



Universidad de Alcalá

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA LACASA DE *Streptomyces cyaneus*
CECT 3335 Y APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DE SU POTENCIAL
OXIDATIVO Y FUNCIÓN BIOLÓGICA

TESIS DOCTORAL

Raquel Moya Lobo

2011

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN
(Art. 11° del R.D. 56/2005)**

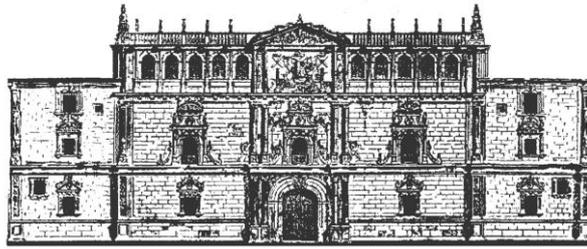
Los Doctores, D^a. M^a Enriqueta Arias Fernández y D. Manuel Hernández Cutuli, como Directores de la Tesis Doctoral titulada: “**CARACTERIZACIÓN DE LA LACASA DE *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 Y APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DE SU POTENCIAL OXIDATIVO Y FUNCIÓN BIOLÓGICA**”, realizada por D^a Raquel Moya Lobo en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá, **autorizan su presentación a trámite**, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente autorización en Alcalá de Henares a 6 de julio de 2011.

Fdo.: Dra. M^a Enriqueta Arias Fernández

Fdo.: Dr. Manuel Hernández Cutuli

Universidad de Alcalá



Departamento de Microbiología y Parasitología

D. Juan Soliveri de Carranza, Profesor Titular de Microbiología y Director del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que **D^a. Raquel Moya Lobo**, Licenciada en Biología por la Universidad de Alcalá, ha realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá, bajo la dirección de los Doctores **D^a. M^a Enriqueta Arias Fernández** y **D. Manuel Hernández Cutuli**, el trabajo de investigación titulado: “**CARACTERIZACIÓN DE LA LACASA DE *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 Y APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DE SU POTENCIAL OXIDATIVO Y FUNCIÓN BIOLÓGICA**”, que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Alcalá de Henares a 6 de julio de 2011.

Fdo.: Juan Soliveri de Carranza

“...no tenía miedo a las dificultades: lo que la asustaba era la obligación de tener que escoger un camino. Escoger un camino significaba abandonar otros.”

Paulo Coelho, “Brida”

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de un Contrato de Personal Investigador de Apoyo por la Comunidad de Madrid y de dos Ayudas de Movilidad por la Universidad de Alcalá. Asimismo, el trabajo de investigación ha sido financiado por los proyectos CICYT CTQ2004-03441-PPQ y CTQ2009-10447/PPQ.

AGRADECIMIENTOS

Lo cierto es que no guardo un recuerdo preciso del momento en que decidí llevar a cabo esta aventura, supongo que fue una mezcla de ideas, motivaciones y circunstancias lo que me impulsó a ello, lo que sí tengo claro es que durante todo este tiempo han sido muchas personas las que me han ayudado en el camino, y a las que me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. M^a Enriqueta Arias Fernández, directora de esta Tesis, por su apoyo incondicional y la confianza que ha depositado en mí desde que entré a formar parte de su grupo de investigación. Desde el primer momento en que me entusiasmó con su saber comunicar siendo yo aún una alumna, han sido muchas las cosas que ha sabido transmitirme, no sólo en el ámbito de la ciencia, en el que tanto me ha ayudado para dar forma y solidez a este trabajo, sino también en el personal.

Al Dr. Manuel Hernández Cutuli, codirector de esta Tesis, quisiera agradecerle su disposición para ofrecerme su tiempo y ayuda, que tantas veces he necesitado. Quiero darle las gracias también por su colaboración en el diseño y realización de muchos experimentos, en los que tantas veces ha tenido que solventar los problemas de “fontanería”, porque su entusiasmo a la hora de discutir los resultados me ha ayudado a desarrollar un espíritu crítico, o simplemente, por hacer de una tediosa y larga tarde de correcciones frente al ordenador un buen momento para recordar.

Al Dr. Francisco Guillén Carretero, por haberme permitido acercarme al “maravilloso mundo de los radicales hidroxilo”, lo que me supuso no sólo la posibilidad de realizar un trabajo muy interesante sino también un reto al que enfrentarme. También debo agradecerle la ayuda y opinión prestada cuando la he necesitado y el haberme transmitido la importancia del trabajo bien hecho.

A la Dra. María Isabel Pérez Leblic, porque con su alegría, su sentido del humor y su disposición nos hace a todos más llevadero el día a día. A la Dra. Juana Rodríguez Bullido, por su ayuda e interés desde mis inicios como becaria de colaboración. Al profesor Francisco Javier Mérida, porque siempre es un lujo tener cerca a una persona como él, de la que tanto se puede aprender.

A los Dres. Juan Soliveri de Carranza y José Luis Copa Patiño, por su cordialidad y por prestarme su ayuda cuando la he necesitado.

Al Dr. José Manuel Molina Guijarro, he de agradecerle todo el tiempo que dedicó a enseñarme sus conocimientos en biología molecular, gracias a los cuales pude realizar muchos de los experimentos presentados en este trabajo. Gracias por tu paciencia y por haber sido una guía para mí.

A la Dra. María Arenas Carús, quiero agradecerle la cesión de parte de la secuencia del gen de la lacasa de *S. cyaneus*.

A mis compañeras de laboratorio Lyli, Adri y Ana, porque poder trabajar con ellas no sólo ha hecho mucho más llevadera esta Tesis, sino porque en ellas he encontrado una gran amistad. A la ya Dra. Aura Lyli Orozco, por sus horas de “plática” tan reconfortantes y los buenos momentos compartidos, espero que como buena viajera que soy la próxima vez que nos veamos sea en Nicaragua. A Adri, porque aunque al principio fuéramos casi desconocidas la una para la otra, no tardamos en darnos cuenta que en realidad éramos tal para cual, me alegro mucho de haberte conocido y espero seguir disfrutando de tu amistad por muchísimo tiempo. A Ana, la verdad es que son muchas cosas las que tengo que agradecerle a nivel de trabajo, pues hemos pasado muchas horas juntas en el laboratorio, con sus respectivos altibajos en los que hemos sido y somos un apoyo la una para la otra; pero sobre todo, quiero darte las gracias por los buenos momentos que hemos vivido fuera del trabajo, que espero sigan siendo muchos. También quiero agradecer de manera especial a

Alba, la última en incorporarse a este grupo. Gracias por haberme ayudado tanto con los experimentos de la recta final, porque nadie mejor que tú ha conocido mi angustia porque las cosas no salieran bien cuando más falta hacía, y por hacer el trabajo desde el cariño, como si fuera tuyo.

Por último agradecer al resto de mis compañeros y demás estudiantes con los que me he cruzado a lo largo de estos años, que han ayudado a hacer más llevadera la rutina y han aportado con su ayuda un granito de arena a este trabajo.

Parte de este trabajo no hubiera sido posible sin la realización de una estancia en el Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo. A los Dres. José Antonio Salas y Carmen Méndez, quiero agradecerles por acogerme en su grupo brindándome la oportunidad de haber adquirido una formación sólida y tremendamente útil en biología molecular, gracias a la cual pude llevar a cabo una parte del trabajo presentado en esta Tesis. También quiero agradecer a los que fueron allí mis compañeros: Leire, Marina, Belén, Miriam, Dani, Carlos... que me enseñaron todo lo necesario en el laboratorio respondiendo tan amablemente a cada una de mis dudas, y con los que además pude disfrutar de muy buenos momentos tanto dentro del laboratorio como fuera de él.

Al Dr. Francisco Javier González-Vila, del Departamento de Geoecología, Biogeoquímica y Microbiología Ambiental (IRNAS-CSIC) de Sevilla, por la realización de los análisis de las muestras de álcali-lignina mediante Pirólisis/Cromatografía de gases-Espectrometría de masas. También quisiera agradecer a la Dra. Oliva Polvillo Polo, por la ayuda prestada en la interpretación de los resultados obtenidos en este estudio.

A la Dra. Maija-Liisa Mattinen, del “Technical Research Centre of Finland” (VTI), por permitirme la realización de una provechosa estancia en su grupo de investigación. Aunque el trabajo que realicé allí no forme parte de esta Tesis, quisiera agradecerle la posibilidad de haber vivido una gran experiencia así como su apoyo y ayuda para seguir formándome como científica.

No me gustaría terminar este capítulo, sin agradecer a las personas que aún sin saberlo estaban ayudando tanto a que este trabajo haya llegado a su fin:

A mi amiga Carol, por ser para mí el mejor ejemplo de lo que es la amistad. Por haber estado a mi lado todos estos años, por conocerme y comprenderme tan bien. A mis amigas de la carrera y de la infancia, Ana, Aida, Eva y Esther, porque aunque nuestros caminos se vayan separando, no perdamos la oportunidad de recordar los buenos momentos. A mis amigos de Torrejón, demasiados para nombraros a todos, por haber sido un bálsamo para los peores momentos gracias a fines de semana tan llenos de actividad y buena sintonía...

A Carlos, por su ayuda en la parte artística del trabajo, quitándome un quebradero de cabeza en la recta final. Pero mucho más importante que todo eso, gracias por haber sabido animarme cuando tanto lo he necesitado, por enseñarme a ver el lado fácil de la vida, por apoyarme sin reservas, y en definitiva, por hacer que el despertar de un nuevo día tenga mucho más sentido para mí.

A mi familia en general, por apoyarme, por interesarse siempre por mis andanzas, y por darme algo que no siempre se encuentra, una familia tan unida. Y a mis padres en especial, por ser un ejemplo para mí y porque si he llegado hasta aquí, ha sido gracias a vosotros.

A mis padres

A Carlos

RESUMEN

Las lacasas son metaloproteínas con actividad fenoloxidasas que se incluyen en el grupo de las oxidasas multicobre. Catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos aromáticos en un proceso acoplado a la reducción del oxígeno molecular a agua. Son enzimas conocidas y estudiadas desde finales del siglo XIX, cuando se describieron por primera vez en el árbol de la laca japonés. Más tarde se descubrió su presencia en hongos, insectos y bacterias y actualmente se sabe de su existencia en arqueas. Las lacasas han sido implicadas en multitud de procesos biológicos diferentes y en el caso de las bacterianas, donde su función biológica no está aún muy definida, se han relacionado con procesos de morfogénesis y esporulación, pigmentación de esporas y resistencia al cobre, entre otros. El hecho de que estas enzimas posean una gran versatilidad catalítica, potenciada por la participación de compuestos mediadores de oxidación, ha suscitado entre los investigadores un gran interés debido a su potencial aplicación en industrias tecnológicas como es la industria papelera, textil y alimentaria, así como en otros procesos de interés medioambiental, como es la degradación de xenobióticos, en síntesis química o en el desarrollo de biosensores.

En este trabajo se ha abordado el estudio del potencial oxidativo de la cepa *Streptomyces cyanus* CECT 3335, productor de una lacasa denominada SclA, tanto a través de la puesta a punto de sistemas lacasa-mediador, como mediante la inducción de radicales hidroxilo a través de un ciclo redox de quinonas, considerado este último como un proceso microbiano de oxidación avanzada. Asimismo, se ha tratado de elucidar la función biológica desempeñada por la lacasa SclA, caracterizada en este trabajo, en el microorganismo productor.

En primer lugar, se trató de evaluar la capacidad oxidativa de la lacasa de *S. cyanus* en la degradación de xenobióticos, para lo cual se eligieron como compuestos modelo colorantes textiles de tipo azo. Las dos estrategias oxidativas diseñadas, demostraron ser altamente eficaces en la degradación de los colorantes textiles. Sin embargo, en lo que se refiere a la destoxificación de los colorantes tras el proceso degradativo, cabe señalar, que mientras que el sistema lacasa-acetosiringona produjo un incremento de la toxicidad de los compuestos obtenidos tras el tratamiento enzimático, el proceso microbiano de oxidación avanzada permitió la completa destoxificación de los colorantes seleccionados. En este sentido, cabe destacar que en este trabajo de investigación se ha demostrado por primera vez la implicación de una lacasa bacteriana en la generación de especies reducidas del oxígeno.

El interés biotecnológico y medioambiental suscitado por la lacasa SclA, nos condujo a su posterior caracterización molecular y sobreexpresión heteróloga en *Escherichia coli*. Una vez obtenida la secuencia del gen codificante para esta enzima, se realizó un análisis comparativo con otras lacasas mediante el empleo de diversas herramientas informáticas, lo que reveló la presencia de motivos característicos de las oxidasas multicobre, es decir, las cuatro regiones de unión al cobre y tres dominios de tipo cupredoxina. Estas características coinciden con las descritas para la mayoría de las lacasas bacterianas. Además, la ausencia de un péptido señal en la secuencia, confirmó el carácter intracelular de esta enzima.

A continuación, el gen *scLA* se sobreexpresó de forma heteróloga en *Escherichia coli* utilizando un sistema de tipo pET. De esta forma se pudo disponer de una pequeña cantidad de la enzima recombinante en forma soluble (la mayor parte se acumuló en cuerpos de inclusión), lo que permitió su posterior purificación y caracterización físico-química y cinética. Esta caracterización puso de manifiesto la estabilidad de la enzima en un amplio rango de pH y temperatura, destacando asimismo el incremento de afinidad por el sustrato ABTS respecto a la enzima nativa. Por otro lado, la enzima recombinante mostró capacidad oxidativa frente a compuestos de tipo no fenólico, a través de un mediador como la acetosiringona.

Por último, la obtención de un mutante no productor de lacasa (SclA⁻) mediante la técnica de interrupción génica, permitió abordar el estudio de la posible implicación de la lacasa en procesos de morfogénesis, en la pigmentación de esporas, en procesos de resistencia al cobre y en la degradación de la lignina. Los resultados obtenidos en este estudio, no revelaron diferencias significativas entre la cepa silvestre y mutante en ninguno de los ensayos realizados con este fin, lo que impidió atribuir de manera concluyente una función biológica a esta enzima en ninguno de los procesos estudiados.

Como conclusión al estudio realizado, se puede confirmar el gran interés biotecnológico de la cepa *S. cyanus*, que ha demostrado su potencial oxidativo para degradar compuestos xenobióticos, tanto a través del sistema lacasa-acetosiringona establecido en este trabajo, como mediante la inducción de radicales ·OH a través del ciclo redox de quinonas.

SUMMARY

Laccases are metalloproteins with phenoloxidase activity included into the multicopper oxidases group. These enzymes catalyze the monoelectronic oxidation of a wide range of phenolic compounds with the concomitant reduction of O₂ to H₂O. Laccases have been studied since the end of the 19th century, when they were discovered in the Japanese lacquer tree. Later, they were described in other plants, fungi, insects, bacteria, and recently, in archaea. Laccases have been involved in many biological processes. Bacterial laccases have been related to morphogenesis and sporulation processes, spores pigmentation and copper resistance, among others. However, their biological role in actinobacteria has not been fully clarified yet. The catalytic versatility of laccases, enhanced by the concurrence of redox mediators, has driven researchers to consider these enzymes for their potential application in the pulp and paper, textile and food industries. In addition, their application in biotechnological processes such as xenobiotics degradation, chemical synthesis or development of biosensors, is being explored.

This work deals on the study of the oxidative potential of the strain *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, either setting up laccase-mediator systems or through the induction of hydroxyl radicals via quinone redox cycling, which can be considered as a microbial advanced oxidation process. In addition, the biological function of the SclA laccase in the producer microorganism was analyzed.

First, the oxidative potential of the laccase on the degradation of xenobiotics was evaluated using azo textile dyes as model compounds. Both oxidative approaches assayed were very effective in the degradation of the textile dyes. However, some differences were found concerning to the detoxification of the dyes. Thus, when the laccase-acetosyringone system was used, an increase in the toxicity of the compounds was observed. In contrast, the application of the microbial advanced oxidation process produced a total detoxification of the selected dyes. It is important to remark that this is the first work in which the involvement of a bacterial laccase in the generation of reduced oxygen species has been described.

The biotechnological and environmental interest presented by the SclA laccase, drove us to its molecular characterization and heterologous overexpression in *Escherichia coli*. The gene sequence was analyzed through several informatics tools and revealed the presence of characteristic motives of the multicopper oxidases being remarkable the four copper-binding regions and three cupredoxine-type domains. These characteristics are similar to those described for the most of bacterial laccases. In addition, the lack of a signal peptide in the sequence confirmed the intracellular nature of this enzyme.

Then, the *scLA* gene was overexpressed in the heterologous host *E. coli* using a pET-type system, obtaining a small amount of soluble recombinant enzyme (most of it was accumulated in inclusion bodies) which allowed its purification and physico-chemical and kinetic characterization. The recombinant enzyme was stable in a wide range of pH and temperature being remarkable the increase in the affinity for the ABTS substrate, compared to the native enzyme. Moreover, the enzyme was also able to oxidize a non-phenolic compound through the action of acetosyringone as mediator.

Finally, through the obtention of a non-laccase producer mutant (SclA⁻) by gene disruption, the involvement of the laccase in morphogenesis processes, spores pigmentation, copper resistance and lignin degradation, was explored. Results arising from the assays carried out did not reveal any significant differences in the behaviour of the wild-type and mutant strains. For this reason, we could not attribute conclusively a biological function for this enzyme in any of the studied processes.

In summary, this study confirms the biotechnological interest of the *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 strain based on its oxidative potential to degrade xenobiotics, either through the established laccase-acetosyringone system or through the induction of hydroxyl radicals via quinone redox cycling.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A: adenina
ABTS: 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AO: ascorbato oxidasa
BQ: benzoquinona
BQH₂: benzohidroquinona
BTEX: benceno, etilbenceno, xileno.
C: citosina
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
CIAP: enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera
DBQ: 2,6-dimetoxibenzoquinona
DBQH₂: 2,6-dimetoxibenzohidroquinona
DIG-11-dUTP: desoxiuridina trifosfato unida a digoxigenina
DTE: ditioeritritol
DMSO: dimetilsulfóxido
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato
DO: densidad óptica
*E*⁰: potencial de reducción
ECF: libre de cloro elemental
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
EPR: *electron paramagnetic resonance* (resonancia paramagnética electrónica)
ermE*p: promotor de eritromicina
FPLC: *fast protein liquid chromatography*
G: guanina
GAE: glucosa-asparagina-extracto de levadura
GC-MS: cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas
HBT: 1-hidroxibenzotriazol
HO₂·: radical hidroperoxilo
HPLC: *high performance liquid chromatography*
HRP: peroxidasa de rábano
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
LB: caldo de lisogénesis
LccED: *Laccase Engineering Database*
LMS: sistema lacasa-mediador
MA: medio A
Mb: megabase
MBQ: metoxibenzoquinona
MBQH₂: metoxibenzohidroquinona
MBS: medio basal salino
MCO: oxidasa multicobre
MCS: sitio de clonación múltiple
MOPS: *4-morpholinepropanesulfonic acid*
MS: soja-manitol
NHE: electrodo normal de hidrógeno
O₂·-: radical superóxido
·OH: radical hidroxilo
p/v: peso/volumen
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PAHs: hidrocarburos policíclicos aromáticos
PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride*
POA: procesos de oxidación avanzada
PMOA: proceso microbiano de oxidación avanzada
psig: *pounds per square inch gauge* (libras determinadas por pulgada cuadrada)
Py-GC-MS: pirólisis analítica asociada a cromatografía de gases y espectrometría de masas
Q: quinona
QH₂: hidroquinona
QR: quinona reductasa
RLO: radicales libres de oxígeno
RO·: radical alcoxilo
RO₂·: radical peroxilo
rpm: revoluciones por minuto
SDS: dodecil sulfato sódico
SOC: caldo súper óptimo con represión catabólica
SSF: fermentación en estado sólido
T: timina
TAT: *twin arginine translocation*
TBARS: sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico
TCF: totalmente libre de cloro
TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TEMPO: 2,2',6,6'-tetrametil-piperidina-N-oxil
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
U: unidades de actividad enzimática
ufc: unidades formadoras de colonias
UV/Vis: ultravioleta/visible
v/v: volumen/volumen
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolin-β-D-galactósido
YEME: *yeast extract-malt extract* (extracto de levadura-extracto de malta)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El género <i>Streptomyces</i>: genética, ciclo de vida e importancia biotecnológica	3
1.2. Lacasas	5
1.2.1. Estructura y mecanismo catalítico de las lacasas	6
1.2.1.1. El sitio T1	8
1.2.1.2. El sitio T2/T3	9
1.2.2. Especificidad de sustrato	10
1.2.3. Biología molecular de las lacasas	11
1.2.4. Distribución y función de las lacasas	12
1.2.4.1. Eucariotas	12
1.2.4.2. Procariotas	14
1.3. Mecanismos de oxidación indirectos de las lacasas: sistemas lacasa-mediador y producción de especies reducidas de oxígeno	15
1.3.1. El sistema lacasa-mediador	18
1.3.2. Producción de especies reducidas del oxígeno por las lacasas	19
1.3.2.1. Ciclo redox de quinonas	20
1.4. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas	22
1.4.1. Industria textil	22
1.4.1.1. Colorantes de tipo azo	23
1.4.2. Industria papelera	25
1.4.3. Industria alimentaria	26
1.4.4. Biorremediación	27
1.4.5. Nanobiotecnología	28
1.4.6. Síntesis química	28
1.4.7. Sector farmacéutico	28
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Materiales y métodos generales	37
3.1.1. Microorganismos utilizados	37
3.1.1.1. <i>Streptomyces</i>	37
3.1.1.2. <i>Escherichia coli</i>	37
3.1.2. Mantenimiento y conservación de los microorganismos	37
3.1.3. Medios de cultivo	37
3.1.3.1. Medios de cultivo para <i>Streptomyces</i>	37
3.1.3.2. Medios de cultivo para <i>E.coli</i>	38
3.1.3.3. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> y <i>S. cyaneus</i>	38
3.1.3.4. Componentes específicos de los medios de cultivo	38
3.1.4. Tampones y soluciones	39
3.1.4.1. Tampones generales	39
3.1.4.2. Tampones y soluciones utilizados en la electroforesis de proteínas	39

