es que conservó el 40% de su actividad a pH 8 mostrando un desfase hacia valores de pH básicos [28]. En cuanto a los sustratos no fenólicos, no existen reportes de perfiles de pH con lacasas bacterianas.

Referente a los experimentos de tolerancia a sal, también mostramos que la MmPPO1 presentó actividad a concentraciones de haluros mayores a 100 mM, a las cuales las lacasas fúngicas ya no muestran actividad o tienen un decremento importante de la misma ocasionado por la inhibición por haluros. Al comparar los valores de I_{50} de varias lacasas fúngicas para diferentes halogenuros con los de la MmPPO1, encontramos que estos son mayores para la polifenoloxidasas,

lo cual significa que se necesita mayor concentración de sal para inhibir la actividad de la MmPPO1 a diferencia de las lacasas fungales, por lo que su tolerancia a sal es más elevada. Lo anterior refleja que hay diferencias estructurales en el sitio activo de la MmPPO1 a comparación de las lacasas fungales, que probablemente estén relacionadas con la existencia de ciertos aminoácidos en el sitio T1 que impiden el acceso de iones muy electronegativos al sitio T2/T3, mismos que están ausentes en el resto de las lacasas fungales. Por otra parte, para otras lacasas bacterianas no existen reportes de tolerancia a sal.

Las diferencias entre la MmPPO y las lacasas fungales se reflejaron también en las constantes cinéticas, pues esta enzima mostró una baja eficiencia catalítica para la mayoría de los sustratos que son fácilmente oxidados por lacasas fungales. En contraste, fue capaz de oxidar L-dopa, que no es oxidada por ninguna lacasa fungal, con una eficiencia catalítica mayor que para otros sustratos fenólicos típicos de lacasas de hongos como ABTS. Otra diferencia importante es que la eficiencia catalítica de la MmPPO1 está determinada por la afinidad de la enzima por sus sustratos (K_m), lo cual significa que los sustratos que son oxidados con mayor eficiencia catalítica son aquellos que presentan valores de K_m menores; mientras que para la lacasa fungal de *Coriolus hirsutus*, la eficiencia catalítica está dominada por la k_{cat} , ya que los sustratos oxidados con eficiencias catalíticas mayores son los que presentan valores de k_{cat} más elevadas. En el caso de la MmPPO1, la dependencia de la eficiencia catalítica por la K_m , así como la afinidad que presenta para sustratos típicos de otras polifenoloxidasas, reflejan claramente que la catálisis y por lo tanto el mecanismo catalítico de la MmPPO1 es diferente al de las lacasas fungales.

Por otro lado, para las lacasas bacterianas hay poca información referente al rango de sustratos que utilizan y a sus constantes cinéticas. Se ha reportado que los valores de K_m para la lacasa de *Bacillus subtilis* con los sustratos siringaldazina y ABTS son 26 μM y 106 μM respectivamente, los cuales al ser comparados con los de la MmPPO1 indican que la lacasa de *B. subtilis* es 45 veces más afin a ABTS, mientras que MmPPO1 es 16 veces más afin a siringaldazina [74]. También se sabe que la lacasa de *Azospirillum lipoferum* es capaz de oxidar siringaldazina, ABTS y p-fenilendiamina, aunque solo se reportó el valor de K_m para siringaldazina, el cual es 34.65 μM , que está en el mismo orden de magnitud que el de *B. subtilis* [22]. En otro trabajo, se demostró que la lacasa de *S. griseus* es capaz de oxidar L-dopa, sin embargo no oxidó sustratos como guaiacol, siringaldazina o compuestos p-difenólicos [28], y aunque esta enzima mostró perfiles de pH y temperatura interesantes, el hecho de que no oxide compuestos comunes al resto de las lacasas, nos hace dudar seriamente de su identidad como lacasa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al analizar el perfil de temperatura para la MmPPO1, encontramos que su temperatura óptima de 75°C, mientras que las temperaturas óptimas para las lacasas fungales van de 30 a 60°C máximo. Este valor coincide con la temperatura óptima reportada para la lacasa de la bacteria *B. subtilis* la cual es también de 75°C [53]. Además, la MmPPO1 resultó ser termoestable, ya que a 70°C su tiempo de vida media estimado fue de 27.5 minutos. Con base en los ensayos efectuados con SDS, pensamos que la termoestabilidad de la MmPPO1 podría explicarse en función de que la proteína es un multímero que aunque es lábil a la acción del SDS, confiere propiedades de termoestabilidad que las lacasas fungales no muestran. Sin embargo, con estos experimentos no pudimos concluir que la MmPPO1 es un multímero. En cuanto a las lacasas bacterianas, ha sido reportado que la de *A. lipoferum* también es termoestable, ya que su tiempo de vida media estimado a 70°C es de 43 minutos, y que esta termoestabilidad es atribuida a su naturaleza multimérica, pues la enzima está formada por una cadena catalítica y dos cadenas estructurales [40].