3.1.4.3. Tampones y soluciones utilizados en la electroforesis de ADN	40
3.1.4.4. Tampones y soluciones utilizados en la preparación de células competentes	40
3.1.4.5. Tampones y soluciones utilizados en la extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	40
3.1.4.6. Tampones y soluciones utilizados en la hibridación de ácidos nucleicos	40
3.1.4.7. Tampones y soluciones utilizados en la solubilización de cuerpos de inclusión	41
3.1.5. Determinaciones analíticas	41
3.1.5.1. pH	41
3.1.5.2. Valoración de proteínas	41
3.1.5.3. Valoración de la actividad lacasa	41
3.1.5.3.1. En medio sólido	41
3.1.5.3.2. En medio líquido	41
3.1.5.3.3. Asociada a micelio	41
3.1.5.4. Valoración de la actividad quinona reductasa asociada a micelio	41
3.1.5.5. Producción de H ₂ O ₂	42
3.1.5.6. Reducción de Fe ³⁺ a Fe ²⁺	42
3.1.5.7. Radical hidroxilo	42
3.2. Producción y purificación de la lacasa nativa de <i>Streptomyces cyaneus</i> CECT 3335	42
3.2.1. Producción de la enzima	42
3.2.2. Proceso de purificación de la lacasa	42
3.2.2.1. Precipitación con sulfato amónico	42
3.2.2.2. Cromatografía líquida de alta eficacia para proteínas (FPLC)	43
3.3. Técnicas electroforéticas aplicadas a las proteínas	43
3.3.1. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	43
3.3.2. Revelado de los geles de poliacrilamida	44
3.3.2.1. Tinción de proteínas	44
3.3.2.2. Ensayo de actividad lacasa en los geles (zimograma)	44
3.3.3. Isoelectroenfoque	44
3.4. Estudio del potencial oxidativo de la cepa <i>Streptomyces cyaneus</i> CECT 3335, utilizando como modelo colorantes textiles de tipo azo	44
3.4.1. Caracterización espectrofotométrica de los colorantes	44
3.4.1.1. Espectros de absorción UV/Vis	45
3.4.1.2. Cálculo de los coeficientes de extinción molar	45
3.4.2. Decoloración de los colorantes textiles por la lacasa purificada de <i>Streptomyces cyaneus</i> y por distintos sistemas lacasa-mediador	45
3.4.2.1. Ensayos de decoloración con la lacasa de <i>S. cyaneus</i>	45
3.4.2.2. Ensayos de decoloración con la lacasa de <i>S. cyaneus</i> en presencia de distintos mediadores	45
3.4.3. Demostración del ciclo redox de quinonas en <i>Streptomyces cyaneus</i> y su aplicación a la degradación de colorantes textiles	46
3.4.3.1. Producción de radical hidroxilo por la lacasa nativa purificada de <i>S. cyaneus</i>	46
3.4.3.2. Producción de radical hidroxilo mediante el ciclo redox de quinonas por <i>S. cyaneus</i>	46
3.4.3.2.1. Determinación de las actividades quinona reductasa y lacasa asociadas al micelio de <i>S. cyaneus</i> y producción de radical hidroxilo	46
3.4.3.2.2. Optimización de la producción de radical hidroxilo mediante el ciclo redox de quinonas	46

3.4.3.3. Ensayos de degradación de los colorantes textiles de tipo azo mediante ciclo redox de quinonas	47
3.4.4. Técnicas analíticas para el estudio de la degradación de los colorantes textiles	47
3.4.4.1. Análisis de toxicidad de los colorantes antes y después del proceso de decoloración	47
3.4.4.2. Cromatografía líquida de alta eficacia asociada a detector de diodos (HPLC-PDA) de los colorantes control y tratados	48
3.5. Caracterización molecular de la lacasa de <i>S. cyaneus</i>	48
3.5.1. Plásmidos y oligonucleótidos	48
3.5.2. Preparación de células competentes y electrocompetentes de <i>E. coli</i>	48
3.5.2.1. Preparación de células competentes	48
3.5.2.2. Preparación de células electrocompetentes	49
3.5.3. Manipulación de las muestras de ADN	49
3.5.3.1. Extracción de ADN	49
3.5.3.1.1. ADN cromosómico de <i>Streptomyces</i>	49
3.5.3.1.2. ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	50
3.5.3.2. Amplificaciones de ADN mediante PCR	50
3.5.3.3. Electroforesis de fragmentos de ADN	51
3.5.3.4. Digestión enzimática de muestras de ADN	51
3.5.3.5. Ligación de fragmentos de ADN	51
3.5.3.6. Desfosforilación de extremos 5' de ADN	51
3.5.4. Hibridación de ácidos nucleicos	52
3.5.4.1. Marcaje de sondas de ADN con DIG dUTP	52
3.5.4.2. Detección de ADN con sondas marcadas	52
3.5.4.2.1. Transferencia de ADN a membranas de nylon	52
3.5.4.2.2. Prehibridación de la membrana	53
3.5.4.2.3. Hibridación de la membrana con la sonda marcada	53
3.5.4.2.4. Detección con fosfatasa alcalina	53
3.5.5. Transformación de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico	54
3.5.5.1. Transformación por choque térmico	54
3.5.5.2. Transformación por electroporación	54
3.5.6. Conjugación	54
3.5.7. Clonación del gen <i>scfA</i>	55
3.5.8. Tratamiento informático de las secuencias	56
3.5.9. Expresión heteróloga de la proteína SclA	56
3.5.9.1. Análisis de la expresión	57
3.5.10. Recuperación de la enzima a partir de los cuerpos de inclusión	58
3.6. Producción y purificación de la enzima recombinante	58
3.6.1. Producción de la enzima recombinante	58
3.6.1.1. Obtención de la forma activa de la enzima recombinante	59
3.6.2. Purificación de la enzima recombinante	59
3.6.2.1. Electroelución	59
3.7. Caracterización de la lacasa recombinante purificada	60
3.7.1. pH óptimo de reacción	60
3.7.2. Estabilidad al pH	60
3.7.3. Temperatura óptima de reacción	60
3.7.4. Estabilidad a la temperatura	60

3.7.5. Determinación de la masa molecular	60
3.7.6. Determinación del punto isoelectrico	60
3.7.7. Constantes cinéticas	60
3.7.8. Oxidación de un compuesto no fenólico en presencia de un mediador redox	60
3.8. Estrategias para el estudio de la función desempeñada por la lacasa de <i>S. cyaneus</i>	61
3.8.1. Obtención de un mutante no productor de lacasa de <i>S. cyaneus</i> (<i>S. cyaneus</i> SclA ⁻)	61
3.8.1.1. Comprobación del mutante <i>S. cyaneus</i> SclA ⁻	61
3.8.1.1.1. Nivel molecular	61
3.8.1.1.2. Nivel bioquímico	61
3.8.2. Implicación en procesos de morfogénesis y esporulación	61
3.8.2.1. Microscopía óptica	61
3.8.2.2. Microscopía electrónica de barrido	62
3.8.3. Implicación en procesos de pigmentación	62
3.8.4. Implicación en procesos de resistencia al cobre	62
3.8.4.1. Cultivos no inducidos	62
3.8.4.2. Cultivos inducidos	63
3.8.5. Implicación en la degradación del polímero de lignina	63
3.8.5.1. Sustrato y condiciones de fermentación en estado sólido	63
3.8.5.2. Obtención de lignina mediante extracción alcalina de la paja de trigo	63
3.8.5.3. Análisis de la álcali-lignina mediante pirólisis asociada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (Py-GC-MS)	63
4. RESULTADOS	65
4.1. Estudio del potencial oxidativo de la cepa <i>Streptomyces cyaneus</i> CECT 3335, utilizando como modelo colorantes textiles	67
4.1.1. Evaluación de la capacidad degradativa de la lacasa nativa producida por <i>S. cyaneus</i>	67
4.1.1.1. Producción y purificación de la lacasa	67
4.1.1.2. Degradación enzimática de colorantes textiles tipo azo	67
4.1.1.2.1. Caracterización espectrofotométrica de los colorantes	67
4.1.1.2.2. Decoloración de los colorantes textiles por la lacasa purificada de <i>S. cyaneus</i> y por distintos sistemas lacasa-mediador	68
4.1.1.2.3. Análisis de la toxicidad de los colorantes antes y después del proceso de decoloración	69
4.1.1.2.4. Análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de los colorantes y de los productos de decoloración	70
4.1.2. Ciclo redox de quinonas en <i>S. cyaneus</i> y capacidad degradativa de los radicales hidroxilo producidos	70
4.1.2.1. Producción de radical hidroxilo por la lacasa purificada	70
4.1.2.2. Producción de radical hidroxilo mediante el ciclo redox de quinonas utilizando micelio de <i>S. cyaneus</i>	72
4.1.2.3. Decoloración de colorantes textiles mediante radicales hidroxilo	73
4.1.2.4. Análisis de la toxicidad de los colorantes antes y después del proceso de decoloración	73
4.1.2.5. Análisis mediante HPLC de los colorantes y de los productos de decoloración	74
4.2. Caracterización molecular y fisico-química de la lacasa de <i>S. cyaneus</i>	76
4.2.1. Clonación del gen de la lacasa	76
4.2.1.1. Secuenciación y análisis de la secuencia	78

4.2.2. Expresión heteróloga de la lacasa	79
4.2.2.1. Recuperación de la proteína a partir de los cuerpos de inclusión	84
4.2.3. Producción y purificación de la lacasa recombinante	85
4.2.4. Caracterización físico-química y cinética de la enzima recombinante	85
4.2.4.1. Características físico-químicas	85
4.2.4.1.1. pH óptimo de reacción y estabilidad al pH	85
4.2.4.1.2. Temperatura óptima de reacción y estabilidad a la temperatura	86
4.2.4.1.3. Masa molecular	86
4.2.4.1.4. Punto isoelectrónico	86
4.2.4.2. Características cinéticas	87
4.2.4.3. Oxidación de un compuesto no fenólico en presencia de un mediador redox	87
4.3. Abordaje del estudio de la función de la lacasa en la cepa productora <i>S. cyaneus</i>	87
4.3.1. Obtención de un mutante no productor de lacasa de <i>S. cyaneus</i> (<i>S. cyaneus</i> SclA ⁻)	87
4.3.1.1. Comprobación de la obtención del mutante <i>S. cyaneus</i> SclA ⁻	89
4.3.1.1.1. Nivel molecular	89
4.3.1.1.2. Nivel bioquímico	89
4.3.2. Estudio de la implicación de la lacasa en procesos de morfogénesis y esporulación	90
4.3.2.1. Observaciones al microscopio óptico	90
4.3.2.2. Observaciones al microscopio electrónico de barrido	90
4.3.3. Estudio de la implicación de la lacasa en procesos de pigmentación	91
4.3.4. Estudio de la implicación de la lacasa en procesos de resistencia al cobre	91
4.3.4.1. Cultivos no inducidos	92
4.3.4.2. Cultivos inducidos	92
4.3.5. Estudio de la implicación de la lacasa en la degradación de lignina	92
4.3.5.1. Estimación gravimétrica de la álcali-lignina	92
4.3.4.2. Análisis de la álcali-lignina mediante Py-GC-MS	92
5. DISCUSIÓN	95
5.1. Estudio del potencial oxidativo de la cepa <i>Streptomyces cyaneus</i> CECT 3335, utilizando como modelo colorantes textiles	97
5.1.1. Purificación de la lacasa de <i>Streptomyces cyaneus</i>	97
5.1.2. Decoloración de los colorantes textiles por la lacasa purificada de <i>Streptomyces cyaneus</i> y por distintos sistemas lacasa-mediador	97
5.1.3. Oxidación avanzada de colorantes textiles por <i>Streptomyces cyaneus</i>	101
5.2. Caracterización molecular y físico-química de la lacasa de <i>S. cyaneus</i>	105
5.3. Abordaje del estudio de la función de la lacasa en la cepa productora <i>S. cyaneus</i>	110
6. CONCLUSIONES	115
7. BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXO I	147
ANEXO II	151

1. Introducción

1.1. El género *Streptomyces*: genética, ciclo de vida e importancia biotecnológica.

El género *Streptomyces*, del que se conocen más de 500 especies, pertenece a la familia *Streptomycetaceae*, clase *Actinobacteria*. Está constituido por bacterias grampositivas filamentosas, aerobias estrictas y que se desarrollan con un crecimiento ramificado dando lugar a un entramado de hifas denominado micelio (Goodfellow y Williams, 1983).

Los estreptomicetos se encuentran fundamentalmente en el suelo, donde gracias a la producción de un compuesto sesquiterpenoide denominado geosmina causan el característico olor a tierra húmeda (Gerber y Lechevalier, 1965). Son capaces de crecer sobre sustratos relativamente secos (McCarthy y Williams, 1992) y se desarrollan más favorablemente en suelos alcalinos o neutros. En cuanto a su exigencia nutricional, pueden utilizar una amplia variedad de compuestos como fuente de carbono, tales como, azúcares, alcoholes, aminoácidos, ácidos orgánicos y algunos compuestos aromáticos. Además, la mayoría producen enzimas extracelulares que les permiten utilizar otros sustratos más complejos como el almidón y la celulosa, o hidrocarburos, lignina, taninos e incluso caucho (Madigan *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista genético, *Streptomyces* se caracteriza por un elevado contenido en G+C en su ADN, entre un 61 y 80 % (Wright y Bibb, 1992), lo que implica que la utilización de codones esté muy sesgada y los codones que poseen G o C en la tercera posición sean los más frecuentes (Bibb *et al.*, 1984). El cromosoma de las especies estudiadas de *Streptomyces* es lineal y tiene un tamaño aproximado de 8 Mb (Kieser *et al.*, 1992). Su replicación tiene lugar de manera bidireccional a partir del *oriC* y finaliza con ayuda de proteínas terminales que se unen a los extremos 5' del cromosoma (Lin *et al.*, 1993). Durante los últimos años se han secuenciado por completo los genomas de algunos estreptomicetos. El primero de ellos fue *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002), microorganismo objeto de numerosos estudios encaminados a su caracterización genómica. En el año 2003 se completó la secuencia del genoma de

S. avermitilis (Ikeda *et al.*, 2003), microorganismo productor de agentes antiparasitarios llamados avermectinas, en 2004 la de *S. peucedinus* (Parajuli *et al.*, 2004), en 2007 la de *S. scabies* por el Instituto Sanger, en 2008 la de *S. griseus* IFO 13350 (Ohnishi *et al.*, 2008), y el último en incorporarse a este grupo ha sido el productor de la milbemicina *S. bingchenggensis* (Wang *et al.*, 2010). Cuando se comparan los genomas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis* podemos encontrar una región interna altamente conservada y en la que los genes esenciales implicados en división celular, replicación del ADN, transcripción, traducción y biosíntesis de aminoácidos, se encuentran en un orden y dirección similar en ambas especies (Ikeda *et al.*, 2003). Por el contrario, los loci que codifican para funciones no esenciales (metabolismo secundario, degradación de nutrientes extracelulares, etc.) se encuentran en los brazos del cromosoma. Esta región central altamente conservada, de aproximadamente 6,5 Mb, presenta similitudes estructurales con otros cromosomas circulares de bacterias, lo que revelaría un posible ancestro común con las bacterias de cromosomas circulares. Por otro lado, el hecho de que la duplicación de genes ocurra preferentemente en las regiones subteloméricas, donde se encuentran los genes relacionados con el metabolismo secundario, permitiendo así la emergencia de nuevos genes, sería una característica única en las bacterias de cromosomas lineales (Ikeda *et al.*, 2003).

El cromosoma de *Streptomyces* es altamente inestable, pues más del 0,1 % de las esporas germinantes puede sufrir amplificaciones o deleciones de hasta 2 Mb sin que la viabilidad del microorganismo se vea afectada. Este hecho sumado a la existencia de otros tipos de reorganizaciones genéticas, como son la duplicación de genes o la redundancia genética, favorecen la rápida evolución de los genes implicados en el metabolismo secundario.

Por último, cabe destacar la presencia en *Streptomyces* de elementos extracromosomales como son los plásmidos circulares (Kieser *et al.*, 2000), lineales (Kinashi *et al.*, 1987) o los fagos con ADN de doble cadena, como es el fago Φ C31 (Kieser *et al.*, 2000).

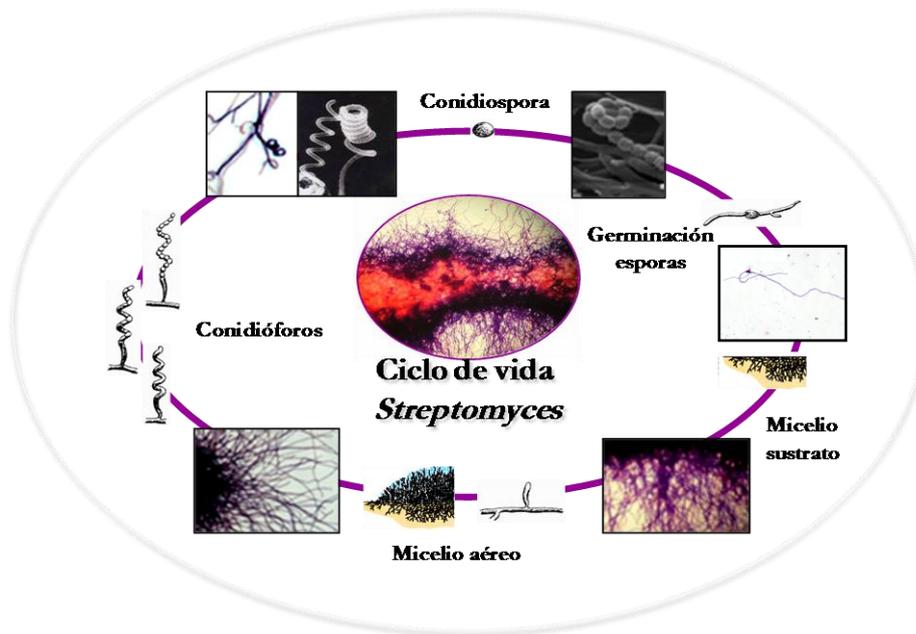


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Streptomyces*, donde se muestran las distintas etapas de diferenciación celular del microorganismo.

El ciclo de vida de *Streptomyces* se caracteriza por un complejo proceso de diferenciación morfológica y fisiológica. La diferenciación morfológica de estos microorganismos (Figura 1.1) comienza con la germinación de las esporas cuando las condiciones ambientales son favorables, dando lugar a tubos germinativos que se ramifican hasta constituir una red de hifas multigenómicas que se adhieren fuertemente al sustrato y constituyen lo que se denomina micelio sustrato (Champness, 2000). Coincidiendo en el tiempo con la desaparición de los nutrientes del medio y la aparición de componentes de reserva (lípidos, polifosfatos, etc.) y metabolitos secundarios, una cascada de genes activa la conversión del micelio sustrato hacia un crecimiento reproductivo denominado micelio aéreo, que se alza en el aire facilitando la dispersión de los microorganismos. Según estudios realizados, para que las hifas aéreas puedan alzarse en el aire con una dirección adecuada, precisan de una presión osmótica en el interior de las células que podría ser generada gracias a la solubilización de macromoléculas como el glucógeno (Chater, 1993).

El micelio aéreo se desarrolla a expensas de la degradación de los componentes del micelio sustrato (Chater, 2000) y sus hifas, altamente hidrofóbicas, se alargan y sufren un proceso de curvatura, de forma espiral en muchas especies, y el filamento se tabica de manera múltiple. Cada uno de los compartimentos monogenómicos formados dará lugar a las esporas, también llamadas conidiosporas. Recientemente, han sido descubiertas una serie de proteínas surfactantes, denominadas “chaplins” (Talbot, 2003), que se encuentran en la superficie de las hifas emergentes facilitando la rotura de la tensión superficial existente entre la colonia y el aire, y que junto a otras proteínas serían indispensables para la formación de estructuras aéreas en las actinobacterias (Figura 1.2).

Las esporas, capaces de iniciar un nuevo ciclo biológico, contienen componentes de reserva, poseen una gruesa pared que en la mayoría de las especies está pigmentada, y presentan proyecciones u ornamentos característicos de cada especie (Champness, 2000).

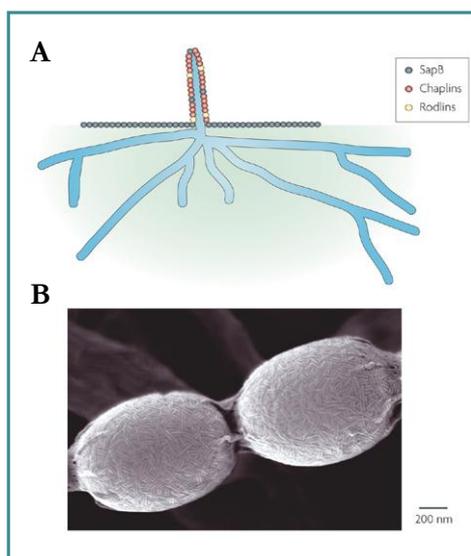


Figura 1.2. A) Disposición de las proteínas surfactantes “sapB”, “chaplins” y “rodlins” en torno a las hifas del micelio aéreo. B) Fotografía de alta resolución de esporas de *S. coelicolor* donde se observan los filamentos formados por las proteínas tipo “chaplín” (Tomado de Flårdh y Buttner, 2009).

El complejo ciclo de vida de *Streptomyces* lleva asociado una gran producción de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios (Chater, 1984), muchos de los cuales, poseen un alto interés económico por su aplicación en el ámbito de la medicina, la agricultura o en gran variedad de procesos tecnológicos. Por mencionar alguno de ellos, entre los metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces* podemos encontrar sustancias de tipo antifúngico como la anfotericina B producida por *S. nodosus* (Fjaervik y Zotchev, 2005), antihelmínticos como las avermectinas producidas por *S. avermitilis* (Yoon *et al.*, 2004), inmunosupresores como el tacrolimus (Wallemacq y Reding, 1993), herbicidas como la fosfotricina (Schwartz *et al.*, 2005) y antitumorales como las bleomicinas (Grimm *et al.*, 1994). No obstante, es sin duda en la producción de antibióticos donde estos microorganismos destacan de manera más señalada, pues más de la mitad de los aproximadamente 12.000 antibióticos que se habían descubierto hacia el año 2003 se deben al género *Streptomyces* (Challis y Hopwood, 2003). El número de antibióticos descritos creció de manera exponencial en las décadas de 1950 y 1960, experimentando posteriormente un fuerte descenso (Watve *et al.*, 2001). Hay que destacar sin embargo, que el amplio conocimiento de que se

dispone hoy en día acerca de los genomas de estos microorganismos, jugará un papel importante a la hora de descubrir nuevos compuestos o mejorar la producción de los ya existentes (Thompson *et al.*, 2002).

Por último, es importante señalar la elevada capacidad de producción de enzimas extracelulares que poseen los estreptomicetos, encaminadas, la mayoría, a degradar los polímeros presentes en la materia orgánica del suelo. Así, se han descrito entre otras, xilanasas (López, 1995), mananasas (Montiel *et al.*, 2002), celulasas (Deobald y Crawford, 1987), quitinasas (Kawase *et al.*, 2006), proteasas (Rao *et al.*, 1998) y amilasas (Yin *et al.*, 1997), producidas de forma natural por estos microorganismos.

1.2. Lacasas

Las lacasas (benzenodiol:dioxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2) son enzimas con actividad fenoloxidasas que contienen átomos de cobre en su centro activo (Reinhammar y Malmström, 1981). Catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos aromáticos en un proceso acoplado a la reducción del oxígeno molecular a agua (Solomon *et al.*, 1996; Messerschmidt, 1997) y pertenecen al grupo de las oxidasas multicobre, donde también se engloban la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina. Posteriormente, se añadieron otras enzimas a esta categoría como son la fenoxacinona sintasa, la bilirrubin oxidasa, la hefaestina (Vulpe *et al.*, 1999) o la proteína Fet3 de *Saccharomyces cerevisiae* (Askwith *et al.*, 1994).

Las oxidasas multicobre son un grupo de enzimas involucradas en numerosas reacciones del metabolismo celular, como la fotosíntesis, la fosforilación oxidativa, la homeostasis de iones metálicos, y el catabolismo de nutrientes y compuestos químicos tóxicos (Kosman, 2010). Del numeroso grupo de enzimas catalogado como oxidasas y oxigenasas, tan sólo las oxidasas multicobre y la citocromo C oxidasa, son capaces de llevar a cabo la reducción del oxígeno molecular de este modo (Giardina *et al.*, 2010), es decir, reduciéndolo a dos moléculas de agua en un mecanismo de transferencia de cuatro electrones acoplado a la oxidación de los sustratos

correspondientes y sin la formación de intermediarios tóxicos como el peróxido de hidrógeno.

Las lacasas son enzimas conocidas y estudiadas desde finales del siglo XIX. Se describieron por primera vez en el látex del árbol *Toxicodendron vernicifluum* (anteriormente *Rhus vernicifera*; Yoshida, 1883), lo que dio origen al nombre de la enzima (del latín medieval *lacca*= laca o barniz) (Bertrand, 1894). Más tarde se descubrió su presencia en los hongos (Bertrand, 1896) y actualmente se sabe de su existencia en insectos (Dittmer *et al.*, 2004), bacterias (Claus, 2003) y arqueas (Uthandi *et al.*, 2010), lo que demuestra su amplia distribución en la naturaleza, así como su implicación en multitud de procesos biológicos diferentes.

1.2.1. Estructura y mecanismo catalítico de las lacasas

Las lacasas presentan cuatro átomos de cobre que forman los centros T1, T2 y T3 típicos de las oxidasas multicobre. Según Solomon *et al.* (1996), los centros del cobre pueden ser clasificados en función de sus características espectrofotométricas y paramagnéticas. Así, el cobre Tipo 1 o T1 presenta una intensa absorción a 660 nm lo que confiere el color azul característico de las lacasas, y puede ser detectado por resonancia paramagnética electrónica (EPR, *electronic paramagnetic resonance*). El cobre Tipo 2 o T2 sólo presenta una débil absorción en la región visible aunque puede ser detectado por EPR. Muestra asimismo afinidad por aniones como F⁻, N³⁻ y CN⁻, que actúan como inhibidores de la enzima. El cobre Tipo 3 o T3 está formado por dos átomos de cobre acoplados y presenta un máximo de absorción a 330 nm. Se han descrito lacasas denominadas “lacasas amarillas”, ya que carecen del espectro típico de absorción para el cobre T1. Estas lacasas han sido purificadas a partir del ascomiceto *Gaeumannomyces graminis* (Edens *et al.*, 1999) o de varias especies de basidiomicetos como son, *Phlebia radiata* (Leontievsky *et al.*, 1997b), *Phellinus ribis* (Min *et al.*, 2001) o *Pleurotus ostreatus* D1 (Pozdnyakova *et al.*, 2004). Algunas de ellas son capaces de oxidar compuestos no fenólicos en ausencia de mediadores y se piensa que podrían haberse

formado a partir de una lacasa azul a la que se habría unido un compuesto aromático resultante de la degradación de la lignina por estos microorganismos (Leontievsky *et al.*, 1997a). También hay que resaltar la existencia de las “lacasas blancas” como POXA1w de *P. ostreatus* que contiene un solo átomo de cobre junto a dos átomos de zinc y uno de hierro (Palmieri *et al.*, 1997).

La mayoría de las lacasas comparten una organización general basada en tres dominios de tipo cupredoxina, unidad básica de las oxidasas multicobre y de otras proteínas del cobre (Nakamura y Go, 2005). Cada uno de estos dominios presenta un tamaño similar y una estructura de barril con topología tipo clave griega (Giardina *et al.*, 2010). El T1 se localiza en el dominio 3, mientras que el centro trinuclear formado por los átomos de cobre T2 y T3 se encuentra embebido entre los dominios 1 y 3, a una distancia de 13 Å desde el sitio T1. En la Figura 1.3 se muestra como ejemplo la estructura tridimensional de la lacasa de *Cerrena máxima*, en la que se pueden observar los tres dominios tipo cupredoxina y los centros del cobre.

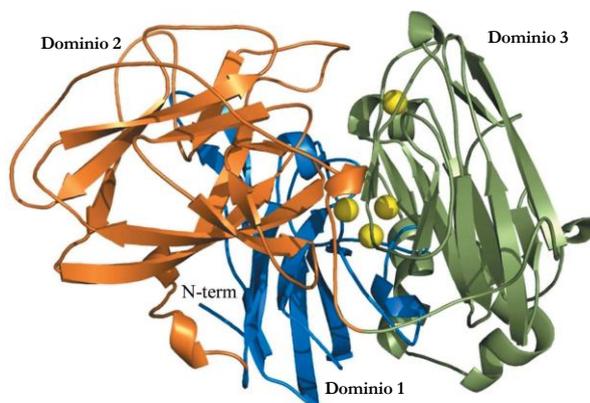


Figura 1.3. Estructura tridimensional de la lacasa de *C. maxima*, donde los centros del cobre aparecen representados como esferas amarillas (tomado de Lyashenko *et al.*, 2006).

En los últimos años se han descrito enzimas con actividad lacasa formadas por dos dominios tipo cupredoxina (Dispirito *et al.*, 1985; Endo *et al.*, 2003; Machczynski *et al.*, 2004). Entre las oxidoreductasas de dos dominios, se han publicado hasta la fecha las estructuras cristalinas de la lacasa de *S. coelicolor* (Skálová *et al.*, 2009), de una lacasa metagenómica (Komori *et al.*, 2009) y

de una oxidasa multicobre de *Nitrosomonas europaea* (Lawton *et al.*, 2009), lo que ha permitido elucidar que todas ellas se constituyen en forma de trímero. En el caso de la lacasa de *S. coelicolor* (SLAC), se ha obtenido más recientemente una nueva estructura cristalina de mayor resolución en la que se ha empleado el hexacianoferrato de potasio como ligando (Skálová *et al.*, 2011). En la Figura 1.4 se puede observar la estructura trimérica de esta lacasa de dos dominios.



Figura 1.4. Estructura tridimensional de la lacasa de *S. coelicolor*. Los dominios tipo cupredoxina aparecen agrupados en forma de tres dímeros, las esferas de color morado representan los centros del cobre mientras que las esferas de color naranja se corresponden con el ligando (Tomado de Skálová *et al.*, 2011).

Según la teoría evolutiva de Nakamura y Go (2005) acerca de las oxidasas multicobre y las proteínas monoméricas tipo cupredoxina, se pueden distinguir tres tipos de oxidoreductasas multicobre de dos dominios en función de la posición del cobre T1: A, B y C (Nakamura *et al.*, 2003). El tipo A que contiene un cobre T1 en cada uno de los dominios sería un ancestro común de los tipos B y C, mientras que los tipos B y C, contienen un único cobre T1 en el segundo o primer dominio cupredoxina, respectivamente (Figura 1.5). El tipo B (que se correspondería con el tipo de estructura que presenta SLAC) sería un ancestro común de las ascorbato oxidasas, las lacasas, las proteínas CueO de *E. coli* y Fet3 (de tres dominios) y de la ceruloplasmina (de seis dominios). Por último, el tipo C (que se correspondería con la lacasa metagenómica y la oxidasa de *N. europaea*) sería el ancestro común de las nitrito reductasas triméricas de dos dominios (Skálová *et al.*, 2011). Así, estas proteínas de dos dominios, debido a la pérdida de centros del cobre y ganancia o duplicación de dominios, habrían dado lugar a las distintas oxidasas multicobre conocidas y a otras proteínas del cobre como las nitrito reductasas que sólo poseen centros T1 y T2 (Komori y Higuchi, 2010). Como sugieren estos últimos autores, en un primer paso evolutivo habría tenido lugar la duplicación del dominio cupredoxina, que mediante la formación de un homotrímero habría adquirido la estabilidad total de la molécula posibilitando la formación de los centros trinucleares.

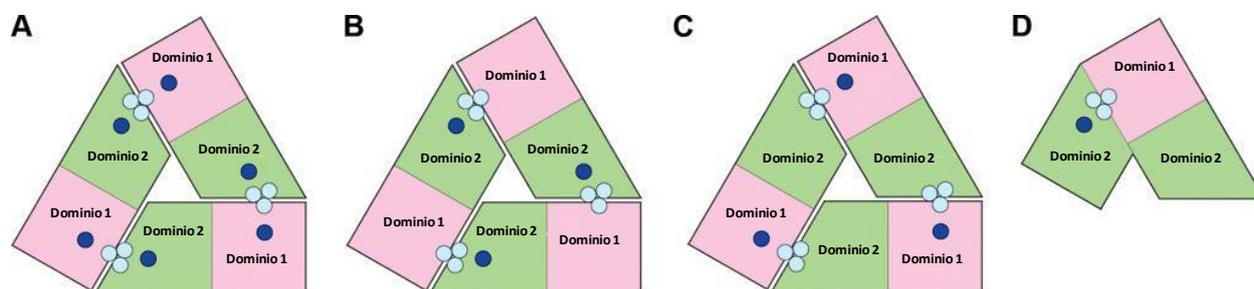


Figura 1.5. Esquema de la organización de dominios cupredoxina (rosa: dominio 1; verde: dominio 2) en las oxidasas multicobre, donde el cobre T1 aparece representado por un círculo de color azul y el centro trinuclear T2/T3 por círculos azul claro. Oxidasas multicobre de dos dominios tipo A (A), B (B) y C (C) y oxidasa multicobre de tres dominios (D). (Modificado de Lawton *et al.*, 2009).

Aunque se pueden hallar grandes diferencias en las secuencias aminoacídicas de las lacasas conocidas, los aminoácidos que se encargan de coordinar los átomos de cobre están muy conservados en estas proteínas. Se trata de un conjunto de diez histidinas y una cisteína que se distribuyen normalmente del mismo modo en la cadena polipeptídica (dos histidinas en el dominio N terminal y el resto de ligandos próximos al extremo C terminal) (Thurston, 1994).

1.2.1.1. El sitio T1

El cobre T1 de las lacasas está coordinado con el átomo de azufre de una cisteína y con dos nitrógenos procedentes de dos histidinas. Debido a su elevado potencial es ahí donde tiene lugar la oxidación del sustrato, siendo transferidos a continuación los electrones a través del tripéptido (His-Cys-His) hacia el centro trinuclear, donde tiene lugar la reducción del oxígeno a agua (Figura 1.6) (Solomon *et al.*, 2008).

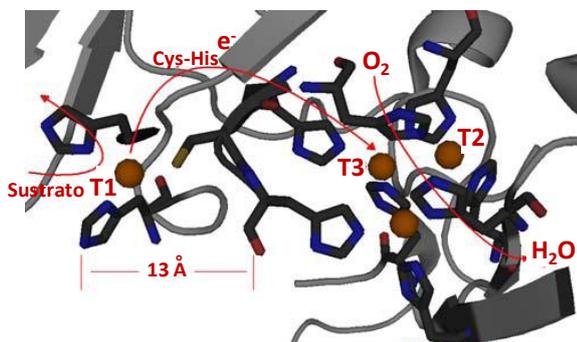


Figura 1.6. Representación del sitio activo de la lacasa donde se indica mediante flechas el flujo de electrones, oxígeno y sustrato (tomado de Giardina *et al.*, 2010).

Algunas lacasas, como las de *Rhus vernicifera* (Nitta *et al.*, 2002) o *Bacillus subtilis* (Enguita *et al.*, 2003), así como otras oxidasas multicobre, presentan un cuarto ligando, generalmente una metionina, que completa esta esfera de coordinación. La falta de este cuarto ligando es considerado un factor determinante en los altos potenciales de oxidorreducción encontrados en algunas lacasas en comparación con otras oxidasas multicobre (Gray *et al.*, 2000), ya que la mayoría de lacasas fúngicas tienen en esta posición otro

aminoácido, habitualmente leucina o fenilalanina, que no actúa como ligando del cobre. Esta hipótesis está apoyada por experimentos de mutagénesis sobre este ligando axial, como por ejemplo en el caso de la lacasa de *Trametes villosa* (Xu *et al.*, 1999), donde la sustitución de una fenilalanina no coordinante por una metionina, provocó una pérdida de 100 mV en su potencial de reducción.

Existe otra hipótesis que explica este fenómeno, según la cual, las oxidasas multicobre modulan su potencial de reducción (E^0) en función de la reducción de la densidad electrónica alrededor del cobre T1, gracias a la variación de la distancia entre el T1 y una de las histidinas que lo coordinan (Piontek *et al.*, 2002). Sin embargo, otros estudios de EPR revelan que la estructura de la esfera de coordinación del T1 es muy similar en lacasas con diferente E^0 con lo que esta hipótesis ha perdido fuerza (Matera *et al.*, 2008). En cualquier caso, las diferencias de potencial observadas entre las lacasas no pueden atribuirse en exclusiva a una sola causa, y es posible que otros factores como la accesibilidad al disolvente o la anisotropía dieléctrica puedan afectar al valor del E^0 (Li *et al.*, 2004; Giardina *et al.*, 2010).

El sitio T1 se localiza en una cavidad a 7 Å por debajo de la superficie de la enzima que hace posible su papel como aceptor primario de electrones (Komori y Higuchi, 2010). Estudios recientes han permitido conocer con una alta resolución la estructura de una lacasa con el sustrato 2,5-xilidina en el interior de dicha cavidad (Bertrand *et al.*, 2002). El estudio permitió identificar numerosas interacciones hidrofóbicas entre proteína y ligando en las que estaban implicados los residuos que rodeaban a dicha cavidad. Más aún, los residuos de una histidina y un aspártico resultaron ser fundamentales para la interacción del grupo amino del sustrato con la enzima. Este residuo aspártico, muy conservado entre las lacasas de hongos basidiomicetos, se cree que juega un papel importante en determinar la dependencia de la actividad lacasa del pH (Xu *et al.*, 1998; Xu, 1997).

El centro T1 tiene un potencial que varía entre 420 y 790 mV frente al electrodo normal de hidrógeno (NHE) (Christenson *et al.*, 2004). En este sentido, las lacasas son clasificadas en función

de dicho valor como lacasas de alto potencial redox (E^0 superior a 710 mV), medio potencial redox (entre 470 y 710 mV) o bajo potencial redox (inferior a 470 mV).

1.2.1.2. El sitio T2/T3

Los cobres T2 y T3 forman un centro trinuclear cuyos ligandos son átomos de nitrógeno correspondientes a ocho histidinas, las cuales se disponen según un patrón muy conservado, de cuatro motivos H-X-H (Messerschmidt y Huber, 1990). Es en este centro trinuclear donde tiene lugar la reducción del oxígeno molecular mediante un mecanismo que se muestra en la Figura 1.7.

Este mecanismo se inicia con el paso de la enzima a un estado completamente reducido cuando recibe cuatro electrones del sustrato. En ese estado, reacciona con el oxígeno suministrándole dos electrones y dando lugar al intermediario peróxido, en el que los dos átomos de cobre T3 y el cobre T2, están unidos a través de un grupo peróxido. En una segunda transferencia de dos electrones el intermediario peróxido es reducido, dando lugar al intermediario nativo. El intermediario nativo, que puede estar en forma oxo o hidroxilo, se reduce rápidamente en presencia del sustrato en la reacción de catálisis.

Por el contrario, en ausencia del sustrato pasa lentamente al estado de reposo oxidado, en el que uno de los átomos de oxígeno está unido como grupo hidroxilo al cobre T2. Finalmente, el estado de reposo puede ser también reducido por el sustrato para dejar a la enzima completamente reducida (Solomon *et al.*, 2001).

Para alcanzar el conocimiento del que se dispone hoy en día acerca de este mecanismo, se han llevado a cabo numerosos estudios cinéticos y espectroscópicos con la lacasa de *Rhus vernicifera* (Palmer *et al.*, 2001; Augustine *et al.*, 2008) y más recientemente con la proteína Fet3p de *Saccharomyces cerevisiae* (Augustine *et al.*, 2007; Augustine *et al.*, 2008). Algunas de las estrategias seguidas en estos estudios han sido la sustitución del cobre T1 por un ión de mercurio, lo que ha permitido por ejemplo la detección del intermediario peróxido (Shin *et al.*, 1996); o la mutación de las histidinas que actúan como ligando del cobre T3, que revelaron una perturbación sobre el centro T1 en cuanto a potencial o modificación de su espectro (Augustine *et al.*, 2008). Al parecer las cargas aniónicas que rodean al centro trinuclear en la forma reducida, contribuyen a estabilizar su elevada carga positiva lo que a su vez facilita la reactividad con el oxígeno (Quintanar *et al.*, 2005).

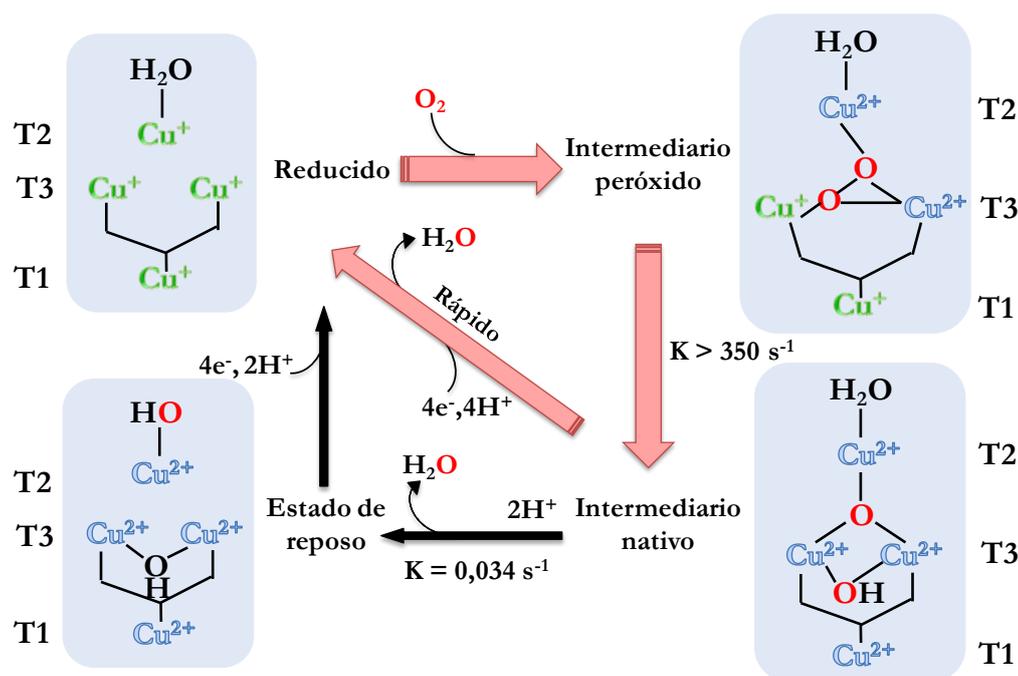


Figura 1.7. Mecanismo molecular de reducción del oxígeno a agua catalizado por lacasas. (Modificado de Solomon *et al.*, 2001 y de Giardina *et al.*, 2010).

Basándose en estudios estructurales de rayos X con la lacasa CotA de *Bacillus subtilis* y otras oxidasas multicobre, Bento *et al.* (2005) propusieron un mecanismo diferente para la reducción del oxígeno, donde la principal diferencia reside en la participación del estado de reposo en el ciclo catalítico.

En los últimos años se han realizado aportaciones interesantes en relación con los aspectos estructurales implicados en el mecanismo catalítico de las lacasas. Así por ejemplo, la aplicación de radiación de sincrotrón permite reducir los centros del cobre durante la toma de datos, y la enzima entra en una especie de ciclo de oxidación-reducción, de manera que el ciclo catalítico se repite varias veces, y bajo condiciones aerobias y elevado pH es posible detectar los estados intermediarios peróxido y nativo, que confirman los datos obtenidos en estudios preliminares (Ferraroni *et al.*, 2007; Matera *et al.*, 2008).

Finalmente, ha sido merced a numerosos estudios estructurales lo que ha permitido identificar los canales de entrada de oxígeno (cercano al centro T3) y de salida de agua (próximo al centro T2) (Figura 1.8).

El potencial redox del centro T2 ha sido estimado para lacasas de bajo E^0 como la de *Rhus vernicifera* (Reinhammar, 1972) y alto E^0 como la de *Trametes hirsuta* (Shleev *et al.*, 2005), siendo en ambos casos de unos 400 mV.

Asimismo, el E^0 del par de átomos de cobre del centro T3 se ha estimado en 480 y 780 mV para lacasas de bajo y alto potencial redox, respectivamente (Reinhammar, 1972).

1.2.2. Especificidad de sustrato

Las lacasas son enzimas que se caracterizan por su baja especificidad de sustrato. Así, el rango de compuestos susceptibles de ser oxidados por estas enzimas incluye mono- y polifenoles, fenoles sustituidos con grupos metoxilo, aminas aromáticas e incluso iones metálicos (Thurston, 1994; Höfer y Schlosser, 1999; Larrondo *et al.*, 2003). Los fenoles pueden ser considerados como los sustratos típicos de las lacasas debido a que su bajo potencial redox (entre 0,5 y 1 V *vs.* NHE) permite la abstracción de electrones por el cobre T1 de la enzima (Giardina *et al.*, 2010). De los numerosos sustratos descritos para las lacasas, tan sólo se dispone de datos acerca de las constantes cinéticas para algunos de ellos (ABTS, siringaldazina, 2,6-dimetoxifenol y guayacol, principalmente). La K_m para el ABTS y la siringaldazina suele ser inferior a 100 μ M mientras que para los otros dos sustratos no supera 1 mM, en el caso de las lacasas fúngicas. En cuanto a la K_{cat} se mueve en varios órdenes de magnitud para los distintos sustratos y es característica de cada proteína (Yaropolov *et al.*, 1994; Baldrian, 2006).

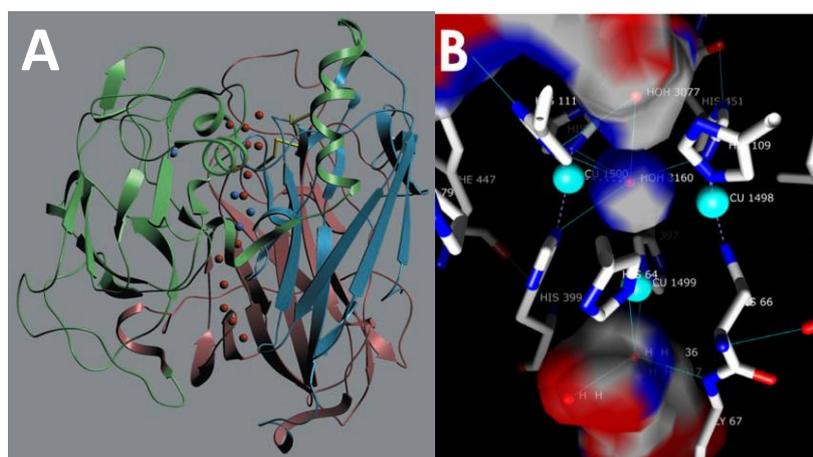
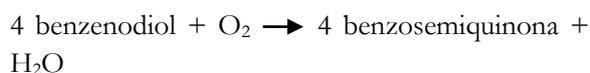


Figura 1.8. A) Estructura tridimensional de la lacasa de *Trametes versicolor* mostrando los canales de entrada de oxígeno y salida de agua (esferas de color rojo) (tomado de Piontek *et al.*, 2002). B) Representación del centro T2/T3 de la lacasa de *T. trogii* mostrando la superficie del canal de oxígeno (en la parte superior) y del canal de agua (en la parte inferior) (tomado de Matera *et al.*, 2008).