Como mencionamos en la sección de resultados respecto a los inhibidores que fueron ensayados para la MmPPO1, encontramos que el efecto inhibitorio fue similar al reportado para otras lacasas fungales, a excepción del EDTA, el cual inhibió la actividad de esta enzima pero solo a concentraciones muy elevadas, lo cual nos llevó a pensar que debido a que se trata de un compuesto que quela cobre, la unión del metal en esta enzima es mucho más fuerte a la observada en otras lacasas. Para las lacasas bacterianas no hay reportados datos de inhibición.

En relación a la secuencia primaria de la MmPPO1, también presentó ciertas diferencias al compararla con otras lacasas fungales y bacterianas. En primer lugar, al efectuar los alineamientos de la MmPPO1 encontramos que la enzima guardaba mayor similitud con otras enzimas multicobre que con lacasas bacterianas o fungales, mostrando valores de identidad bajos, que van del 13 al 26%. En general, las regiones de secuencia que alinean con otras lacasas corresponden a los grupos de histidinas que coordinan la unión a cobre y a otros aminoácidos cercanos, firmas que están conservadas en todas las enzimas multicobre. Al alinear la secuencia de MmPPO1 con las dos secuencias de lacasas bacterianas reportadas hasta el momento, encontramos que mostró una identidad del 22% para la lacasa de *B. subtilis* y del 23% para *S. griseus*, guardando similitud únicamente con las regiones conservadas en todas las enzimas multicobre. Respecto a las diferencias significativas encontradas a nivel de secuencia, es importante mencionar que aunado a que esta enzima presenta un cluster de histidinas adicional, como fue reportado por Sánchez-Amat, también presenta una metionina que pudiera funcionar como quinto ligando del Cu T1 que está

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presente en otras enzimas multicobre pero no en el resto de las lacasas. La importancia de esta metionina y del grupo de histidinas adicional nos hace suponer que ésta enzima presenta una geometría del sitio catalítico diferente a la reportada hasta el momento, lo cual sustenta el comportamiento bioquímico tan particular y único de esta enzima.

Así pues, la versatilidad de la enzima para oxidar sustratos típicos de otras polifenoloxidasas, su tolerancia a elevadas concentraciones de sal, su termotolerancia, su actividad a pH neutro y su elevado potencial redox, aunados a los motivos de secuencia que solo están presentes en esta enzima, nos han llevado a plantear la posibilidad de que la PPOI de *M. mediterranea* sea una polifenoloxidasa y no una lacasa bacteriana como ha sido reportado en trabajos anteriores. Al respecto, pensamos que es importante realizar un análisis filogenético de las lacasas bacterianas reportadas hasta el momento, el cual permitiría ubicar a la MmPPOI ya sea como una lacasa verdadera o como una polifenoloxidasa. No obstante resulta complicado efectuar un estudio de esta naturaleza dado que a la fecha solo se han reportado tres secuencias de lacasas bacterianas, que incluyen la de *M. mediterranea*, *B. subtilis* y *S. griseus*, por lo que una solución al problema sería comparar las secuencias de las lacasas bacterianas con otras polifenoloxidasas o enzimas multicobre para establecer su filogenia como integrantes de un nuevo grupo de polifenoloxidasas.