Las lacasas se diferencian de otras polifenoloxidasas como las tirosinasas (EC 1.14.18.1) y las catecol oxidasas (EC 1.10.3.1) en que no pueden oxidar tirosina y no son inhibidas por monóxido de carbono. Estas enzimas, como ya se ha mencionado, catalizan la reducción del oxígeno molecular a dos moléculas de agua, a través de un mecanismo de transferencia de cuatro electrones acoplado a la oxidación de un sustrato, y sin la formación de intermediarios tóxicos.

La estequiometría típica de la reacción catalizada por la lacasa responde a la siguiente ecuación:



El hecho de que un compuesto sea susceptible de ser oxidado por una lacasa está determinado tanto por su estructura como por su potencial redox (Tadesse *et al.*, 2008). En el caso de los compuestos fenólicos, el hecho de que la molécula esté sustituida en posición meta-, orto- o para-, determina que pueda ser más fácilmente oxidable por la enzima. Mientras que la sustitución en posición meta- hace que el compuesto sea peor sustrato, la posición orto- es la más favorable (Lahtinen *et al.*, 2009). La oxidación del sustrato también se ve favorecida con los grupos -OH y -NH₂ como sustituyentes, mientras que se perjudica con los grupos -Cl y -NO₂, secuestradores de electrones (Peisach y Levine, 1965; Kirk *et al.*, 1968; Gierer y Opara, 1973).

Las lacasas, por el hecho de contener iones metálicos pueden ser inhibidas por aniones como el fluoruro, la azida y el cianuro (Morpurgo *et al.*, 1982; Baldrian, 2006). Otros compuestos descritos como inhibidores de la actividad lacasa son metales pesados como el Hg²⁺ o compuestos quelantes como el EDTA (Lorenzo *et al.*, 2005; Baldrian, 2006).

1.2.3. Biología molecular de las lacasas

El número de secuencias genéticas correspondientes a lacasas ha ido creciendo casi exponencialmente desde finales de los años 80 y como sucede para el resto de estudios relacionados con estas enzimas, la mayoría de ellas se corresponden con secuencias de lacasas

fúngicas. A pesar de los cientos de genes de lacasas que podemos encontrar al realizar una búsqueda en internet, muchas de ellos se corresponden con secuencias parciales o genes putativos de lacasas, por lo que el número descende considerablemente cuando se trata de lacasas cuyo producto proteico ha sido caracterizado de manera experimental.

La información genética de la que se dispone acerca de estas enzimas, ha permitido su sobreexpresión en otros microorganismos con el fin de mejorar su producción, con vistas a su aplicación industrial. Así por ejemplo, las lacasas fúngicas se han sobreexpresado heterológamente en *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus nidulans*, etc., mientras que muchas de las lacasas bacterianas se han sobreexpresado en *Escherichia coli* (Kunamneni *et al.*, 2008). Sin embargo, los niveles de enzima así obtenidos están todavía lejos de los rendimientos exigidos en las aplicaciones industriales. Las enzimas tienen requerimientos específicos en cuanto a plegamiento y grado de glicosilación, por lo que dependiendo del hospedador, la forma recombinante se puede ver afectada en este sentido. Para solventar estos problemas, en la actualidad se está haciendo hincapié en la modificación de las enzimas, con el fin de mejorar su especificidad de sustrato y/o estabilidad, mediante estrategias de mutagénesis (Madzak *et al.*, 2005) o evolución dirigida (Pedersen *et al.*, 1998). La evolución dirigida consiste en crear librerías de mutantes al azar con el fin de identificar variantes de la enzima nativa en la que se haya producido alguna mejora en cuanto a sus propiedades físico-químicas. Así, se han descrito experimentos de evolución dirigida exitosos en los que se ha conseguido mejorar la expresión y actividad de la lacasa de *Myceliophthora thermophila* y otras lacasas fúngicas (Bulter *et al.*, 2003; Mate *et al.*, 2011).

En lo referente a los mecanismos que regulan la expresión de los genes de lacasas, se sabe que dicha expresión está regulada por una serie de factores entre los que cabe destacar los niveles de nutrientes, las condiciones de cultivo o la adición al medio de determinados inductores. En el caso de las lacasas fúngicas, se ha descrito que la presencia de determinados compuestos en el medio, puede incrementar la expresión de los

genes de lacasas. Entre estos compuestos se encuentran iones metálicos como el cobre, principalmente, (Collins y Dobson, 1997; Palmieri *et al.*, 2000; Galhaup *et al.*, 2002) y otros como manganeso, cadmio y plata (Soden y Dobson, 2001). El efecto de estos metales está relacionado en muchos casos con la presencia de elementos de respuesta a metales en las regiones promotoras de los genes (Palmieri *et al.*, 2000).

La expresión de lacasas también puede ser inducida por compuestos aromáticos como xilidina, ácido ferúlico, ácido verátrico o incluso colorantes. Además, también se ha relacionado este hecho con la presencia en los genes de elementos de respuesta a xenobióticos (Soden y Dobson, 2001; Marques De Souza y Peralta, 2003; Faraco *et al.*, 2003)).

La actividad lacasa también ha resultado ser dependiente en algunos casos del nitrógeno y la fuente de carbono. Así, se han detectado cambios en la actividad lacasa en respuesta a diferentes concentraciones de nitrógeno en *T. versicolor* (Thurston, 1994) y en algunas isoenzimas de lacasas de *Pleurotus sajor-caju* (Soden y Dobson, 2001). Por otro lado, elevados niveles de glucosa inhibieron la actividad lacasa en algunas especies de *Trametes* (Galhaup *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2006).

Por último, cabe señalar que es frecuente que las plantas y los hongos presenten familias de lacasas multigénicas (Giardina *et al.*, 2010). Algunos estudios defienden la hipótesis de que los distintos miembros de estas familias se expresarían de manera diferencial a lo largo del ciclo de vida del microorganismo. Así, mientras que una de las isoenzimas de *Trametes* sp. se expresa en los estadios tempranos de crecimiento del microorganismo, otra lo hace en la fase estacionaria (Mansur *et al.*, 1997). En otros casos, en que los hongos fueron cultivados sobre un sustrato lignocelulósico sólido, la mayor producción de actividad lacasa se detectó en el estadio de máxima colonización del microorganismo, lo que tendría que ver con el hecho de que en esta fase se requiere la degradación de la lignina presente en el medio (Ohga y Royse, 2001).

1.2.4. Distribución y función de las lacasas

Las lacasas están ampliamente distribuidas entre los organismos eucariotas y procariotas, y se ha descrito su implicación en numerosos procesos biológicos, aunque en muchos casos, sea difícil elucidar con exactitud la función que realizan. Aparte de haberse detectado su existencia en plantas, insectos, hongos, bacterias y arqueas, como se explicará a continuación, cada vez son más numerosos los estudios que revelan la presencia de proteínas con actividad lacasa en los metagenomas de diversos medios como son, la microbiota de rumen bovino (Beloqui *et al.*, 2006) o muestras de suelos de diversa procedencia (Kellner *et al.*, 2008).

1.2.4.1. Eucariotas

➤ Lacasas de plantas

La mayoría de las lacasas de plantas son proteínas extracelulares monoméricas con un grado de glicosilación del 22 al 45 % (Solomon *et al.*, 1996). La lacasa más estudiada de este grupo es sin duda la del árbol de la laca japonés (Mayer y Staples, 2002). Tras su descubrimiento en el año 1883 (Yoshida, 1883), se han identificado lacasas en gran número de especies vegetales, tanto en dicotiledóneas como el tabaco (Richardson y McDougall, 1997), el álamo (Ranocha *et al.*, 1999) y el algodón (Wang *et al.*, 2004), como en monocotiledóneas como el arroz y el maíz (Caparrós-Ruiz *et al.*, 2006).

Las lacasas de plantas, como se ha comentado anteriormente, pertenecen a familias multigénicas, y dentro de una misma especie se han identificado numerosas isoformas, como es el caso de *Pinus taeda*, donde se identificaron hasta 8 lacasas diferentes (Sato *et al.*, 2001).

En cuanto a la función que desempeñan las lacasas de plantas, su implicación en la síntesis de lignina ha sido tema de debate durante años. Numerosos estudios han reforzado la participación de estas enzimas en los últimos pasos de este proceso, al haberse comprobado su participación en la polimerización de monolignoles (Higuchi y Ito, 1958; Sterjiades *et al.*, 1992) y la correlación de la actividad lacasa con la deposición de lignina en paredes celulares del xilema (Dean y Eriksson, 1994; Bao *et al.*, 1993). Sin embargo, otros estudios genéticos de pérdida

o ganancia de función, han revelado que las variaciones en el contenido de lignina son casi imperceptibles (Ranocha *et al.*, 2002)). Otras funciones con las que han sido relacionadas las lacasas de plantas serían, la de protección frente a lesiones (Oshima *et al.*, 1985), oxidación de Fe²⁺ a Fe³⁺ en el espacio extracelular de la pared celular (Hoopes y Dean, 2004) o fenómenos de pigmentación de las semillas mediante polimerización de flavonoides (Pourcel *et al.*, 2005).

➤ Lacasas de insectos

Las lacasas de insectos se han relacionado con procesos de esclerotización de la cutícula. Durante los años 70 y 80 se aislaron varias lacasas de la cutícula de insectos (Andersen *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1989) y posteriormente se clonaron y caracterizaron los genes de dos lacasas en el gusano del tabaco (*Manduca sexta*) y el mosquito causante de la malaria (*Anopheles gambiae*) (Dittmer *et al.*, 2004). Recientemente, se ha descrito la presencia de estas enzimas en el gusano de seda *Bombix mori* (Yatsu y Asano, 2009) y en el escarabajo rojo *Tribolium castaneum* (Arakane *et al.*, 2005), donde se ha propuesto su participación en la pigmentación de la cutícula. Por último, se ha detectado una lacasa en la saliva y glándulas salivales de *Nephotettix viaticipes*, donde se ha relacionado con nuevas funciones como la destoxificación de compuestos fenólicos derivados de las plantas que ingieren y la gelificación de la saliva (Hattori *et al.*, 2010).

➤ Lacasas de hongos

Las lacasas fúngicas son proteínas glicosiladas, con un punto isoeléctrico en torno a pH 4 y una masa molecular típica entre 60 y 70 kDa (Baldrian *et al.*, 2006). Son numerosas las especies de hongos que producen varias isoenzimas como es el caso de *Pleurotus ostreatus* (Palmieri *et al.*, 2003; Palmieri *et al.*, 2000).

Constituyen el grupo mejor caracterizado dentro de las lacasas. Algunas de las especies mejor conocidas como productoras de lacasas son: *Trametes versicolor*, *T. hirsuta*, *T. villosa*, *Phlebia radiata*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus eryngii*, etc. También han sido identificadas en hongos ascomicetos saprofitos como *Curvularia* y *Penicillium* y hongos

formadores de ectomicorrizas como *Cantharellus cibarius* y *Telephora terrestris* (Dwivedi *et al.*, 2011).

Los hongos basidiomicetos causantes de la podredumbre blanca de la madera, se caracterizan por presentar una elevada actividad lacasa. Estos niveles de actividad han sido relacionados con el papel que juega la enzima en la degradación de componentes de la pared vegetal como la lignina, en conjunción con otras enzimas producidas por estos hongos como las lignina y manganeso peroxidasas. Aunque algunos estudios han puesto en duda esta función (Haars y Hüttermann, 1980), existen importantes evidencias que apoyan la función ligninolítica de las lacasas fúngicas. Así, se ha descrito que el hongo *Pycnoporus cinnabarinus* que produce únicamente lacasa como enzima ligninolítica (Eggert *et al.*, 1996b) pierde la capacidad de degradar la lignina cuando el gen de esta enzima es mutado (Eggert *et al.*, 1997); por otro lado, existen diversos estudios que demuestran la participación de estas enzimas en reacciones relacionadas con la degradación de la lignina, tales como oxidaciones, desmetilaciones, formación de grupos carboxilo libres, etc. (Ishitara y Miyazali, 1972; Konishi *et al.*, 1974). En cuanto a la presencia de lacasas en los hongos de podredumbre parda, aquellos que degradan el material lignocelulósico pero no la lignina, se han llevado a cabo estudios que sugieren de manera indirecta la presencia de lacasas en este grupo de hongos (D'Souza *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004), aunque no ha sido hasta fechas muy recientes cuando se ha conseguido purificar alguna de estas enzimas (Wei *et al.*, 2010).

Además de su posible papel en la degradación de biopolímeros, las lacasas fúngicas se han relacionado con diversos procesos de morfogénesis, tales como pigmentación en *Aspergillus nidulans* (Law y Timberlake, 1980), la formación de los cuerpos fructificantes en *Volvariella volvacea* y *Schizophyllum* sp. (Chen *et al.*, 2004; de Vries *et al.*, 1986) o el desarrollo de rizomorfos en *Armillaria mellea* (Worrall *et al.*, 1986). Por otro lado, las lacasas son consideradas como factores de virulencia en enfermedades causadas por los hongos *Botrytis cinerea* (Viterbo *et al.*, 1994), *Ophiostoma novo-ulmi* (Binz y Canevascini, 1997) y *Fusarium proliferatum* (Regalado *et al.*, 1999), gracias a la degradación de depósitos de lignina

producidos por la planta en respuesta a la invasión (Litvintseva y Henson, 2002) o a la protección frente a compuestos fenólicos de defensa, tales como las fitoalexinas (Bar-Nun y Mayer, 1990). Por último, cabe destacar el papel de una lacasa fúngica como uno de los factores de virulencia más importantes en las infecciones humanas causadas por *Cryptococcus neoformans*. Esta lacasa está implicada por un lado, en la síntesis de melanina (Williamson, 1997), y por otro lado, es capaz de bloquear la producción de radicales hidroxilo por parte de los macrófagos del sistema inmunitario (Liu *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2001).

1.2.4.2. Procariotas

➤ Lacasas de arqueas

Aunque la presencia de lacasas en arqueas ya se sugería hace años (Claus, 2003), no ha sido hasta fechas más recientes cuando han comenzado a publicarse los primeros estudios que confirman este hecho. Así, un estudio “in silico” llevado a cabo por Sharma y Kuhad (2009), reveló la posible existencia de lacasas en diferentes grupos de arqueas como son *Haloarcula marismortui* ATCC 43049, *Natronomonas pharaonis* DSM2160 y *Pyrobaculum aerophilum* IM2, entre otras. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de los genomas conocidos de arqueas se correspondan con arqueas anaerobias, podría haber afectado al escaso número de oxidasas multicobre identificadas en estos microorganismos. Por otro lado, en el año 2010 se purificó y caracterizó la primera lacasa (LccA) producida por la arquea *Haloferax volcanii* (Uthandi *et al.*, 2010). Esta lacasa es termoestable, presenta una gran tolerancia a elevadas concentraciones de sal y disolventes orgánicos y un pH óptimo de reacción alcalino (6-8,4).

➤ Lacasas bacterianas

Las lacasas bacterianas, aunque no tan conocidas y estudiadas como las fúngicas, están ampliamente distribuidas en estos microorganismos, como reveló en el año 2000 un estudio en el que se analizaron las bases de datos de secuencias de proteínas y genomas bacterianos en busca de secuencias similares a las de las lacasas fúngicas (Alexandre y Zhulin, 2000).

La primera lacasa bacteriana en ser descubierta fue la producida por la bacteria de la rizosfera *Azospirillum lipoferum* (Givaudan *et al.*, 1993), que juega un papel importante en procesos de pigmentación y utilización de compuestos fenólicos producidos por la planta (Faure *et al.*, 1995) así como en el transporte de electrones (Alexandre *et al.*, 1999). La siguiente lacasa bacteriana identificada fue una polifenoloxidasas multipotente producida por la bacteria marina *Marinomonas mediterranea*, que se caracteriza por su capacidad de oxidar tirosina aparte de los sustratos típicos de las lacasas (Sánchez-Amat *et al.*, 2001). Esta lacasa atípica que además presenta una alta tolerancia a las sales, se relaciona con respuestas adaptativas del microorganismo al estrés (Lucas-Elio *et al.*, 2002), lo que contribuye a ejemplificar la ubicuidad de las bacterias en hábitats y condiciones ambientales de lo más diverso.

Una de las lacasas bacterianas más estudiadas ha sido la lacasa CotA, un componente de la cubierta de las endoesporas de *Bacillus subtilis* (Hullo *et al.*, 2001). CotA participa en la biosíntesis de un pigmento de color pardo de la espora, probablemente del tipo de la melanina (Driks, 2004) que parece ser responsable de la protección frente a la radicación UV y el peróxido de hidrógeno. Fue, además, la primera lacasa bacteriana cristalizada y en la que se pudieron detectar motivos únicos no observados en las lacasas de eucariotas (Enguita *et al.*, 2003). Otras especies de este género en las que se ha encontrado actividad lacasa o se ha llegado a purificar y caracterizar la enzima, son por ejemplo *B. sphaericus* (Claus y Filip, 1997), *B. halodurans* (Ruijsenaars y Hartmans, 2004), *B. licheniformes* (Koschorreck *et al.*, 2008) y *B. pumillus* (Reiss *et al.*, 2011).

Dentro del género *Streptomyces*, se han identificado lacasas en varias de sus especies. Una de las más estudiadas es la lacasa EpoA, producida por *Streptomyces griseus* (Endo *et al.*, 2003). Se trata de una lacasa homotrimérica que parece desempeñar un papel en la morfogénesis del microorganismo. Un caso particular lo representa SLAC, la lacasa producida por *S. coelicolor* (Machczynski *et al.*, 2004), que fue la primera lacasa de dos dominios cupredoxina identificada y de la que además se ha llevado a cabo su

cristalización (Skálová *et al.*, 2009). El análisis de su estructura reveló su naturaleza trímerica, ya que esta enzima está constituida por seis dominios cupredoxina organizados en tres homodímeros, en contraposición a los primeros análisis bioquímicos que hacían pensar que la enzima era un dímero (Machczynski *et al.*, 2004). Recientemente, en nuestro laboratorio se ha llevado a cabo la caracterización y purificación de la lacasa de *S. ipomoea* (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). La búsqueda de regiones conservadas en esta lacasa bacteriana de pequeño tamaño ha revelado que está también constituida por dos dominios cupredoxina.

Es frecuente que las lacasas bacterianas se presenten en forma multimérica, como es el caso de las ya mencionadas EpoA y SLAC, o como las lacasas de *A. lipoferum* (que consta de una unidad catalítica y una o dos unidades estructurales) o la homodimérica de *Sinorhizobium meliloti* (Diamantidis *et al.*, 2000; Rosconi *et al.*, 2005).

En cuanto a la función biológica que podrían desempeñar las lacasas de bacterias, hay todavía muchas incógnitas. De hecho, no están tan claros los procesos en los que podrían estar implicadas, al contrario de lo que ocurre en algunas lacasas fúngicas y hasta la fecha son numerosas y muy diversas las funciones que se les atribuyen. Como se ha descrito hasta ahora, se han relacionado con procesos de resistencia a metales, morfogénesis, esporulación, etc. aunque salvaguardando el hecho de que muchas de las actividades lacasa identificadas se corresponden con oxidasas multicobre, de las que se carece de evidencias bioquímicas suficientes como para incluirlas en la categoría de lacasas, propiamente dichas. En la Tabla 1.1 se muestra un resumen de las principales oxidasas multicobre tipo lacasas descritas en bacterias, así como su posible función biológica.

1.3. Mecanismos de oxidación indirectos de las lacasas: sistemas lacasa-mediador y producción de especies reducidas de oxígeno

La implicación de las lacasas en la degradación de la lignina se vio reforzada con el descubrimiento de que la acción concertada de estas enzimas y compuestos oxidables de bajo peso molecular podía extender la acción oxidativa de las mismas a compuestos aromáticos no

fenólicos, que no son sustrato habitual de estas enzimas (Bourbonnais y Paice, 1990).

La lignina es un polímero tridimensional de naturaleza fenilpropanoide que junto a la celulosa y la hemicelulosa, constituye el componente principal de la lignocelulosa, que a su vez, es el componente mayoritario de la pared celular vegetal. La lignina desempeña importantes funciones en la planta, como la de proporcionar dureza e impermeabilidad, necesarias para la conducción de agua y sales minerales, así como la de proteger a los polisacáridos del ataque microbiano (Higuchi, 1990). Está formada por tres unidades de fenilpropano, unidos por más de diez tipos de enlaces diferentes de tipo éter y carbono-carbono (Sakakibara, 1991; Adler, 1977). Los precursores de las unidades de la lignina son tres alcoholes cinámicos (3-fenil-2-propen-1-ol), denominados cumarílico (4-hidroxicinámico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinámico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico) que sirven de base para las unidades *p*-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S), respectivamente. Estos alcoholes se sintetizan a partir de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina y L-tirosina durante el metabolismo primario de las plantas (Higuchi, 1990).

La lignina es un polímero heterogéneo (Figura 1.9), cuya variabilidad se debe principalmente a las distintas proporciones de unidades H, G y S que contiene. Su composición puede variar no sólo dependiendo del tipo de célula, tejido o especie, sino también según el tipo de planta. Así, la lignina de gimnospermas está constituida por unidades G principalmente, mientras que la de angiospermas contiene cantidades equivalentes de unidades G y S (Higuchi, 1980; Betts *et al.*, 1991). En el caso de la lignina de angiospermas herbáceas, ésta se caracteriza por presentar un alto contenido de unidades H, además de las unidades G y S.

La variabilidad estructural dentro de la molécula de lignina, también es debida a la presencia de unidades fenólicas no convencionales y a los diferentes enlaces intermonoméricos (Lapierre, 1993). Si bien los distintos tipos de enlaces se forman al azar, no todos se encuentran en la misma proporción.

Tabla 1.1. Posible función biológica de las principales oxidasas multicobre tipo lacasa descritas en procariontas. (Modificado de Sharma *et al.*, 2007).

Especie (gen)	Posible función	Referencia
<i>Aquifex aelicus</i> (suff)	Proteína de división celular	(Deckert <i>et al.</i> , 1998)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Pigmentación Oxidación de compuestos fenólicos Transporte de electrones	(Givaudan <i>et al.</i> , 1993)
<i>Bacillus</i> sp. (mnx G)	Esporulación, oxidación Mn ²⁺	(Van Waasbergen <i>et al.</i> , 1996)
<i>Bacillus sphaericus</i>	Esporulación, pigmentación	(Claus y Filip, 1997)
<i>Bacillus subtilis</i> (cotA)	Pigmentación de esporas Resistencia a UV y H ₂ O ₂	(Hullo <i>et al.</i> , 2001)
<i>Bacillus halodurans</i> C-125 (lbb 2082)	Resistencia al Cu ²⁺	(Ruijsenaars y Hartmans, 2004)
<i>Bacillus licheniformes</i> (cotA)	Pigmentación de esporas Resistencia a UV y H ₂ O ₂	(Koschorreck <i>et al.</i> , 2008)
<i>Bacillus pumilus</i> (cotA)	Pigmentación de esporas Resistencia a UV y H ₂ O ₂	(Reiss <i>et al.</i> , 2011)
<i>Escherichia coli</i> (yacK)	Flujo de Cu ²⁺ Oxidación de fenolatos-sideróforos Actividad ferroxidasa	(Kim <i>et al.</i> , 2001) (Roberts <i>et al.</i> , 2002)
<i>Escherichia coli</i> (pcoA)	Resistencia al Cu ²⁺	(Huffman <i>et al.</i> , 2002)
<i>Leptothrix discophora</i> SS1	Destoxificación de Mn ²⁺ Eliminación de especies tóxicas O ₂	(Adams y Ghiorse, 1987)
<i>Marinomonas mediterranea</i> (ppoA)	Pigmentación	(Sánchez-Amat y Solano, 1997) (Sánchez-Amat <i>et al.</i> , 2001)
<i>Oceanobacillus ihbensis</i> (cotA)	Esporulación	(Takami <i>et al.</i> , 2002)
α-proteobacteria SD 21	Oxidación de Mn ²⁺	(Francis <i>et al.</i> , 2001)
α-proteobacteria JB	Oxidación de compuestos tóxicos	(Bains <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> GB-1	Oxidación de Mn ²⁺ Eliminación de especies tóxicas O ₂	(Okazaki <i>et al.</i> , 1997)
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Actividad nucleósido oxidasa	(Isono y Hoshino, 1989)
<i>Pseudomonas putida</i> GB1 (cumA)	Oxidación de Mn ²⁺	(Brouwers <i>et al.</i> , 1999)
<i>Pseudomonas</i> sp. (cumA)	Oxidación de Mn ²⁺	(Francis y Tebo, 2001)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (copA)	Resistencia al Cu ²⁺	(Cha y Cooksey, 1991)
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> (pae1888)	Desconocida	(Fitz-Gibbon <i>et al.</i> , 2002)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Resistencia a compuestos fenólicos	(Hernández-Romero <i>et al.</i> , 2005)
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (cutO)	Resistencia al Cu ²⁺	(Wiethaus <i>et al.</i> , 2006)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Desconocida	(Rosconi <i>et al.</i> , 2005)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Homeostasis del cobre Respuesta a estrés oxidativo	(Sitthisak <i>et al.</i> , 2005)
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Síntesis de fenoxacinonas Pigmentación	(Hsieh y Jones, 1995) (Jones, 2000)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Desconocida	(Machczynski <i>et al.</i> , 2004)
<i>Streptomyces griseus</i> (epoA)	Pigmentación Morfogénesis	(Endo <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptomyces ipomoea</i>	Desconocida	(Molina-Guijarro <i>et al.</i> , 2009)
<i>Streptomyces lavendulae</i>	Desconocida	(Suzuki <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptomyces psammoticus</i>	Desconocida	(Niladevi <i>et al.</i> , 2008)
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	Desconocida	(Miyazaki, 2005)
<i>Xanthomonas campestris</i> (copA)	Resistencia al Cu ²⁺	(Lee <i>et al.</i> , 1994)

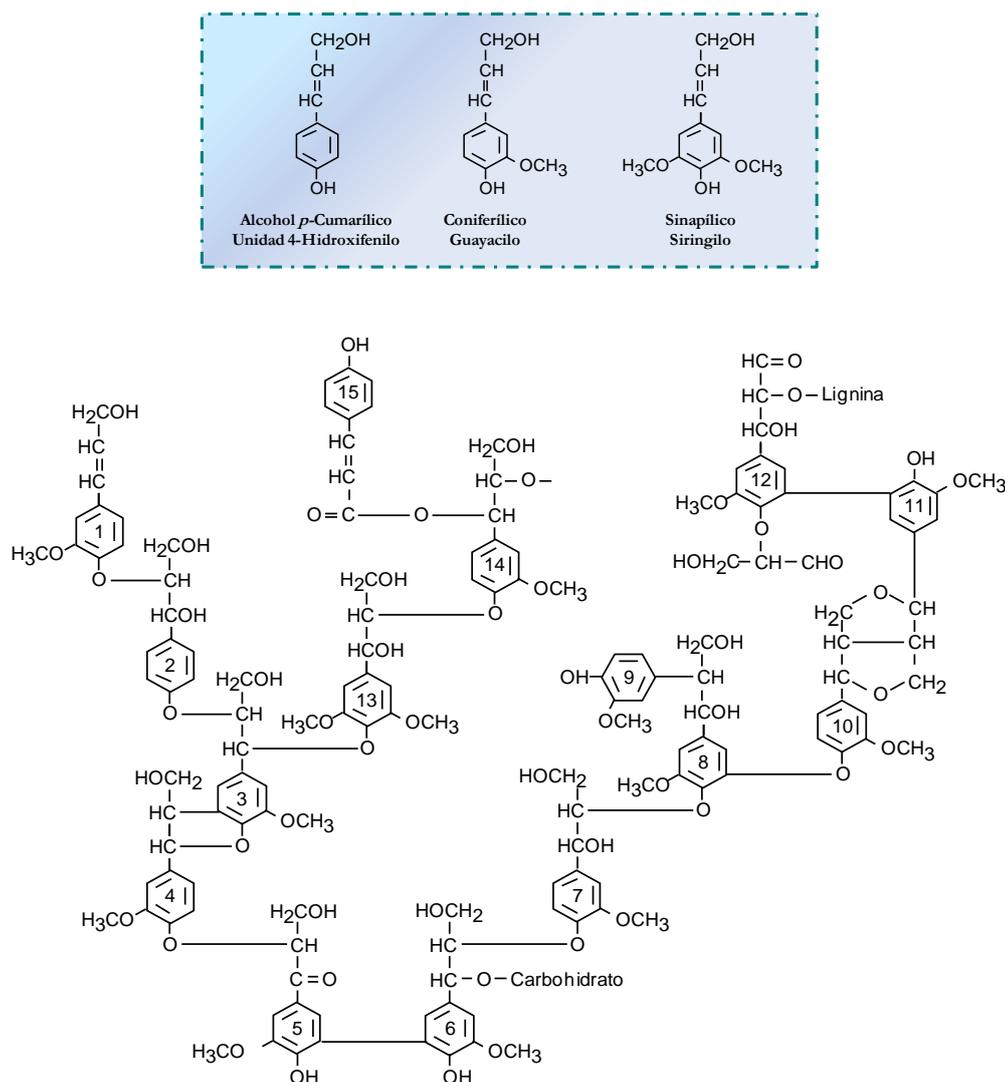


Figura 1.9. Alcoholes precursores de la lignina y modelo estructural del polímero basado en el propuesto por Adler (1977).

El tipo de unión más frecuente es el enlace de tipo aril-éter, concretamente el β -O-4, que representa entre un 40 y 60 % del total de enlaces (Nimz, 1974). Otros enlaces característicos, aunque menos abundantes son el β -5, α -O-4, 4-O-5, β - β' , β -1 y 5-5', etc.

Estudios anteriores encaminados a profundizar en el conocimiento del proceso de degradación de la lignina, permitieron llegar a la conclusión de que la complejidad estructural que presenta este polímero limita la actuación de los sistemas ligninolíticos conocidos, de los que forma parte la lacasa y, por impedimentos estéricos, ninguna de las enzimas que los componen puede penetrar en la lignocelulosa no degradada (Evans *et al.*, 1994).

Solamente algunas peroxidasa son capaces de oxidar directamente las unidades no fenólicas de la lignina (Kirk y Farrell, 1987; Martínez *et al.*, 1996).

Estos hechos desencadenaron la búsqueda de mecanismos de oxidación indirectos de las enzimas ligninolíticas, basados en la producción de agentes oxidantes de bajo peso molecular que pudieran penetrar en la lignocelulosa y fueran capaces de oxidar compuestos aromáticos de alto potencial redox. Estos agentes oxidantes incluyen radicales de metabolitos fúngicos como el alcohol veratrílico (Harvey *et al.*, 1986), iones metálicos oxidados (Mn^{3+}) (Gold *et al.*, 2000; Martínez, 2002), y radicales libres de oxígeno (RLO: superóxido, hidroxilo, y radicales peroxilo y alcóxido derivados de la peroxidación de ácidos grasos insaturados) (Hammel *et al.*, 2002).

La generación de la mayor parte de estos agentes degradativos es una consecuencia del mecanismo que utilizan las enzimas ligninolíticas para degradar la lignina, al catalizar la oxidación monovalente de los tres tipos de unidades de fenilpropano que la constituyen. De este modo se producen radicales libres que, debido a su inestabilidad, desencadenan una serie de reacciones químicas en las que se producen otros radicales intermediarios, incluidos los derivados del oxígeno, cuyas reacciones conducen a rupturas de enlaces y, por tanto, a la despolimerización de la lignina (Schoemaker, 1990). Entre los productos más abundantes que derivan de este proceso, se encuentran aldehídos y ácidos aromáticos, y quinonas, así como sus productos de reducción (alcoholes aromáticos e hidroquinonas) debido a la actuación de deshidrogenasas intracelulares y sistemas de transporte que los secretan al medio extracelular. Dada la baja especificidad de sustrato de las enzimas ligninolíticas, su acción no se limita a la lignina, sino que también oxidan algunos de sus productos de despolimerización y reducción, así como diversos metabolitos aromáticos producidos por los microorganismos. Los radicales libres producidos en estos casos, pueden actuar como agentes oxidantes o reductores dependiendo de la estructura química del compuesto del que derivan y de la de los compuestos con los que reaccionen, es decir, de sus potenciales de reducción. En el caso de que los radicales generados actúen como radicales oxidantes se propaga la actividad oxidativa de las enzimas ligninolíticas, expandiendo su rango de acción a otros compuestos, que bien por su gran tamaño y/o elevado potencial redox, no pueden ser oxidados directamente por la enzima (Baiocco *et al.*, 2003) (Figura 1.10).

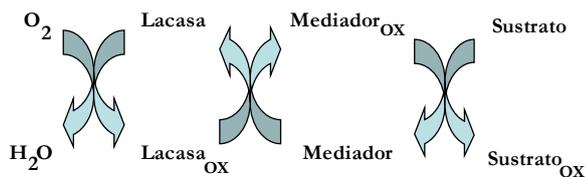


Figura 1.10. Representación esquemática de los ciclos redox catalizados por la lacasa para la oxidación de sustratos en presencia de compuestos mediadores (Bourbonnais y Paice, 1990).

Este mecanismo de acción indirecto, en el que los mediadores funcionan como transportadores difusibles de electrones entre la enzima y la lignina es el que se conoce como sistema enzima-mediador. Un mediador idóneo será aquel que tenga un tamaño relativamente pequeño, que genere radicales estables que no inactiven a la enzima y cuya reactividad permita que sea reciclado sin degradarse (Cañas y Camarero, 2010).

1.3.1. El sistema lacasa-mediador

El sistema enzima-mediador ha sido sobre todo estudiado utilizando lacasas y, como mediadores, sustratos artificiales de la enzima y compuestos fenólicos derivados de la despolimerización de la lignina. Los primeros compuestos descritos capaces de mediar de manera eficiente la oxidación por la lacasa de compuestos no fenólicos fueron sustratos artificiales de la enzima. El primero de este tipo en ser utilizado fue el 2,2'-azino[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS) (Bourbonnais y Paice, 1990). A partir de 1990, comenzaron a utilizarse otros mediadores sintéticos como el 1-hidroxibenzotriazol (HBT), el ácido violúrico (Call y Mücke, 1997), la N-hidroxiftalimida (Galli y Gentili, 2004) las fenilpirazolonas (Shleev *et al.*, 2004) y el radical de tipo nitroxilo TEMPO (2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-N-oxil) (Fabbrini *et al.*, 2002). Estos mediadores se han utilizado de manera eficiente en procesos tales como la degradación de la lignina (Srebotnik y Hammel, 2000), el bioblanqueo de pasta de papel (García *et al.*, 2003) o la decoloración de colorantes textiles (Couto y Sanromán, 2007; Claus *et al.*, 2002).

Sin embargo, debido al elevado coste y toxicidad de los mediadores de naturaleza sintética (Johannes y Majcherczyk, 2000a), los esfuerzos se han centrado últimamente en la búsqueda y selección de compuestos fenólicos derivados de la despolimerización de la lignina, que pueden ser considerados como mediadores naturales.

En este sentido, en el hongo *Picnoporus cinnabarinus* se describió la producción del ácido 3-hidroxiantranílico, cuya oxidación por la lacasa conduce a la degradación de dímeros modelo de lignina no fenólicos y a la despolimerización de

preparaciones de lignina sintética (Eggert *et al.*, 1996a). Más recientemente se ha comprobado, que varios metabolitos microbianos y productos monobencénicos generados durante la degradación de la lignina, como el ácido 4-hidroxibenzoico o el alcohol 4-hidroxibencílico, pueden actuar como mediadores en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Johannes y Majcherczyk, 2000b). Otros compuestos derivados de la degradación de la lignina, como el siringaldehído o la acetosiringona, han sido utilizados de manera eficiente en la degradación de diferentes tipos de colorantes textiles por hongos y bacterias ligninolíticas (Camarero *et al.*, 2005; Moya *et al.*, 2010). Los sistemas lacasa-mediador natural también han demostrado su eficacia en el bioblanqueo y mejora de la calidad de pastas de papel (Arias *et al.*, 2003; Camarero *et al.*, 2007; Aracri *et al.*, 2009) así como en la degradación de fungicidas (Maruyama *et al.*, 2007) y contaminantes emergentes (Marco-Urrea *et al.*, 2010b).

1.3.2. Producción de especies reducidas del oxígeno por las lacasas

Cuando las lacasas oxidan un compuesto generando un radical libre y éste se comporta como agente reductor, es frecuente que el oxígeno actúe como aceptor electrónico generándose los llamados radicales libres de oxígeno que son el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el hidropéroxilo (HO_2^{\cdot}), el hidroxilo ($\cdot OH$) y los radicales derivados de la peroxidación de lípidos (peróxido, RO_2^{\cdot} y alcóxido, RO^{\cdot}). El $O_2^{\cdot-}$ es el producto de reducción monovalente del O_2 mientras que el producto de reducción divalente del O_2 es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede generarse a partir del radical superóxido mediante la reacción de dismutación (Figura 1.11).

El radical hidroxilo es el producto de reducción del O_2 por tres electrones y es, entre los radicales libres de oxígeno, el más reactivo debido a su elevado potencial de reducción (2,8 V frente al electrodo estándar de hidrógeno), razón por la cual, es capaz de oxidar gran cantidad de compuestos orgánicos.

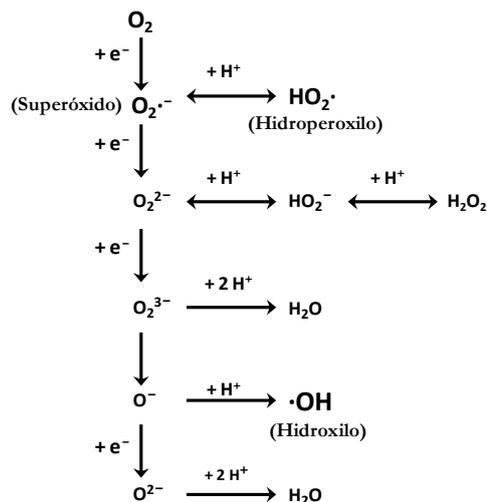
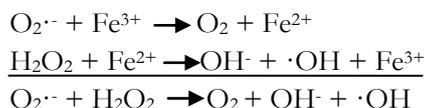


Figura 1.11. Generación de especies reactivas del oxígeno generadas durante su reducción seriada por un electrón hasta agua (adaptado de (Halliwell y Gutteridge, 1999)).

El $\cdot OH$ puede ser generado mediante la reducción del H_2O_2 por el $O_2^{\cdot-}$, catalizada por iones metálicos, como el Fe^{3+} , en la denominada reacción de Haber-Weiss:



La reducción del H_2O_2 por el Fe^{2+} , se conoce como reacción de Fenton y es uno de los mecanismos de producción de $\cdot OH$ más ampliamente distribuido entre los seres vivos. Generalmente, el $\cdot OH$ es capaz de oxidar a un compuesto por dos mecanismos diferentes (Buxton *et al.*, 1988; Legrini *et al.*, 1993): mediante la abstracción de un átomo de hidrógeno de los enlaces C-H, N-H u O-H (en el caso de alcanos y alcoholes), o mediante su adición a anillos aromáticos o a enlaces C=C, en el caso de olefinas.

Como productos finales del ataque del $\cdot OH$ a moléculas orgánicas podemos encontrar CO_2 , H_2O e iones inorgánicos en concentraciones minoritarias (Cl^- , NH_4^+ , SO_4^{2-} , etc.) que son indicativos de la mineralización de la sustancia de partida.

Existen numerosos estudios *in vitro* de producción de especies reactivas del oxígeno mediante el empleo de componentes enzimáticos del sistema ligninolítico de microorganismos implicados en la degradación de la lignocelulosa, principalmente, en los hongos de podredumbre blanca (Backa *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1999). Gracias a estos estudios, se puede afirmar que prácticamente todas las enzimas implicadas en la degradación de la lignina, incluidas las reductasas intracelulares, pueden participar en el proceso por el cual se generan estos radicales, siendo necesaria además la participación de metabolitos del microorganismo, productos de degradación de la lignocelulosa e iones metálicos presentes en ésta. Algunas de estas enzimas son la celobiosa deshidrogenasa (Mason *et al.*, 2002) y las manganeso y lignina peroxidases (Kuan y Tien, 1993; Schoemaker *et al.*, 1985). En cuanto a la lacasa, ha sido la última de las enzimas ligninolíticas que se ha relacionado con este proceso. La activación del oxígeno mediada por la lacasa, implica la oxidación de compuestos que dan lugar a los llamados radicales primarios, con un potencial redox más bajo que el de los mediadores, comportándose como agentes reductores en lugar de oxidantes. El producto de reducción del oxígeno molecular por dichos radicales, es el anión superóxido, a partir del cual tienen lugar las reacciones descritas anteriormente, hasta llegar a la producción de $\cdot\text{OH}$.

Por otro lado, se ha comprobado que el radical superóxido generado durante la oxidación de hidroquinonas por la lacasa, oxida el Mn^{2+} a Mn^{3+} (Muñoz *et al.*, 1997a). Finalmente, es importante tener en cuenta que es muy probable que las lacasas también participen en el proceso de producción de radicales peroxilo derivados de ácidos grasos poliinsaturados, ya que tanto los radicales hidroxilo como el Mn^{3+} son buenos iniciadores de la peroxidación (Halliwell y Gutteridge, 1999; Hammel *et al.*, 2002).

El conjunto de tecnologías físico-químicas que se caracterizan por la producción de radicales altamente reactivos, principalmente radicales hidroxilo, se conocen con el término de "Procesos de Oxidación Avanzada" (POA) (Glaze *et al.*, 1987). Dentro de ellos, los procedimientos que se

utilizan para producir dichos radicales pueden ser por ejemplo, la fotocatalisis heterogénea (UV/ TiO_2), el sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, la combinación de ozono con H_2O_2 o UV, el reactivo de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$), y este último combinado con UV (foto-Fenton) (Gogate y Pandit, 2004a; Gogate y Pandit, 2004b; Pignatello *et al.*, 2006). Actualmente existen excelentes trabajos de revisión sobre la eficacia de diferentes POA en la degradación de clorofenoles, fármacos, pesticidas, disruptores endocrinos, colorantes textiles, efluentes de papeleras, etc. (Bautista *et al.*, 2008; Chiron *et al.*, 2000; Esplugas *et al.*, 2007; Ikehata *et al.*, 2006; Konstantinou y Albanis, 2004; Pera-Titus *et al.*, 2004). A pesar de la efectividad de estos procesos, su uso se ve limitado a aguas contaminadas con baja carga orgánica, ya que la alta reactividad y baja selectividad de los radicales $\cdot\text{OH}$ requiere que sean producidos de manera continua en grandes cantidades, de modo que el consumo de energía y reactivos es muy elevado. Por esta razón, los POA se están investigando como pretratamiento de procesos biológicos (mucho más baratos), en cuyo caso una oxidación parcial que conduzca a la disminución de la toxicidad de los contaminantes y al aumento de su biodegradabilidad es el objetivo perseguido (Chamarro *et al.*, 2001; Gogate y Pandit, 2004b; González *et al.*, 2008; Marco *et al.*, 1997; Nadarajah *et al.*, 2002).

En el caso de los microorganismos ligninolíticos, a pesar de que los radicales hidroxilo son los agentes degradativos más potentes que pueden producir (Backa *et al.*, 1993), no existen muchos estudios en los que se haya evaluado su implicación en la degradación de contaminantes, ya que no se conocen bien los mecanismos por los que se producen, ni cómo se puede ejercer un control sobre su producción.

1.3.2.1. Ciclo redox de quinonas

Hasta la fecha se han descrito dos mecanismos de producción de $\cdot\text{OH}$ mediados por enzimas ligninolíticas. El primero se demostró con la lignina peroxidasa del hongo *Phanerochaete chrysosporium* y requiere la oxidación en cadena de dos metabolitos fúngicos para la formación del radical que reduce el O_2 a $\text{O}_2^{\cdot-}$, amén de una fuente adicional del H_2O_2 necesario para la

actuación de la enzima (Barr *et al.*, 1992). En este mecanismo, los radicales $\cdot\text{OH}$ se producen a través de una reacción de Fenton dirigida por $\text{O}_2^{\cdot-}$ (reacción de Haber-Weiss) ya que es éste el que reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} . Mucho más sencillo es el mecanismo que se describió posteriormente con la lacasa del hongo *Pleurotus eryngii*, ya que solamente requiere la presencia de una hidroquinona y Fe^{3+} (Guillén *et al.*, 2000a). En esta reacción, las semiquinonas producidas por la lacasa son los radicales primarios que reducen al O_2 , desencadenando la generación de radicales secundarios, como el $\cdot\text{OH}$, con capacidad de oxidación de la lignina y otros compuestos aromáticos. Así, tenemos un mecanismo de producción extracelular de $\cdot\text{OH}$ basado en el establecimiento de ciclos redox de quinonas, catalizados por reductasas intracelulares y por enzimas ligninolíticas (Gómez-Toribio, 2006; Guillén *et al.*, 1997). La producción de este radical es lineal y continua dado el carácter cíclico del mecanismo y requiere únicamente de la presencia conjunta en el medio extracelular de una quinona y Fe^{3+} , convenientemente quelado.