Por último, dado que la MmPPOI presenta una gran versatilidad para oxidar sustratos típicos de otras polifenoloxidasas, es tolerante a elevadas concentraciones de haluros, es activa a pH básico, es termotolerante y tiene un elevado potencial redox, podemos concluir que la enzima presenta propiedades potencialmente aplicables en diversas áreas biotecnológicas.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Aikazian, V., Markosian, K., and Nalbandian, R. 1974. Purification and some properties of 2 copper-containing proteins from the cucumber, *Cucumis sativus*. **Biokhimiia**. 39(6): p. 1184-90.
2. Alexandre, G. and Zhulin, I.B. 2000. Laccases are widespread in bacteria. **Trends Biotechnol.** 18(2): p. 41-2.
3. Aramayo, R. and Timberlake, W. 1993. The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. **EMBO J.** 12: p. 2039-2048.
4. Bar-Nun, N., et al. 1988. Repression of laccase formation in *Botrytis cinerea* and its possible relation to phytopathogenicity. **Phytochemistry**. 27: p. 2505-2509.
5. Berka, R.M., et al. 1997. Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. **Appl Environ Microbiol.** 63(8): p. 3151-3157.
6. Berka, R.M., Xu, F., and Thompson, S.A. 1995. International patent application PCT/US95/06816.
7. Bertrand, G. 1985. Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase. **CR Acad. Sci. (Paris)**. 120: p. 266-269.
8. Bier, F.F., et al. 1996. An enzymatic amplification cycle for high sensitive immunoassay. **Analyt Chim Acta.** 328: p. 27-32.
9. Binz, T. and Canevascini, G. 1996. Differential production of extracellular laccase in the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. **Mycol Res.** 100: p. 1060-1064.
10. Bligny, R. and Douce, R. 1983. Excretion of laccase by cycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells. Purification and properties of the enzyme. **Biochemical Journal.** 209: p. 489-496.
11. Bollag, J.-M. and Leonowicz, A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Appl Environ Microbiol.** 48: p. 849-854.
12. Bonnen, A., Anton, L., and Orth, A. 1994. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Appl Environ Microbiol.** 60: p. 960-965.
13. Broxholme, S., Read, N., and Bond, D. 1991. Developmental regulation of proteins during fruit-body morphogenesis in *Sordaria brevicollis*. **Mycol Res.** 95: p. 958-969.
14. Call, H. and Mücke, I. 1997. History, overview and application of mediated ligninolytic systems, especially laccase-mediator systems. **J Biotechnol.** 53: p. 163-202.
15. Cantarelli, C., et al. 1989. Beverage stabilization through enzymatic removal of phenolics. **Food Biotechnol.** 3: p. 203-214.
16. Christoph, E., Bemt, K., and Sacchetti, J. 1999. Catechol oxidase-structure and activity. **Current Opinion in Structural Biology.** 9: p. 677-683.
17. Claus, H. and Filip, Z. 1997. The evidence of laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. **Microbiology Research.** 152: p. 209-216.
18. Clutterbuck, A. 1972. Absence of laccase form yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. **J Gen Microbiol.** 10(3): p. 423-435.
19. Das, N., Sengupta, S., and Mukherjee, M. 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. **Appl Environ Microbiol.** 63: p. 4120-4122.
20. De Vries, O.M.H., Kooistra, W.H.C.F., and Wessels, G.H. 1986. Formation of an extracellular laccase by *Schizophyllum commune* dikaryon. **J Gen Microbiol.** 132: p. 2817-2826.
21. Decker, H., Dillinger, R., and Tuczec. 2000. How does tyrosinase work? Recent insights from model chemistry and structural biology. **Angew Chem Intern Ed.** 39: p. 1591-1595.
22. Diamantidis, G., et al. 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. **Soil Biol. & Biochem.** 32: p. 919-927.

23. Doering, T., et al. 1999. Melanin as a potential cryptococcal defense against microbicidal proteins. **Med Mycol.** 37: p. 157-181.
24. Durán, N., et al. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme Microb. Technol.** 31: p. 907-931.
25. Durrens, P. 1981. The phenol oxidases of the ascomycete *Podospora anserina*: the three forms of the major laccase activity. **Arch Microbiol.** 130: p. 421-424.
26. Edens, W., et al. 1999. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. **Appl Environ Microbiol.** 65: p. 3071-3074.
27. Eggert, C., et al. 1996. A fungal metabolite mediates oxidation of non-phenolic lignin model compounds and synthetic lignin by laccase. **FEBS Lett.** 391: p. 144-148.
28. Endo, K., et al. 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. **J Biochem.** 133: p. 671-677.
29. Fakoussa, R.M. and Frost, P.J. 1999. In vivo decolorization of coal-derived humic acids by laccase-excreting fungus *Trametes versicolor*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 52: p. 60-65.
30. Faure, D., Bouillant, M., and Bally, R. 1994. Isolation of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* laccases. **Appl Environ Microbiol.** 60: p. 3413-3415.
31. Fenoll, L.G., et al. 2001. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones. **Biochim Biophys Acta.** 1548(1): p. 1-22.
32. Fenoll, L.G., et al. 2000. Oxidation by mushroom tyrosinase of monophenols generating slightly unstable o-quinones. **Eur J Biochem.** 267(19): p. 5865-78.
33. Fenoll, L.G., et al. 2000. Action mechanism of tyrosinase on meta- and para-hydroxylated monophenols. **Biol Chem.** 381(4): p. 313-20.
34. Froehner, S. and Eriksson, K.-E.L. 1974. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. **J Bacteriol.** 120: p. 458-465.
35. García, H. and Vázquez, R. 1998. Cuantificación de proteínas: una revisión. **Biotecnología.** 3: p. 77-88.
36. Gardiol, A.E., et al. 1996. Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper containing oxidase. **Enzyme Microb. Technol.** 18: p. 347-352.
37. Garzillo, A., et al. 2001. Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. **J Prot Chem.** 20(3): p. 2001.
38. Ghindilis, A.L., et al. 1992. A new approach to the construction of potentiometric immunosensors. **Biosens. Bioelectr.** 7: p. 301-304.
39. Gianfreda, L., Xu, F., and Bollag, J.-M. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal.** 3(1): p. 1-25.
40. Givaudan, A., et al. 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. **FEMS Microbiol Lett.** 108: p. 205-210.
41. Gregory, R. and Bendall, D. 1996. The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis* L.). **Biochem J.** 102: p. 569-581.
42. Griffith, G., Rayner, A., and Wildman, H. 1994. Interspecific interactions and mycelial morphogenesis of *Hypholoma fasciculare* (Agaricaceae). **Nova Hedwigia.** 59: p. 47-75.
43. Gukasyan, G. 2002. Study of the kinetics of oxidation of monophenols by tyrosinase. The effect of reducers. **Biochemistry (Mosc).** 67(2): p. 277-280.
44. Guo, J., et al. 1991. Purification and properties of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*. **Appl Biochem Biotechnol.** 31(2): p. 135-143.
45. Haars, A., Chet, I., and Huttermann, A. 1981. Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. **Eur J For Pathol.** 11(67-76).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

46. Haars, A. and Hüttermann, A. 1983. Laccase induction in the white-rot fungus *Heterobasidium annosum* (Fr.) Bref (*Fomes annosus* Fr. Cooke) Arch Micobiol. Arch Microbiol. 134: p. 1309-1313.
47. Hasset, R., Yuan, D., and Kosman, D. 1998. Spectral and kinetic properties of the Fet3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*, a multinuclear copper ferroxidase enzyme. J Biol Chem. 273(36): p. 23274-23282.
48. Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiol Lett. 13: p. 125-135.
49. Hellman, N. and Gitlin, J. 2002. Ceruloplasmin metabolism and function. Annu Rev Nutr. 22: p. 439-58.
50. Hermann, T., Kurtz, M., and Champe, S. 1983. Laccase located in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. J Bacteriol. 154: p. 955-964.
51. Hirose, J., et al. 1994. Characterization of ascorbate oxidase from *Acremonium sp.* HI-25. J Biochem. 115(5): p. 811-3.
52. Huang, K., et al. 1996. Purification and characterization of sulochrin oxidase from *Penicillium frequentans*. Biol Pharm Bull. 19(1): p. 42-46.
53. Hullo, M.F., et al. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. J Bacteriol. 183(18): p. 5426-30.
54. Huttermann, A., Mai, C., and Kharazipour, A. 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. App Microbio Biotechnol. 55: p. 387-394.
55. Iakovlev, A. and Stenlid, J. 2000. Spatiotemporal patterns of laccase activity in interacting mycelia of wood-decaying basidiomycete fungi. Microb Ecol. 39: p. 236-245.
56. Jiménez-Cervantes, C., et al. 1995. Effect of detergents and endogenous lipids on the activity and properties of tyrosinase and its related proteins. Biochem Biophys Acta. 1243(3): p. 421-430.
57. Johannes, C. and Majcherczyk, A. 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. J Biotechnol. 78(2): p. 193-9.
58. Johannes, C. and Majcherczyk, A. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. Appl Environ Microbiol. 66(2): p. 524-8.
59. Karam, J. 1997. Potential applications of enzymes in waste treatment. J. Chem Tech Biotechnol. 69: p. 141-153.
60. Karlsson, B.G., et al. 1989. Expression of the blue copper protein azurin from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 246(1-2): p. 211-7.
61. Kersten, P., et al. 1990. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. Biochem J. 268: p. 475-480.
62. Kofujita, H., et al. 1991. Purification and characterization of laccase from *Lentinus edodes*. Mokuzaï Gakkaishi. 37: p. 562-569.
63. Koroleva, O.V., et al. 2001. Temperature-induced changes in copper centers and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus*. Biochim Biophys Acta. 1547(2): p. 397-407.
64. Koudelka, G. and Ettinger, J. 1988. Fluoride effects on the activity of *Rhus* laccase and the catalytic mechanism under steady-state conditions. The Journal of Biological Chemistry. 263(8): p. 3698-3705.
65. Kurtz, M. and Champe, S. 1982. Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans*. J Bacteriol. 151: p. 1338-1345.
66. Larsson, S., Cassland, P., and Jonsson, L.J. 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. Appl Environ Microbiol. 67(3): p. 1163-70.