En la Figura 1.12 se muestran las reacciones que tienen lugar de manera secuencial en este ciclo hasta llegar a la producción de $\cdot\text{OH}$, tomando como quinona a la monometoxibenzoquinona (MBQ):

1) Reducción de la quinona (Q) a hidroquinona (QH_2) por una quinona reductasa intracelular (QR).

2) Oxidación de la QH_2 a semiquinona ($\text{Q}^{\cdot-}$) por la lacasa.

3) Conversión de la $\text{Q}^{\cdot-}$ en Q vía autooxidación, con la consiguiente reducción del O_2 a radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

4) Reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} por la $\text{Q}^{\cdot-}$ (4a) y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ (4b).

5) Producción de H_2O_2 vía dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$.

6) Producción de $\cdot\text{OH}$ por la reacción de Fenton.

Este mecanismo ha sido demostrado con las quinonas más representativas derivadas de las tres unidades de lignina: 1,4-benzoquinona (BQ), 2-metoxi-1,4-benzoquinona (MBQ) y 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DBQ).

La existencia de esta estrategia también ha sido comprobada en otros hongos de podredumbre blanca (Gómez-Toribio *et al.*, 2009b) productores de enzimas ligninolíticas: *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor* y *Pycnoporus cinnabarinus*. En todos ellos se puso de manifiesto la producción de radical hidroxilo, aunque los mayores niveles de producción se alcanzaron con aquellos hongos productores de lacasa.

En cuanto a la aplicación de los radicales hidroxilo generados mediante ciclo redox de quinonas a la degradación de compuestos contaminantes, hasta la fecha se ha comprobado su eficacia en la degradación del colorante textil Reactive Black 5 (Gómez-Toribio *et al.*, 2009a) en el caso de *P. eryngii*, así como en la degradación de hidrocarburos clorados (Marco-Urrea *et al.*, 2009), BTEX (Aranda *et al.*, 2010) y fármacos (Marco-Urrea *et al.*, 2010c) por *Trametes versicolor*.

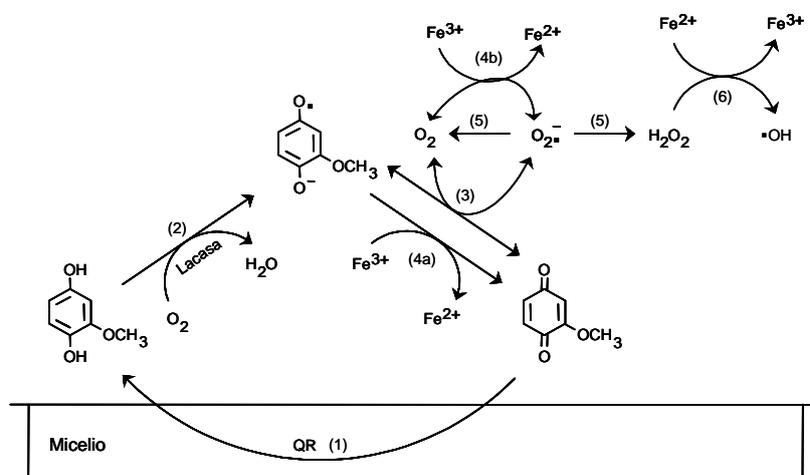


Figura 1.12. Producción de radicales hidroxilo por *Pleurotus eryngii* mediante el ciclo de la monometoxibenzoquinona.

1.4. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas

Aunque aún es escaso el número de preparaciones comerciales de lacasas disponibles para uso industrial (Tabla 1.2), cada vez existe mayor interés por la búsqueda de candidatos de este tipo de enzimas que reúnan los requisitos exigidos para su futuro desarrollo industrial. Las lacasas se han propuesto para ser aplicadas en distintos procesos industriales, entre los que cabe destacar, la fabricación de pastas de celulosa y papel, la industria textil, la síntesis orgánica, la descontaminación ambiental y farmacéutica, así como la nanobiotecnología. La consideración de estas enzimas como “ahorradoras de energía” y biodegradables, hace que los biocatalizadores basados en lacasas encajen bien con el desarrollo de industrias altamente eficientes, sostenibles y amigables con el medio ambiente.

Uno de los escollos que hay que vencer para lograr la alta aplicabilidad que las lacasas ofrecen, es disminuir el coste de producción de estas enzimas.

Hay que tener en cuenta que para algunas de sus aplicaciones, como es el caso de la biorremediación, se requieren grandes cantidades de enzima, cuyo coste podría ser reducido mediante la utilización de residuos agrícolas y/o alimentarios, o efluentes industriales derivados de distintos tipos de industrias como sustrato para los microorganismos productores. Asimismo, es importante tener en cuenta la necesidad de optimización de los procesos de producción generalmente desarrollados a escala de laboratorio, con vistas a su implementación a nivel industrial.

A continuación, se presenta un resumen amplio de las distintas aplicaciones biotecnológicas de las lacasas, insiendiendo de forma más detallada en aquella aplicación que se ha abordado en este trabajo.

1.4.1. Industria textil

El origen de la industria textil se remonta al año 1856 cuando Henry Perkin descubre de manera accidental el primer colorante sintético comercialmente exitoso, la mauveína (Wesenberg *et al.*, 2003).

Tabla 1.2. Preparaciones comerciales de lacasas disponibles para uso industrial (tomado de Osma *et al.*, 2010).

	Aplicación	Nombre comercial	Empresa
Industria alimentaria	Elaboración de cerveza	Flavourstar	Advanced Enzyme Technologies Ltd. (India)
	Mejora del color (té)	LACCASE Y120	Amano Enzyme USA Co. Ltd.
	Modificación del corcho	Suberase	Novozymes (Denmark)
Industria papelera	Bioblanqueo	Lignozym-process	Lignozym GmbH (Germany)
	Deslignificación de pasta de papel	Novozym 51003	Novozymes (Denmark)
Industria textil	Desgastado tela vaquera	Bleach Cut 3-S	Season Chemicals (China)
	Tratamiento tela vaquera	Cololacc BB	Colotex Biotechnology Co. Ltd. (Hong Kong)
	Desgastado tela vaquera	DeniLite	Novozymes (Denmark)
	Tratamiento tela vaquera	Ecostone LC10	AB Enzymes GmbH
	Tratamiento tela vaquera	IndiStar	(Germany)
	Tratamiento tela vaquera	Novoprime Base 268	Genencor Inc. (Rochester, USA)
	Desgastado tela vaquera	Primagreen Ecofade LT100	Genencor Inc. (Rochester, USA)
	Desgastado tela vaquera	ZyLite	Zytext Pvt. Ltd. (India)

Hasta esa fecha, los colorantes usados como la hematita o el ocre, poseían un origen natural. Gracias al descubrimiento en 1865 de la estructura molecular del benceno, la producción de colorantes sintéticos se vio fuertemente estimulada y desde entonces más de 100.000 colorantes han sido sintetizados en el mundo, lo que supone una producción anual de 7×10^5 T (Wong y Yu, 1999). En el año 2000, países como India, China o el este de Europa consumían unas seiscientas mil toneladas de colorantes al año (Wesenberg *et al.*, 2003). La creciente demanda de los productos textiles ha ocasionado que esta industria haya experimentado un fuerte desarrollo y por lo tanto, las aguas residuales procedentes de la misma se han visto incrementadas de manera notable, constituyendo uno de los principales problemas de contaminación ambiental hoy en día. La liberación de estos efluentes en los ecosistemas acuáticos es perjudicial, no sólo por su efecto visual o la alteración que producen los tintes textiles sobre la solubilidad de los gases, sino porque además muchos de estos colorantes pueden resultar tóxicos y/o mutagénicos para los seres vivos (Dos Santos *et al.*, 2007). Más de un 90 % de los 4000 colorantes investigados por la ETAD (*Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry*) presentaron elevadas tasas de toxicidad (Robinson *et al.*, 2001). Sin los tratamientos adecuados, los colorantes se mantienen además estables, pudiendo permanecer en los ecosistemas por largos períodos de tiempo, como es el caso del colorante Reactive Blue 19, cuya vida media es de 46 años a un pH de 7 y una temperatura de 25 °C (Hao *et al.*, 2000).

Además del problema ambiental, hay que añadir las enormes cantidades de agua, en muchas ocasiones potable, que consumen este tipo de industrias, como por ejemplo, la industria textil fina, que consume 100 litros de agua por cada Kg de materiales textiles producido (Abadulla *et al.*, 2000). Las legislaciones de los gobiernos en países desarrollados son cada vez más estrictas en lo que se refiere a la liberación de los colorantes textiles en los efluentes (Dos Santos *et al.*, 2007). Por todo ello, se hace indispensable la búsqueda de tratamientos adecuados de las aguas residuales generadas por este tipo de industria, así como la posible reutilización de las mismas.

Los colorantes poseen en su estructura molecular grupos de átomos responsables del color o cromóforos, y grupos de átomos ionizables capaces de modificar la intensidad del color del cromóforo denominados auxocromos. Entre los cromóforos más habituales encontramos los grupos vinilo (-C=C-), ciano (-CH=N-), carbonilo (-C=O-), azo (-N=N-), nitrito (-NO₂) y estructuras de tipo quinona, mientras que los auxocromos más importantes son los radicales amonio (-NH₃), carboxilo (-COOH), sulfonato (-SO₃H) e hidroxilo (-OH) (van der Zee, 2002). Los colorantes textiles pueden ser clasificados atendiendo a su origen, propiedades químicas o físicas, estructura química, etc. Si atendemos exclusivamente a la estructura química, podemos diferenciar entre 20-30 tipos de colorantes y entre los más importantes destacan los de tipo indigo, triarilmetano, heterociclo, antraquinona, ftalocianina y azo (Figura 1.13).

Durante el proceso de tintado, estos compuestos se unen fuertemente a la fibra textil mediante enlaces covalentes junto a interacciones electrostáticas. En condiciones alcalinas, los colorantes forman grupos reactivos como el vinil sulfónico que establecen enlaces con las fibras. Sin embargo, en presencia de agua estos grupos reactivos sufren hidrólisis, perdiendo la afinidad por las fibras y siendo liberados en los efluentes industriales. De esta manera, entre el 10 y el 20 % de los colorantes se pierden durante este proceso y son vertidos a los ecosistemas acuáticos (Soares *et al.*, 2001), con el consiguiente impacto ambiental. Asimismo, la gran diversidad estructural que presentan los colorantes textiles, hace que el tratamiento de los efluentes derivados de estas industrias resulte complejo y a menudo ineficaz. Otro agravante, es que están precisamente diseñados para ser química y fotolíticamente estables, lo que les confiere una alta persistencia en el medio ambiente.

1.4.1.1. Colorantes de tipo azo

Los colorantes de tipo azo representan el grupo más importante de los colorantes producidos anualmente, lo que equivale a un 70 % del total (Hao *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2007).

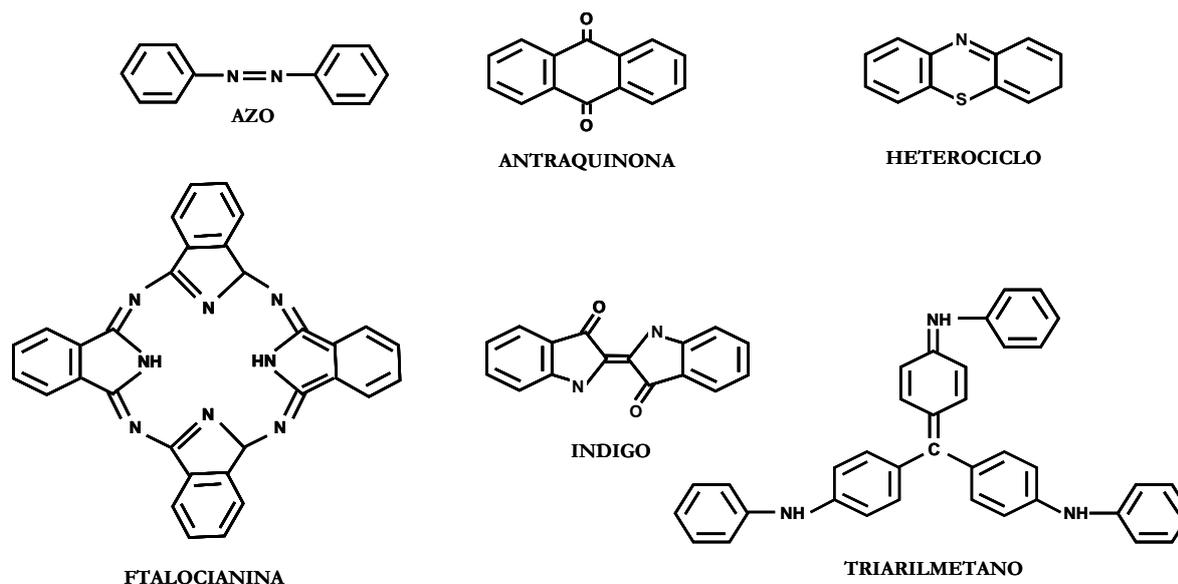


Figura 1.13. Estructuras químicas más comunes de los colorantes textiles.

Se caracterizan por presentar grupos reactivos que forman enlaces covalentes con los radicales hidroxilo (-OH), amino (-NH₂) o sulfhidrilo (-SH) en las fibras textiles (algodón, lana, seda y nylon) y se utilizan para teñir con los colores amarillo, naranja y rojo. Debido a la escasa fijación de estos colorantes a las fibras textiles, su concentración en las aguas residuales donde son vertidos se ha estimado entre 5 y 1500 ppm (Gottlieb *et al.*, 2003). La importancia de este grupo de colorantes como contaminante ambiental radica no sólo en su color, sino también en su baja biodegradabilidad y en el hecho de que en las condiciones anaerobias inherentes a los tratamientos de depuración convencional de aguas, tiene lugar la reducción del enlace tipo azo lo que da lugar a la formación de aminas aromáticas poco biodegradables y tóxicas. Muchas de estas aminas aromáticas, como la *o*-toluidina y las de tipo aminobifenil, están prohibidas ya en algunos países como Alemania, por tratarse de sustancias altamente tóxicas y considerarse potenciales carcinógenos (Tauber *et al.*, 2005). Estas aminas, en los ecosistemas acuáticos, pueden ser absorbidas por distintos organismos, acumulándose en el tejido adiposo de los peces (bioacumulación), pudiendo llegar a los seres humanos a través de la cadena alimentaria.

En los mamíferos, la activación metabólica de los colorantes de tipo azo equivale a la reducción de los mismos y se debe principalmente a la actividad bacteriana presente en las zonas anaerobias del tracto gastrointestinal. La carcinogenicidad que presentan estas aminas aromáticas se debe a que generalmente son metabolizadas a sus derivados aciloxiaminas que se unen al carbono 8 de la guanina alterando la estructura del ADN (Takahashi y Hashimoto, 2001). Asimismo, estas aciloxiaminas pueden ser convertidas a sus respectivos iones nitronio y/o carbonio que también se pueden unir al ADN o ARN, induciendo mutaciones y formación de tumores (van der Zee, 2002).

Para evitar la formación de estas aminas aromáticas se hace imprescindible la búsqueda de nuevos métodos de degradación de tipo oxidativo que resulten eficientes para el tratamiento de los efluentes que contengan colorantes de tipo azo. Este objetivo se puede alcanzar tanto a través de tecnologías fisico-químicas oxidativas o bien, por la utilización de microorganismos con alta capacidad degradativa y/o de sus sistemas enzimáticos oxidativos. En este sentido, son diversos los factores que determinan la conveniencia técnica y/o económica de escoger unas técnicas u otras: tipo de colorante y composición del efluente, dosis y coste de los reactivos requeridos, costes operacionales, así

como el destino y costes de manejo de los productos de desecho generados.

Las lacasas ofrecen una alternativa interesante para conseguir estos fines, pues su baja especificidad de sustrato les permite actuar sobre colorantes de diversa estructura, ya sea de manera directa o indirecta, a través de mediadores de oxidación. Son numerosos los estudios de degradación de colorantes textiles que emplean microorganismos (López *et al.*, 2006; Harazono y Nakamura, 2005; Chen *et al.*, 2003; Abadulla *et al.*, 2000) o sus enzimas oxidativas, como lacasas (Hao *et al.*, 2007; Chivukula y Renganathan, 1995; Rodríguez Couto, 2007; Abadulla *et al.*, 2000; Kandelbauer *et al.*, 2004) o peroxidasas (Goszczyński *et al.*, 1994) o que aplican un tratamiento biológico combinado con distintas tecnologías físico-químicas (Tauber *et al.*, 2005; Brosillon *et al.*, 2008).

Más recientemente, se ha demostrado la eficacia de los sistemas lacasa-mediador para degradar colorantes de alto potencial redox. Los primeros estudios se basaron en el empleo de mediadores sintéticos (Hu *et al.*, 2009b; Rodríguez Couto *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2001), pero debido a los inconvenientes que presentan éstos, cada vez es más frecuente la utilización de mediadores naturales en este tipo de estudios (Camarero *et al.*, 2005; Murugesan *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2007; Dubé *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2011).

Las lacasas han sido también utilizadas en la industria textil con otros fines, como la síntesis de nuevos colorantes (Setti *et al.*, 1999), la tinción *in situ* de tejidos de algodón a partir de moléculas precursoras (Hadzhiyska *et al.*, 2006), la modificación de las fibras textiles o el blanqueo de algodón con el fin de eliminar pigmentos naturales indeseables (Tzanov *et al.*, 2003). Por otro lado, existen diversas patentes acerca de la utilización de las lacasas para otros fines, tales como, la simulación del efecto desgastado en tejidos vaqueros (DeniLite®, Novozymes). Por lo general, la utilización de lacasas en estos procesos supone un ahorro no sólo energético sino también de agua, a la vez que se minimiza el consumo de reactivos químicos, en muchas ocasiones tóxicos (Rodríguez Couto y Toca-Herrera, 2006).

1.4.2. Industria papelera

En el proceso de fabricación del papel, el principal objetivo que se persigue es la separación de las fibras de celulosa del resto de la matriz lignocelulósica y, principalmente, de la lignina. Los procesos encaminados a extraer la lignina del material lignocelulósico se conocen como procesos de pasteo, que pueden ser de carácter físico y/o químico. Dentro del pasteo químico, el pasteo Kraft, que se lleva a cabo en condiciones alcalinas y empleando sulfuro sódico e hidróxido sódico para la extracción de la lignina, es el más utilizado en todo el mundo, representando las pastas Kraft un 60 % aproximadamente del total de fibras de celulosa obtenidas a partir de la materia vegetal virgen (Sixta, 2006).

Tras el proceso de pasteo, es necesario aplicar una serie de secuencias de blanqueo, con el fin de eliminar la lignina residual, lo que se traduce en un aumento de la blancura. Tradicionalmente, este blanqueo se ha llevado a cabo mediante la utilización de cloro elemental o hipoclorito. Sin embargo, como consecuencia de la reacción de estos compuestos con la lignina, se forman las llamadas cloroligninas, compuestos altamente tóxicos y bioacumulables (Rintala y Puhakka, 1994). La aplicación en los países desarrollados de normativas estrictas a este respecto, ha ocasionado que desde los años 90 se utilicen otras alternativas de blanqueo industrial, como son las secuencias totalmente libres de cloro o TCF, en las que se emplea oxígeno, ozono, peróxido de hidrógeno y/o peroxiacidos; o las secuencias libres de cloro elemental o ECF, que utilizan dióxido de cloro seguido de cualquiera de los reactivos anteriormente citados (McDonough, 1995). Sin embargo, en las secuencias ECF, las más empleadas a nivel mundial (Sixta, 2006), se puede generar una cierta cantidad de cloro elemental que a su vez puede dar lugar a la formación de compuestos tóxicos organoclorados (Reeve *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta la complejidad de los procesos que tienen lugar en la industria del papel y el uso como hemos visto en muchas ocasiones, de compuestos perjudiciales para el medio ambiente, es lógico que este sector haya considerado la utilización de las lacasas como una

herramienta biotecnológica para la mejora de sus procesos, entre los que se encuentran principalmente:

➤ Bioblanqueo

Una de las posibilidades más interesantes que aportan las lacasas a la industria papelera, es su utilización como paso previo a la etapa de blanqueo convencional, principalmente a través de los sistemas lacasa-mediador. Concretamente, se ha visto que estos sistemas en comparación con otras enzimas empleadas en el blanqueo, como las xilanasas (Beg *et al.*, 2001; Bajpai *et al.*, 2006), presentan una mayor especificidad sobre las fracciones fenólicas y no fenólicas de la lignina, disminuyendo así las pérdidas de rendimiento (Cadena, 2008). La efectividad del sistema lacasa-mediador, de naturaleza sintética o natural, para disminuir el número kappa (indicativo de la cantidad de lignina en una pasta de papel), ha sido demostrado en varios estudios (Moldes *et al.*, 2008; Ibarra *et al.*, 2006; Sigoillot *et al.*, 2005; Camarero *et al.*, 2004; Fillat y Roncero, 2010). Aunque la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo con lacasas de origen fúngico, también ha sido demostrada la utilidad de lacasas producidas por el género *Streptomyces*, como es el caso de *S. cyaneus* (Arias *et al.*, 2003) y *S. ipomoea* (Molina *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2011), para el bioblanqueo de pastas de papel a través de sistemas lacasa-mediador o LMS.

Por último, cabe resaltar la importancia de llevar a cabo estos experimentos a mayor escala, con objeto de comprobar la viabilidad de los mismos. En este sentido, ya existen empresas que comercializan productos basados en un sistema LMS para la industria papelera, como es el caso del proceso denominado Lignozym® (Call y Mücke, 1997).

➤ Modificación de las fibras

La capacidad de las lacasas para formar grupos reactivos sobre la molécula de la lignina, ha sido utilizada para modificar las fibras de la madera, con el fin de mejorar sus propiedades. Así por ejemplo, las lacasas se han utilizado para funcionalizar las fibras de lignocelulosa mejorando sus propiedades físicas o químicas, en cuanto a

hidrofobicidad, carga o adhesión (Chandra y Ragauskas, 2002; Felby *et al.*, 1997).

➤ Otras aplicaciones

Se han descrito asimismo otras aplicaciones de las lacasas en la industria papelera como por ejemplo para el control del pitch, producto constituido por extractos lipofílicos que incrementan el consumo de energía y reducen la resistencia del papel, que pueden ser eliminados por estas enzimas (Zhang *et al.*, 2002; Gutierrez *et al.*, 2007). También se ha descrito la utilización de lacasas en procesos de decoloración, utilizadas para el reciclaje de papel de periódico (Selvam *et al.*, 2005) o en el tratamiento de efluentes de la industria papelera (Widsten y Kandelbauer, 2008).

1.4.3. Industria alimentaria

Muchos de los sustratos de las lacasas, como carbohidratos, ácidos grasos insaturados, fenoles, o proteínas con grupos tiol, forman parte de los alimentos, y su modificación por estas enzimas puede conducir a una nueva funcionalidad, mejora de la calidad del alimento o reducción de costes (Minussi *et al.*, 2002).