67. Leontievsky, A.A., et al. 2000. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. **Biodegradation**. 11: p. 331-340.
68. Leontievsky, A.A., et al. 1997. Blue and yellow laccases of lignolytic fungi. **FEMS Microbiol Lett.** 156: p. 9-14.
69. Liu, L., Tewari, R., and Williamson, P.R. 1999. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. **Infect Immun.** 67: p. 6034-6039.
70. Mai, C., et al. 2000. Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds. **Appl Microbiol Biotechnol.** 54(4): p. 510-4.
71. Mano, N., Mao, F., and Heller, A. 2002. A miniature biofuel cell operating in a physiological buffer. **J. Am. Chem. Soc.** 124: p. 12962-12963.
72. Marcubernet, M., Ribereaugayon, P., and Prevot, M. 1975. Properties of the laccase of *Botrytis cinerea*. **C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.** 280(10): p. 1313-1316.
73. Marchesini, A. and Kroneck, P. 1979. Ascorbate oxidase from *Cucurbita pepo medullosa*. New method of purification and reinvestigation of properties. **Eur J Biochem.** 101(1): p. 65-76.
74. Martins, L.O., et al. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. **J Biol Chem.** 277(21): p. 18849-59.
75. Mayer, A.M. and Staples, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry.** 60(6): p. 551-65.
76. Mcguirl, M.A. and Dooley, D.M. 1999. Copper-containing oxidases. **Curr Opin Chem Biol.** 3(2): p. 138-44.
77. Messerschmidt, A. and Huber, R. 1990. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. **Eur J Biochem.** 187(2): p. 341-52.
78. Min, K.-L., et al. 2001. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Arch Biochem Biophys.** 392(2): p. 279-286.
79. Molitoris, H.P. and Reinhammar, B. 1975. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. XI. The state of copper of laccases I, II and III. **Biochim Biophys Acta.** 386(2): p. 493-502.
80. Mosbach, R. 1963. Purification and some properties of laccase from *Polyporus versicolor*. **Biochim Biophys Acta.** 73: p. 204-212.
81. Mougin, C., et al. 2000. Cleavage of the diketonitrile derivative of the herbicide isoxaflutole by extracellular fungal oxidases. **J Agric Food Chem.** 48(10): p. 4529-34.
82. Niku, P.M.L., et al. 1988. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. **Biochem J.** 254(3): p. 877-884.
83. Niku, P.M.L. and Viikari, L. 2000. Enzymatic oxidation of alkenes. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic.** 10: p. 435-444.
84. Nordlov, H. and Gatenbeck, S. 1982. Enzymatic synthesis of (+)- and (-)-bisdechlorogedin with sulochrin oxidase from *Penicillium frequentans* and *Oospora sulphurea-ochracea*. **Arch Microbiol.** 131(3): p. 208-211.
85. Odda, Y., et al. 1991. Purification and properties of laccase excreted by *Pycnoporus coccineus*. **Agric Biol Chem.** 55: p. 1393-1395.
86. Perry, C., et al. 1993. Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. **J Gen Microbiol.** 139: p. 1209-1218.
87. Pointek, K., Antorinis, M., and Choinowski, T. 2002. Cristal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **The Journal of Biological Chemistry.** 277(40): p. 37663-37669.
88. Pointing, S.B. and Vrijmoed, L.L.P. 2000. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 16: p. 317-318.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

89. Prillinger, H. and Molitoris, H.P. 1979. Genetic analysis in wood-decaying fungi I. Genetic variation and evidence for allopatric separation in *Pleurotus ostreatus* using phenoloxidase zymograms and morphological criteria. **Physiol Plant**, 46: p. 265-277.
90. Ranocha, P., et al. 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases -a divergent gene family- in poplar. **Eur J Biochem**. 259: p. 485-495.
91. Reinhammar, B. 1970. Purification and properties of laccase and stellacyanin from *Rhus vernicifera*. **Biochim Biophys Acta**. 205(1): p. 35-47.
92. Reinhammar, B., et al. 1980. A new copper(II) electron paramagnetic resonance signal in two laccases and in cytochrome c oxidase. **J Biol Chem**. 255(11): p. 5000-3.
93. Reinhammar, B. and Malmstrom, B.G., *Metal ions in biology: copper proteins*, ed. T.G. Spiro, ed. Vol. 3. 1981, New, York, NY. 109-149.
94. Rheman, A. and Thurston, C.F. 1992. Purification of laccase I from *Armillaria mellea*. **J Gen Microbiol**. 138: p. 1251-1257.
95. Rigling, D. and Van Alfen, N. 1993. Extra- and intracellular laccases of the chesnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. **Appl Environ Microbiol**. 59: p. 3634-3639.
96. Roy-Arcand, L. and Archibald, F. 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccase from *Trametes (Coriolus) versicolor*. **Enzyme Microb. Technol**. 13: p. 194-203.
97. Rughukumar, C. and Rivonkar, G. 2001. Decolorization of molasses spent wash by the white-rot fungus *Flavodon flavus*, isolated from a marine habitat. **Appl Microbiol Biotechnol**. 55(4): p. 510-4.
98. Ryden, L. and Bjork, I. 1976. Reinvestigation of some physicochemical and chemical properties of human ceruloplasmin (ferroxidase). **Biochemistry**. 15(16): p. 3411-3417.
99. Sanchez-Amat, A., et al. 2001. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. **Biochim Biophys Acta**. 1547(1): p. 104-16.
100. Sanchez-Amat, A. and Solano, F. 1997. A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas sp* shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. **Biochem Biophys Res Commun**. 240(3): p. 787-92.
101. Sato, Y., et al. 2001. Molecular cloning and expression of eight cDNAs in lobolly pine (*Pinus taeda*). **J. Plant Research**. 114: p. 147-155.
102. Scherer, M. and Fischer, R. 1998. Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. **Arch Microbiol**. 170: p. 78-84.
103. Schlosser, D., Grey, R., and Fritsche, W. 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose wheat straw and beech wood. **App Microbio Biotechnol**. 47: p. 412-418.
104. Shashirekha, S. 1997. Phenol degradation by marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501. **J Ind Microbiol & Biotechnol**. 19: p. 130-133.
105. Shin, K.S. and Lee, Y.J. 2000. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. **Arch Biochem Biophys**. 384(1): p. 109-15.
106. Smirnov, S.A., et al. 2001. Laccases from Basidiomycetes: physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. **Biochemistry (Mosc)**. 66(7): p. 774-9.
107. Solano, F., et al. 1997. Isolation and characterization of strain MMB-1 (CECT 4803), a novel melanogenic marine bacterium. **Applied Environmental Microbiology**. 63(9): p. 3499-3506.
108. Solano, F. and Sánchez-Amat, A. 1999. Studies on the phylogenetic relationships of melanogenic marine bacteria. Proposal of *Marinomonas mediterranea* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol**. 49: p. 1241-1246.