Quizás una de las aplicaciones más importantes de las lacasas en este sector, está relacionada con la mejora o modificación del color en determinados alimentos o bebidas, mediante el empleo de las lacasas como aditivos. Dentro de las bebidas, destaca la estabilización de vino o cerveza, o el procesado de los zumos de frutas (Osma *et al.*, 2010). Los mostos y vinos están formados por una compleja mezcla de compuestos químicos, habiéndose demostrado que la extracción selectiva de polifenoles puede ayudar a mejorar las características organolépticas del vino y evitar así la aparición de turbidez, intensificación del color o alteraciones del aroma y sabor (Servili *et al.*, 2000). En el caso de la cerveza, donde también es frecuente encontrarse con fenómenos de enturbiamiento debido a la precipitación de proteínas, las lacasas han sido utilizadas tanto para la oxidación de polifenoles (Giovanelli, 1989) como para la eliminación del oxígeno residual al final del proceso de producción, alargando así la vida media del producto. En cuanto al tratamiento de los zumos de frutas, los resultados obtenidos

no siempre han sido tan beneficiosos como se esperaba, pues en algunos casos se puede perder la estabilidad del producto. Lo que sí parece claro es que los mejores resultados se obtienen combinando el tratamiento enzimático con un proceso de filtración (Giovanelli y Ravasini, 1993).

En lo que se refiere a otro tipo de alimentos, la industria panadera podría incorporar los tratamientos con lacasas en sus procesos, pues se ha comprobado que estas enzimas son capaces de mejorar las propiedades de la masa de pan y del producto ya horneado (Labat *et al.*, 2000). Selinheimo *et al.* (2006) demostraron que la lacasa de *T. hirsuta* mejoraba las características de diversos tipos de masas, principalmente por la formación de biopolímeros de ácido ferúlico y arabinosilano.

Las lacasas también pueden ser utilizadas para mejorar las propiedades sensoriales de ciertos alimentos. Así, se han utilizado para mejorar el olor y el sabor del cacao y productos derivados, para mejorar la calidad del sabor en aceites, principalmente de origen vegetal, o para mejorar el color de productos que contienen té (Osma *et al.*, 2010).

También se ha descrito la posibilidad de utilizar a las lacasas para la formación de geles a partir de pectinas en alimentos, pudiendo sustituir así a las peroxidasas que muchas veces no pueden ser utilizadas con este fin, debido a la prohibición existente en varios países de añadir peróxido de hidrógeno a los alimentos (Norsker *et al.*, 2000; Littoz y McClements, 2008).

Por último, las lacasas no sólo pueden participar en la mejora de las propiedades sensoriales de un alimento a través de los tratamientos descritos hasta ahora, sino que también pueden formar parte de un sistema de diagnóstico. En este sentido, biosensores amperométricos basados en lacasas se han desarrollado con el fin de medir, por ejemplo, la cantidad de polifenoles presentes en el té (Ghindilis *et al.*, 1992) o el vino (Montereali *et al.*, 2010; Di Fusco *et al.*, 2010).

1.4.4. Biorremediación

Las lacasas como hemos visto hasta ahora, por su baja especificidad de sustrato y la similitud

estructural de muchos compuestos contaminantes con el polímero de la lignina, pueden ser aplicadas en la degradación de numerosos compuestos generados por la industria o presentes en los ecosistemas acuáticos o terrestres.

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, las lacasas y los LMS pueden ser aplicados en el tratamiento de los efluentes derivados de las industrias textil y papelera, pero también pueden ser tratados de este modo los efluentes derivados de industrias relacionadas con el sector alimentario, como las destilerías o las fábricas de aceite. Los efluentes derivados de las destilerías en las que se fermenta caña de azúcar, contienen materia orgánica que puede ser eliminada por tratamientos convencionales, pero sin embargo, el alto contenido en compuestos cromogénicos que a veces poseen (Valdez y Obaya, 1985), resulta difícilmente degradable, existiendo la alternativa de utilizar para su eliminación microorganismos ligninolíticos y/o sus enzimas (Strong y Burgess, 2008). Por otro lado, los efluentes derivados de las fábricas de aceite, representan hoy en día un gran problema medioambiental en el área mediterránea, pues se llegan a generar 2,5 litros de efluente por cada litro de aceite producido (Osma *et al.*, 2010). El tratamiento de este tipo de residuos, que contienen una compleja mezcla de compuestos y que por lo general resultan tóxicos, se ha llevado a cabo con diversas lacasas de origen fúngico (Martirani *et al.*, 1996; d'Annibale *et al.*, 2000; Berrio *et al.*, 2007; Iamarino *et al.*, 2009).

Por último, entre los compuestos xenobióticos que pueden encontrarse en los suelos o en el agua y que pueden ser degradados por las lacasas de manera directa o indirecta, destacan: hidrocarburos aromáticos policíclicos (Durán y Esposito, 2000; Pointing, 2001; Cañas *et al.*, 2007), pesticidas (Amitai *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2007), disruptores endocrinos (Tanaka *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 2001; Sei *et al.*, 2008), clorofenoles (Iimura *et al.*, 1996; Leontievsky *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008; Gaitan *et al.*, 2011), residuos plásticos (Kunamneni *et al.*, 2008), contaminantes emergentes como el agente antibacteriano triclosan (Murugesan *et al.*, 2010) y medicamentos como el naproxeno (Marco-Urrea *et al.*, 2010a), entre otros.

1.4.5. Nanobiotecnología

La nanotecnología está contribuyendo al desarrollo de prácticamente todos los ámbitos de la actividad humana (medioambiente, economía, clínica, etc.). Un ejemplo de esta tecnología en el que se ven involucradas las lacasas, es en el desarrollo de biosensores y células de biocombustible. Un biosensor es una sonda que contiene un componente biológico incorporado y que a través de un transductor electrónico es capaz de convertir una señal bioquímica en una respuesta eléctrica cuantificable, que además nos proporciona información acerca de un cambio fisiológico o bioquímico (Kunamneni *et al.*, 2008). En el caso de los biosensores, la nanotecnología ha permitido que estos dispositivos sean más eficientes gracias al control de la deposición y la adsorción de las biomoléculas sobre diferentes tipos de sustratos. Teniendo en cuenta la capacidad de las lacasas para catalizar reacciones de transferencia de electrones sin la necesidad de cofactores, parece lógico que se hayan desarrollado biosensores basados en estas enzimas para la detección de gran variedad de compuestos, tales como, compuestos fenólicos (Kulys y Vidziunaite, 2003; Roy *et al.*, 2005), oxígeno (Gardiol *et al.*, 1996), azida (Leech y Daigle, 1998), compuestos xenobióticos como herbicidas (Sezginürk *et al.*, 2010) e incluso, morfina y codeína (Bauer *et al.*, 1999), flavonoides de plantas (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2005) o catecolaminas (Ferry y Leech, 2005).

Las lacasas pueden ser también inmovilizadas en el cátodo de células de biocombustible (Chen *et al.*, 2001; Calabrese *et al.*, 2002; Beneyton *et al.*, 2011), para proporcionar energía a sistemas de transmisión de pequeño tamaño, muy interesantes desde el punto de vista medioambiental, puesto que proporcionan una fuente de energía limpia (Rodríguez Couto y Toca Herrera, 2006). Un ejemplo de estas células de combustible aparece representado en la Figura 1.14, en la que las enzimas glucosa oxidasa y lacasa se encuentran formando parte del ánodo y el cátodo, respectivamente, a la vez que están inmovilizadas sobre la superficie de nanocables metálicos o nanotubos de carbono. Las células de combustible basadas en enzimas tienen una gran importancia

en medicina, ya que podrían ser utilizadas en numerosos dispositivos de la medicina moderna, para el suministro de medicamentos o la monitorización de una función corporal (Ivanov *et al.*, 2010).

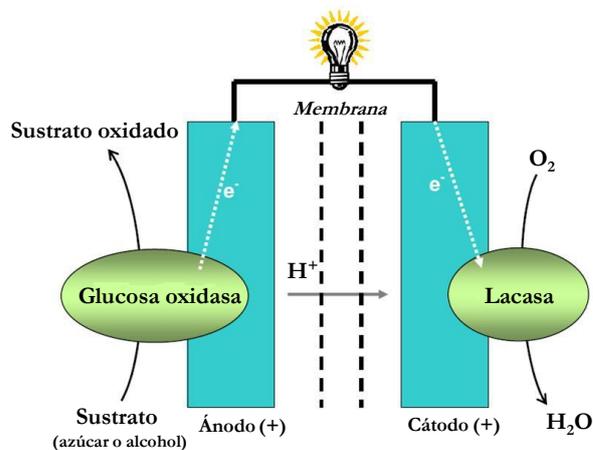


Figura 1.14. Representación esquemática de una célula de bioenergía en la que las enzimas glucosa oxidasa y lacasa participan como catalizadores (modificado de Kunamneni *et al.*, 2008).

1.4.6. Síntesis química

Otra de las aplicaciones de las lacasas en la que se está poniendo mucho interés actualmente es en la síntesis de compuestos orgánicos, tales como, polímeros complejos (Mai *et al.*, 2000; Uyama y Kobayashi, 2002), agentes terapéuticos (Mikolasch *et al.*, 2006; Xu, 2005), colorantes (Mustafa *et al.*, 2005) o péptidos (Semenov *et al.*, 1993).

1.4.7. Sector farmacéutico

El mundo de la salud y la cosmética tampoco ha sido indiferente a la incorporación de las lacasas durante la fabricación de alguno de sus productos. Así, estas enzimas pueden participar en la síntesis de compuestos de interés clínico, como anestésicos, antiinflamatorios, etc. (Nicotra *et al.*, 2004); han sido utilizadas para la generación *in situ* de yodo empleado como desinfectante (Xu, 1996b; Xu, 2005); incluso se ha descrito su capacidad para inhibir la actividad transcriptasa inversa del virus HIV-1 (Wang y Ng, 2004) o combatir la aceruloplasminemia (Harris *et al.*, 2004).

En cuanto al área de la cosmética, estas enzimas se han utilizado para la fabricación de tintes para el cabello, gracias a la oxidación de precursores como fenoles y anilinas. Los productos así obtenidos resultan menos irritantes, pudiendo reemplazarse el peróxido de hidrógeno como agente oxidante por las lacasas (Xu, 2005).

Más reciente, ha sido el desarrollo de cremas que contienen este tipo de enzimas para el aclaramiento de la piel (Rodríguez Couto y Toca Herrera, 2006).

2. Planteamiento del trabajo y objetivos

➤ Planteamiento del trabajo y objetivos:

El trabajo presentado en esta Tesis se enmarca dentro de la línea prioritaria del grupo de investigación dirigido por la Dra. M^a Enriqueta Arias Fernández, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá, que desde hace varios años se dedica al estudio de la degradación de lignocelulosa por actinobacterias, y en especial, al conocimiento de los mecanismos enzimáticos implicados y al análisis de las modificaciones químicas producidas en el sustrato, con vistas a su aplicación industrial y medioambiental.

Los trabajos anteriores realizados por este grupo han permitido la selección de distintas cepas de estreptomicetos a partir de aislados de suelos y maderas en descomposición, en función de su capacidad ligninolítica (Centenera, 1997) o de su capacidad para decolorar efluentes derivados de industrias papeleras y colorantes sintéticos (Hernández *et al.*, 1994; Hernández *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2001; Hernández-Coronado, 1999).

Entre las cepas seleccionadas de *Streptomyces*, se comprobó la capacidad de algunas de ellas para atacar oxidativamente la lignina (Hernández-Coronado *et al.*, 1997) e incluso mineralizarla (Berrocal *et al.*, 1997), cuando crecían sobre sustratos de tipo lignocelulósico en condiciones de fermentación de estado sólido (SSF). Por otro lado, se han realizado estudios encaminados a elucidar los mecanismos enzimáticos implicados en la degradación de la lignocelulosa por estas cepas, lo que ha permitido el aislamiento y la caracterización de xilanasas (López *et al.*, 1995), mananasas (Montiel *et al.*, 1999), estererasas (García *et al.*, 1998), peroxidasas (Rob *et al.*, 1997) y fenoloxidasas. Posteriormente, se ha demostrado la utilidad de estos microorganismos y/o de sus enzimas para el biopasteo de paja de trigo y maderas de diferente origen (Berrocal *et al.*, 2000; Berrocal *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2005) o el bioblanqueo de pastas de papel (Antonopoulos *et al.*, 2001; Montiel *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2003).

Entre las enzimas producidas por estos microorganismos que más interés han suscitado en los últimos años, se encuentran las lacasas. La

escasez de datos sobre lacasas bacterianas, unido al descubrimiento por nuestro grupo de la primera lacasa descrita en *Streptomyces* (Berrocal *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2003), condujo a la caracterización físico-química y molecular de la lacasa producida por la cepa *Streptomyces ipomoea* CECT 3341, de la que se ha demostrado su capacidad para decolorar y destoxificar colorantes textiles de tipo azo (Molina-Guijarro *et al.*, 2009), así como para el bioblanqueo de pastas de papel (Hernández *et al.*, 2011).

Otra de las cepas más prometedoras que están siendo objeto de estudio en nuestro laboratorio es la cepa *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. Anteriores estudios realizados con este microorganismo pusieron de manifiesto su capacidad para solubilizar y mineralizar lignocelulosa (Berrocal *et al.*, 1997), así como para llevar a cabo una degradación parcial de la lignina de paja de trigo (Berrocal *et al.*, 2000). En estos estudios, se le atribuyó un papel importante en la degradación de la lignina a la lacasa producida por este microorganismo. Posteriormente, se ha puesto de manifiesto la capacidad de esta enzima para el bioblanqueo de pastas kraft de eucalipto (Arias *et al.*, 2003; Arenas, 2004).

Dado el potencial biotecnológico que presentan las lacasas bacterianas, y la variedad de funciones atribuidas a estas enzimas, se planteó el trabajo que se presenta, cuyos objetivos se detallan a continuación:

1. Evaluar la capacidad de la lacasa de *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 para decolorar y destoxificar colorantes textiles de tipo azo, en ausencia y presencia de compuestos mediadores de oxidación.
2. Comprobar la posible implicación de la lacasa seleccionada en la producción de radicales hidroxilo mediante ciclo redox de quinonas.
3. Validar la utilidad del ciclo redox de quinonas inducido en la cepa *S. cyaneus* para decolorar y destoxificar colorantes textiles de tipo azo.

Planteamiento y Objetivos

4. Secuenciar y sobreexpresar el gen codificante de la lacasa y caracterizar físico-químicamente la enzima recombinante.

5. Analizar la función biológica desempeñada por la lacasa de *S. cyaneus*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales y métodos generales

3.1.1. Microorganismos utilizados

3.1.1.1. *Streptomyces*

Para la realización de este trabajo se utilizó la cepa de *Streptomyces cyaneus* aislada y seleccionada en nuestro laboratorio por su capacidad para producir actividad lacasa (Berrocal *et al.*, 1997). Este microorganismo se encuentra depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso 3335.

3.1.1.2. *Escherichia coli*

Se emplearon las siguientes cepas de este microorganismo:

- DH10B (Invitrogen): utilizada para obtener preparaciones de plásmidos y clonar fragmentos de ADN, debido a su deficiencia en endonucleasas y ausencia de recombinación. Genotipo: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-bsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* *nupG* λ^- .
- BL21 (DE3) (Invitrogen): utilizada para llevar a cabo la sobreexpresión de proteínas recombinantes. Genotipo: F⁻ *ompT* *hsdSB*(rB-, mB-) *gal* *dcm* (DE3).
- ET12567 (pUB307) (Flett *et al.*, 1997): cepa deficiente en Dam metilasa utilizada en los experimentos de conjugación interespecífica. Genotipo: F⁻ *dam-13::Tn9* *dcm-6* *hsdM* *hsdR* *recF143*, *zjj-201::Tn10* *ga/K2* *ga/T22* *ara14* *lacY1*, *xyf5* *leuB6* *thi1* *tonA31* *rpsL* 136 *hisG4* *tsx78*, *mtl*, *glnV44* Km^r.
- Top10 (Invitrogen): utilizada para clonar productos de amplificación obtenidos por PCR. Genotipo: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-bsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*.

3.1.2. Mantenimiento y conservación de los microorganismos

La cepa *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 se mantuvo en cultivo puro en placas de medio Bennet mediante resiembras periódicas. Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C hasta alcanzar un adecuado grado de desarrollo y esporulación del micelio (5-7 días). Para su conservación durante largos períodos de tiempo, se obtuvo una suspensión de esporas a partir de cultivos bien esporulados sobre los que se vertieron 5 ml de glicerol al 20 % (v/v). Las esporas fueron separadas de los restos de micelio mediante filtración y congeladas a -20 °C.

En cuanto a las distintas cepas de *Escherichia coli*, para su mantenimiento a corto plazo se utilizaron placas de medio LB (suplementado con antibióticos en los casos que fuera necesario), que se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Para periodos de tiempo largos se obtuvo una suspensión celular en glicerol al 20 % (v/v) que se guardó congelada a -80 °C.

3.1.3. Medios de cultivo

3.1.3.1. Medios de cultivo para *Streptomyces*

- Bennet (Locci *et al.*, 1969). Utilizado para el mantenimiento y recuperación de *Streptomyces cyaneus* así como para estudios de pigmentación y morfogénesis. Composición (g l⁻¹): glucosa, 10; peptona, 1; extracto de levadura, 1; triptona, 2; agar, 20. Se esteriliza a 115 °C durante 30 minutos.
- GAE (Glucosa – Asparagina - Extracto de levadura) (Hernández *et al.*, 1994). Utilizado para los estudios de pigmentación. Componentes:
 - Solución A (g l⁻¹): glucosa, 10; asparagina 1, extracto de levadura 0,5; agar, 20.
 - Solución B (g l⁻¹): K₂HPO₄, 0,5.
 - Solución C (g l⁻¹): MgSO₄·7H₂O, 0,99; FeSO₄·7H₂O, 0,021.

El pH de la solución A se ajusta a 7,2. Las soluciones se esterilizan por separado a 115 °C durante 30 minutos.

- MBS (Medio Basal Salino) (Crawford, 1978) modificado. Empleado como medio base para la producción del micelio utilizado en los experimentos de ciclo redox de quinonas y para los experimentos de implicación de la lacasa en la degradación de lignina y en la resistencia al cobre. Composición (g l⁻¹): KH₂PO₄, 1; Na₂HPO₄, 1,6; NaCl, 0,2; CaCl₂·2H₂O, 0,05; MgSO₄·7H₂O, 0,2. Al medio se le añadió además 1 ml l⁻¹ de una solución de oligoelementos cuya composición en g l⁻¹ es la siguiente: CuSO₄·2H₂O, 0,64; FeSO₄·7H₂O, 0,11; MnCl₂·4H₂O, 0,79; ZnSO₄·7H₂O, 0,15. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.
- MS (Soja-Manitol) (Hobbs *et al.*, 1989). Utilizado para el mantenimiento y recuperación de *Streptomyces cyaneus*, para la producción de la lacasa nativa así como para los estudios de pigmentación. Composición (g l⁻¹): harina de soja, 20; manitol, 20; agar (medio sólido), 20. Esterilizar a 115 °C durante 30 minutos.
- YEME (Extracto de levadura – Extracto de Malta) (Kieser *et al.*, 2000). Medio para la obtención de biomasa destinada a la extracción de ADN de *Streptomyces*. Composición (g l⁻¹): extracto de levadura, 3; extracto de malta, 5; bactopectona, 3; glucosa, 10; sacarosa, 340; suplemento de glicina, 5. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos. Después de esterilizar se añade un pequeño volumen de una solución estéril de MgCl₂, de forma que la concentración final sea de 5 mM.

3.1.3.2. Medios de cultivo para *E.coli*

- LB (Caldo de lisogénesis) (Bertani, 1951). Medio utilizado para el mantenimiento y propagación rutinarios de *E. coli*, tanto en el caso de las cepas portadoras de plásmidos como para la expresión de la lacasa recombinante. Composición (g l⁻¹): triptona, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 10; agar (medio sólido), 15. El pH se ajusta a 7,2 con

NaOH. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.

- SOC (Caldo súper óptimo con represión catabólica) (Hanahan, 1983). Medio utilizado para aumentar la eficacia de transformación de células competentes. Composición (g l⁻¹): triptona, 20; extracto de levadura, 5; NaCl, 0,5; KCl, 0,18; glucosa, 3,6. Esterilizar a 115 °C durante 30 minutos. Después de esterilizar se añade un pequeño volumen de una solución estéril de MgCl₂, de forma que la concentración final sea de 10 mM.

3.1.3.3. Medio de cultivo para *E. coli* y *S. cyaneus*

- MA (Medio A) (Sánchez y Braña, 1996). Medio utilizado para la recuperación de transconjugantes tras la conjugación interespecífica entre *E. coli* ET12567 y *S. cyaneus*. Composición (g l⁻¹): MOPS, 21; glucosa, 5; extracto de levadura, 0,5; extracto de carne, 0,5; casaminoácidos, 1; agar, 20. Ajustar el pH a 7 con KOH. Esterilizar a 115 °C durante 30 minutos. Después de esterilizar se añaden 10 ml l⁻¹ de una solución 1 M de MgCl₂.

3.1.3.4. Componentes específicos de los medios de cultivo

- Ampicilina
Antibiótico utilizado para la selección de bacterias portadoras de plásmidos que contienen el gen de la β-lactamasa, que confiere resistencia a este antibiótico. Se añadió al medio a una concentración final de 50 µg ml⁻¹.
- Kanamicina
Antibiótico utilizado para seleccionar bacterias portadoras de plásmidos que confieren resistencia a este antibiótico. Se añadió a una concentración final de 50 µg ml⁻¹ para medios sólidos y de 25 µg ml⁻¹ para medios líquidos.
- Apramicina
Antibiótico utilizado para seleccionar bacterias portadoras de plásmidos que confieren resistencia a este antibiótico. Se añadió a una concentración

final de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para *E. coli* y de 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para *Streptomyces*.

- Cloranfenicol

Antibiótico utilizado para seleccionar la cepa de *E. coli* ET12567. Se añadió al medio a una concentración final de 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Como disolvente se utilizó etanol absoluto.

- X-Gal

Este compuesto es degradado por la β -galactosidasa originándose un producto azulado. Numerosos plásmidos utilizados en procesos de transformación contienen el gen de esta enzima en el sitio de clonación múltiple, propiedad que se utiliza para distinguir aquellas bacterias que han incorporado un plásmido con inserto (colonias blancas) frente a las que no tienen el inserto (colonias azules).

La solución stock de X-Gal se prepara en dimetilformamida y se añade al medio a una concentración final de 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

- Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG)

Compuesto utilizado para inducir la expresión de los genes clonados en pET28a. Se añade al medio para alcanzar una concentración final de 1 mM.

3.1.4. Tampones y soluciones

3.1.4.1. Tampones generales

- Tampón acetato: acetato sódico 200 mM; ácido acético 200 mM. Mezclar volúmenes adecuados de ambos componentes para alcanzar un pH de 4,5. Empleado para el ensayo de actividad lacasa y para los ensayos de decoloración con la lacasa.
- Tampón Britton-Robinson o tampón acetato-fosfato-borato (Britton, 1952): ácido acético 100 mM; ácido fosfórico 100 mM; ácido bórico 100 mM. Mezclar volúmenes iguales de todos los componentes y ajustar el pH con NaOH en saturación. Empleado en la caracterización físico-química de la lacasa.

- Tampón fosfato I: ácido fosfórico a la concentración deseada. Ajustar con NaOH hasta alcanzar el pH deseado. Empleado en la mayoría de métodos que requieren un pH neutro o ligeramente alcalino.

- Tampón TE (Sambrook y Russell, 2001): Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 1 mM pH 8.

- Tampón PBS: Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 2 mM; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM. Ajustar el pH a 7,4 con HCl.

3.1.4.2. Tampones y soluciones utilizados en la electroforesis de proteínas

- Tampón de carrera 1x: Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS al 0,1 % (p/v).

- Tampón de carga: Tris-HCl 62 mM pH 6,8; SDS al 2 % (p/v); glicerol al 25 % (v/v); azul de bromofenol al 0,01 % (p/v). El tampón se mezcló con las muestras en una proporción 1:1.

- Tampón de carga para las distintas fracciones proteicas obtenidas durante la expresión de la proteína recombinante: Tris-HCl 80 mM pH 6,8; SDS al 2 % (p/v); glicerol al 15 % (v/v); azul de bromofenol al 0,006 % (p/v). El tampón se mezcló con las muestras en una proporción 1:1.

- Soluciones para la tinción lenta de proteínas:
 1. Solución I: isopropanol al 25 % (v/v); ácido acético al 10 % (v/v); Azul Coomassie R-250 al 0,003 % (p/v).
 2. Solución II: isopropanol al 10 % (v/v); ácido acético al 10 % (v/v); Azul Coomassie R-250 al 0,003 % (p/v).
 3. Solución III: ácido acético al 10 % (v/v); Azul Coomassie R-250 al 0,003 % (p/v).
 4. Solución IV: ácido acético al 10 % (v/v).

- Soluciones para tinción de proteínas en isoelectroenfoco:
 1. Solución de fijación: ácido tricloroacético al 20 % (v/v).

2. Solución de lavado y decoloración: metanol, ácido acético y agua en proporción 30:10:70.
3. Solución de tinción: Azul Coomassie R-250 al 0,02 % (p/v) y CuSO₄ al 0,1 % (p/v) en una solución de metanol, ácido acético y agua en proporción 30:10:70.

3.1.4.3. Tampones y soluciones utilizados en la electroforesis de ADN

- TAE 1x (Sambrook y Russell, 2001): Tris 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 1 mM pH 8. El pH final de la solución es 8,5 aproximadamente. Para su uso rutinario se preparó un stock 50x.
- Tampón de carga 5x: EDTA 100 mM pH 8; azul de bromofenol al 0,25 % (p/v); xileno cianol al 0,25 % (p/v); glicerol al 30 % (v/v).

3.1.4.4. Tampones y soluciones utilizados en la preparación de células competentes

- RF1: RbCl 100 mM; MnCl₂·4H₂O 50 mM; acetato potásico 30 mM; CaCl₂·2H₂O 10 mM; glicerol al 15 % (v/v). Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M y esterilizar por filtración.
- RF2: MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl₂·2H₂O 75 mM; glicerol al 15 % (v/v). Ajustar el pH a 6,8 con NaOH y esterilizar por filtración.

3.1.4.5. Tampones y soluciones utilizados en la extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

- Solución I: glucosa 50 mM; EDTA 10 mM pH 8; Tris-HCl 25 mM pH 8.
- Solución II: NaOH 25 mM; SDS al 1 % (p/v).
- Solución III: acetato de potasio 3 M ajustando el pH con ácido acético glacial.

3.1.4.6. Tampones y soluciones utilizadas en la hibridación de ácidos nucleicos (de acuerdo a lo indicado en el protocolo del kit "DIG DNA Labeling and Detection Kit", Roche)

- Solución de despurinización para la hibridación de Southern: HCl 0,25 N
- Solución de desnaturalización para la hibridación de Southern e hibridación de colonias (Sambrook y Russell, 2001): NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 N.
- Solución de neutralización para la hibridación de Southern (Sambrook y Russell, 2001): acetato sódico 2,34 M; ácido acético 0,66 M. Ajustar el pH de esta solución a 5,5.
- Solución de neutralización para la hibridación de colonias: Tris-HCl 0,5 M pH 7,4; NaCl 1,5 M.
- SSC 20x (Sambrook y Russell, 2001): citrato sódico 0,3 M; NaCl 3 M. Ajustar el pH a 7 con NaOH.
- Solución de prehibridación e hibridación: formamida al 50 % (p/v); reactivo de bloqueo al 1 %; N-laurilsarcosina al 0,1 % (p/v); SDS al 0,02 % (p/v).
- Soluciones para el lavado de la membrana:
 1. Solución de lavado 2x: SSC 2x; SDS al 0,1 % (p/v).
 2. Solución de lavado 0,1x: SSC 0,1x; SDS al 0,1 % (p/v).
- Tampón maleico: ácido maleico 100 mM; NaCl 150 mM. Ajustar el pH a 7,5 con NaOH.
- Tampón de lavado: tampón maleico al 97 %; Tween 20 al 3 % (v/v).
- Reactivo de bloqueo al 10 %: 10 g de reactivo de bloqueo en 100 ml de tampón maleico. El reactivo se disuelve con ayuda de calor, evitando que hierva. Después se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos.
- Solución de bloqueo 1x: tampón maleico al 90 % (v/v); reactivo de bloqueo al 10 % (v/v).

- Tampón de detección: Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM.

3.1.4.7. Tampones y soluciones utilizados en la solubilización de cuerpos de inclusión

- Solución I: EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, PMSF 0,5 mM, glicerol al 10 % (v/v), β -mercaptoetanol 1 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8.
- Solución II: Tris-HCl 100 mM pH 8 y urea 1,5 M.
- Solución III: Tris-HCl 100 mM pH 8 y urea 4,5 M.
- Solución IV: NaCl 1 M, DTE 5 mM, glicerol al 10 % (v/v) y Tris-HCl 50 mM pH 8.

3.1.5. Determinaciones analíticas

3.1.5.1. pH

Para realizar las determinaciones de pH se utilizó un pH-metro digital Thermo Orion modelo 720 A+ con un electrodo 8103sc.

3.1.5.2. Valoración de proteínas

La cantidad de proteínas presente en una muestra se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando el reactivo y el procedimiento del microensayo especificado por la casa comercial Bio-Rad (“Bio Rad Protein Assay”). Este ensayo se basa en el cambio de absorbancia de 465 a 595 nm que experimenta el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 tras reaccionar con las proteínas. Los datos de absorbancia obtenidos fueron referidos a una curva patrón realizada con albúmina sérica bovina en un intervalo de concentraciones de 0 a 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

3.1.5.3. Valoración de la actividad lacasa

3.1.5.3.1. En medio sólido

Para la detección de la actividad lacasa en medio sólido, se añadió a los medios de cultivo 1 g l⁻¹ de ABTS (2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico]). Una suspensión de esporas del

microorganismo se inoculó en forma de “spot” en el centro de las placas, que fueron incubadas a 28 °C. De este modo, se obtuvo un crecimiento delimitado de la cepa, que en el caso de producir lacasa extracelular, se rodearía de un halo de color verde.

3.1.5.3.2. En medio líquido

La valoración de la actividad lacasa extracelular se realizó según el método estándar de Werner *et al.* (1970), basado en la oxidación de ABTS. La oxidación del ABTS se monitorizó por el aumento de absorbancia a 436 nm de una mezcla de reacción que contenía ABTS 5 mM en tampón acetato 50 mM pH 4,5. Las valoraciones se realizaron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Hitachi modelo U-2001. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto. El coeficiente de extinción molar (ϵ) para el ABTS a 436 nm es de 29.300 M⁻¹ cm⁻¹.

3.1.5.3.3. Asociada a micelio

Para determinar la actividad lacasa asociada al micelio de *S. cyanus*, el micelio lavado se resuspendió en matraces de 100 ml que contenían 20 ml de tampón acetato 50 mM pH 4,5 y ABTS 5 mM. La actividad se calculó como se ha descrito en el apartado anterior. Para ello, se tomaron alícuotas de 1 ml cada minuto, durante un tiempo total de 5 minutos y se determinó la absorbancia a 436 nm. Esta actividad se expresó con respecto al peso seco del micelio.

3.1.5.4. Valoración de la actividad quinona reductasa asociada a micelio

Para determinar la actividad quinona reductasa asociada a micelio, éste se lavó y resuspendió en matraces de 100 ml que contenían 20 ml de tampón fosfato 20 mM pH 5 y benzoquinona 500 μM . Para medir la actividad se tomaron alícuotas de 1 ml cada minuto, durante un tiempo total de 5 minutos y se determinó la absorbancia a 247 nm. Para calcular la concentración de la benzoquinona, se utilizó el coeficiente de extinción molar de la

misma a 247 nm ($\epsilon_{247}=21.028 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Esta actividad se expresó con respecto al peso seco del micelio.

3.1.5.5. Producción de H_2O_2

Para calcular la cantidad de peróxido de hidrógeno que se produce en una reacción, se utilizó un método basado en la oxidación de rojo fenol por la peroxidasa de rábano (HRP) (Pick y Keisari, 1980). El rojo fenol presenta a pH básico la máxima diferencia de absorción a 610 nm respecto a su forma reducida. La reacción se realizó en tampón fosfato 100 mM pH 6 con rojo fenol al 0,01 % (p/v), 250 mU ml^{-1} de HRP y el líquido problema. Transcurridos 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió la cantidad de NaOH necesaria para llevar la mezcla de reacción a pH 12,5 (50 μl de NaOH 4 N por ml de reacción). El blanco de reacción se realizó añadiendo NaOH a la mezcla de reacción antes que la peroxidasa. El valor de absorbancia a 610 nm se transformó en concentración de H_2O_2 utilizando una curva patrón. La ecuación de la recta de regresión obtenida fue:

$$A_{610 \text{ nm}}=0,0362c \quad (r=0,99; c=\mu\text{M})$$

3.1.5.6. Reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+}

Para estimar la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} se utilizó 1,10-fenantrolina, quelante específico de la forma reducida del metal con un máximo de absorción a 510 nm (Barr *et al.*, 1992). El Fe^{3+} (FeCl_3) se añadió quelado con EDTA (100 μM) y la concentración de la 1,10-fenantrolina fue de 1,5 mM. Para calcular la concentración de Fe^{2+} se utilizó el coeficiente de extinción molar del complejo Fe^{2+} -fenantrolina a 510 nm ($\epsilon_{510}=12.110 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.1.5.7. Radical hidroxilo

La valoración del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) se realizó mediante un procedimiento basado en la producción de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) a partir de 2-desoxirribosa (Halliwell y Gutteridge, 1981). Los radicales hidroxilo al reaccionar con la 2-desoxirribosa dan

lugar a rupturas de enlaces que conducen principalmente a la producción de aldehídos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico. Para la determinación del $\cdot\text{OH}$ producido, se añadieron a 500 μl de muestra (en algunos casos fue necesario la dilución de la misma) 250 μl de ácido tricloroacético [preparado al 2,8 % (p/v) en agua] y 250 μl de ácido tiobarbitúrico [preparado al 1 % (p/v) en NaOH 50 mM]. Esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 100 °C y, una vez enfriada, se midió la absorbancia a 532 nm.

3.2. Producción y purificación de la lacasa nativa de *Streptomyces cyaneus* CECT 3335

La producción de la lacasa por *S. cyaneus* así como su posterior purificación se realizó según el protocolo descrito previamente por nuestro grupo de investigación (Arias *et al.*, 2003).

3.2.1. Producción de la enzima

La producción de la enzima se llevó a cabo en matraces de 1 l con 200 ml del medio de cultivo líquido Soja-Manitol, anteriormente descrito. Los matraces se inocularon con 2 ml de una suspensión de esporas (10^8 ufc ml^{-1}) obtenida a partir de placas esporuladas del microorganismo en agar Soja-Manitol mediante la adición de 5 ml de Tween 80 al 0,01 % (v/v) y posteriormente filtrado a través de algodón hidrófilo para retener el micelio. Los matraces se incubaron en agitación a 180 rpm y se mantuvieron a 28 °C durante 14 días. En cada uno de los matraces se valoró diariamente la actividad lacasa y las proteínas extracelulares totales.

3.2.2 Proceso de purificación de la lacasa

3.2.2.1. Precipitación con sulfato amónico

Los cultivos obtenidos tras 12 días de incubación se filtraron mediante la ayuda de una bomba de vacío con el objeto de recoger el sobrenadante libre de células. A continuación, se añadió al crudo enzimático sulfato amónico al 20 % de grado de saturación y se dejó en agitación a 4 °C durante 24 horas. Finalizado este tiempo, se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C.

Para precipitar la actividad lacasa, al sobrenadante obtenido se le añadió sulfato amónico hasta el 50% de grado de saturación procediéndose de la misma manera que en la precipitación anterior. El precipitado obtenido se guardó a -20 °C hasta su posterior utilización. El peso en gramos de sulfato amónico necesario para conseguir el grado de saturación (S_2) a partir de un grado inicial de saturación (S_1) en un litro de muestra, se calculó según la siguiente fórmula:

$$[533(S_2-S_1)]/[100-(0,3S_2)] = \text{g de sulfato amónico}$$

3.2.2.2. Cromatografía líquida de alta eficacia para proteínas (FPLC)

Para la purificación de la actividad lacasa producida por *S. cyaneus* se utilizaron dos tipos de columnas de intercambio asociadas a un sistema de FPLC (“Fast Protein Liquid Chromatography”) dotado de un controlador Programmer GP-250 Plus, dos bombas P-500 y un colector de fracciones Redifrac (Farmacia). La detección de las proteínas eluidas en la cromatografía, se realizó mediante la medida de absorbancia a 280 nm con un detector Shimadzu SPD-6A conectado al sistema.

En primer lugar se utilizó una columna de intercambio hidrofóbico “Econo-Pac Methyl” (Bio Rad). El precipitado recogido mediante la precipitación con sulfato amónico se resuspendió en la fase móvil y 2 ml del sobrenadante obtenido se aplicaron a esta columna. Como fase móvil se utilizó tampón fosfato 10 mM pH 6,8, suplementado con 1,1 M de sulfato amónico. Las proteínas se separaron mediante un gradiente lineal de 1,1 a 0 M de sulfato amónico en 15 minutos en el mismo tampón, con una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹. Se recogieron fracciones de 2 ml y en cada una de ellas se valoró la actividad lacasa y la concentración de proteínas totales.

Las fracciones en las que se detectó una mayor actividad específica (U mg⁻¹ proteína), se concentraron usando el sistema de ultrafiltración Amicon Ultra (Millipore), con un tamaño de poro de 5 kDa. La diálisis de las muestras se llevó a cabo en columnas “PD-10 Desalting Column” (GE Healthcare) con un límite de exclusión de 5

kDa. Como eluyente de esta columna se utilizó tampón fosfato 10 mM pH 6,8.

Una vez concentrada y dializada la muestra obtenida en la cromatografía de intercambio hidrofóbico, 1 ml de la misma se aplicó a una columna de intercambio aniónico “Econo-Pac High Q Cartridge” (Bio Rad). Como fase móvil se utilizó tampón fosfato 10 mM pH 6,8, a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹, y las proteínas se separaron aplicando un gradiente de 0 a 1 M de NaCl en 10 minutos en el mismo tampón. Se recogieron fracciones de 2 ml y en cada una se valoró la actividad lacasa y la concentración de proteínas totales.

Por último, una vez purificada la enzima, se llevó a cabo una caracterización parcial de la misma en cuanto a pH y temperatura óptimos de reacción, estabilidad al pH y temperatura, K_m y $V_{m\acute{a}x}$, según la metodología descrita en el apartado 3.7.

3.3. Técnicas electroforéticas aplicadas a las proteínas

3.3.1. Electroforesis analítica en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturizantes

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizó siguiendo el método tradicional (Laemmli, 1970) para geles bifásicos de acrilamida-bisacrilamida, empleando el sistema “Mini Protean II” (Bio Rad) con geles de 0,75 mm de espesor.

Los geles se prepararon a partir de una mezcla en polvo de acrilamida-bisacrilamida (en una proporción 37,5:1), disuelta en agua destilada hasta obtener una solución al 30 % (p/v). Las muestras se mezclaron con el tampón de carga en una proporción muestra:tampón de 1:1 para ser aplicadas a los geles. A continuación, se sometieron a un amperaje constante de 30 mA y a una temperatura de 4 °C. Para la desnaturización completa de las proteínas se añadió a la mezcla β -mercaptoetanol al 5 % (v/v) y se hirvió durante 10 minutos.

La composición completa de la mezcla para la formación de los geles fue la siguiente (para 10 ml de mezcla):

Componente	Volumen
Gel concentrador	
Agua desionizada	6,24 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8	2,5 ml
Acrilamida-Bisacrilamida 30 % (p/v)	1 ml
SDS 10 % (p/v)	200 µl
Persulfato amónico 10 % (p/v)	50 µl
TEMED	10 µl
Gel separador	
Agua desionizada	3,91 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml
Acrilamida-Bisacrilamida 30 % (p/v)	3,33 ml
SDS 10 % (p/v)	200 µl
Persulfato amónico 10 % (p/v)	50 µl
TEMED	10 µl

3.3.2. Revelado de los geles de poliacrilamida

3.3.2.1. Tinción de proteínas

Para la detección de proteínas en los geles de poliacrilamida se utilizó el método de tinción con Azul de Coomassie R-250 de dos modos distintos:

- Tinción rápida: empleada para verificar la presencia de una proteína de manera rápida. Para ello, los geles se sumergieron durante 30 minutos en una solución de metanol, agua y ácido acético (45:45:10) con un 0,01 % (p/v) de Azul de Coomassie R-250. A continuación, el gel se decoloró con una solución formada por los mismos componentes anteriores en la proporción 30:60:10, dejándolo en agitación suave hasta que las bandas se visualizaran claramente en el gel.
- Tinción lenta: utilizada para obtener una mayor sensibilidad y mejor definición de las bandas de proteína. Se emplearon cuatro soluciones distintas (cuya composición se describe en el apartado 3.1.4.2) con el fin de decolorar de manera progresiva el gel aumentando así la resolución. El gel permaneció unas 16 horas en la Solución I, 8 en la II, 16 en la III, y en la Solución IV el tiempo necesario para que las bandas quedaran claramente definidas.

3.3.2.2. Ensayo de actividad lacasa en los geles (zimograma)

Para la detección de actividad lacasa en los geles de poliacrilamida, el gel se aclaró dos veces con agua destilada durante tres minutos para eliminar restos de sales. A continuación, se sumergió en una solución del sustrato apropiado a una concentración de 5 mM, preparado en tampón acetato 200 mM pH 4,5. Se mantuvo en la solución hasta la aparición de manchas coloreadas indicativo de la oxidación del sustrato, que se corresponderían con las bandas de proteína con actividad lacasa.

3.3.3. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque analítico se utilizó para la determinación del punto isoeléctrico (pI) de la lacasa recombinante purificada. Se llevó a cabo en un sistema “Phast System” (Pharmacia) con geles comerciales preformados, marcadores de pI de amplio rango (3,5-9,3) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Los geles se tiñeron siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para ello, en primer lugar, el gel se sumergió durante 5 minutos en la solución de fijación para seguidamente introducirlo 2 minutos en la solución de lavado, ambos pasos a temperatura ambiente. Después se transfirió a la solución de tinción, donde se mantuvo 10 minutos y por último se destiñó en la solución de decoloración durante otros 10 minutos, transcurriendo estos dos últimos pasos a 50 °C.

3.4. Estudio del potencial oxidativo de la cepa *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, utilizando como modelo colorantes textiles de tipo azo

3.4.1. Caracterización espectrofotométrica de los colorantes

Para evaluar el potencial degradativo de la lacasa de *S. cyaneus* sobre compuestos contaminantes, se eligieron una serie de colorantes comerciales de tipo azo utilizados en la industria textil: New Coccine, Crocein Orange G, Orange II, Tropaeolin O, Chromotrope 2R, Methyl Orange, Tartrazine y Acid Yellow 17, de la casa comercial Sigma Aldrich y cuya estructura se muestra en el Anexo I.

3.4.1.1. Espectros de absorción UV/Vis

Para determinar el máximo de absorción en el rango visible de cada uno de los colorantes anteriormente mencionados, se realizaron espectros de absorción UV/Vis entre 800 y 200 nm en un espectrofotómetro Hitachi modelo U-2001. Todos los ensayos se llevaron a cabo a pH 5 en tampón fosfato 8 mM.

3.4.1.2. Cálculo de los coeficientes de extinción molar

Para calcular los coeficientes de extinción molar de los ocho colorantes se prepararon soluciones stock a una concentración de 200 μM . A partir de estas soluciones stock, se realizaron diluciones seriadas en tampón fosfato 8 mM pH 5, en un rango de concentración de 0 a 100 μM . A continuación, se midió la absorbancia de cada una de ellas a la longitud de onda de máxima absorción en el visible de cada uno de los colorantes. A partir de las ecuaciones de regresión obtenidas y según la Ley de Lambert-Beer, se calcularon los valores de los coeficientes de extinción molar de cada colorante, que coinciden con los valores de estimación lineal de dichas rectas. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

3.4.2. Decoloración de los colorantes textiles por la lacasa purificada de *Streptomyces cyaneus* y por distintos sistemas lacasa-mediador

3.4.2.1. Ensayos de decoloración con la lacasa de *S. cyaneus*

Una vez producida y purificada la enzima según el apartado 3.2, se evaluó su capacidad para decolorar los ocho colorantes de tipo azo mediante la monitorización del descenso de la absorbancia a la longitud de onda característica de cada uno de ellos a lo largo del tiempo. Las reacciones se llevaron a cabo con 400 mU ml^{-1} de enzima en tampón acetato 50 mM pH 4,5 y soluciones de colorante a una concentración final de 50 μM . La mezcla de todos los componentes se incubó a 35 °C durante 3 horas en oscuridad. La absorbancia de cada una de las reacciones se midió

a los tiempos 0 y 3 horas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y como control se prepararon reacciones con la enzima inactivada por calor. Los resultados se expresaron en concentración (μM) a partir de los coeficientes de extinción molar calculados.

3.4.2.2. Ensayos de decoloración con la lacasa de *S. cyaneus* en presencia de distintos mediadores

En estos ensayos, se evaluó la capacidad de la enzima, en presencia de diferentes mediadores de oxidación, para potenciar la actividad de la lacasa para decolorar los ocho colorantes de tipo azo, mediante la monitorización del descenso de la absorbancia a la longitud de onda característica de cada uno de ellos a lo largo del tiempo.

Como posibles mediadores se probaron 5 compuestos fenólicos relacionados con la estructura de la lignina: ácido sirínico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico), ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxiacetofenona, ácido vainílico (ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico) y acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona). Para comprobar la eficacia de estos compuestos, se añadieron distintas concentraciones de los mismos (10, 1 y 0,1 mM) a la reacción de decoloración utilizando el colorante Crocein Orange G (50 μM) en tampón acetato 50 mM pH 4,5 y 400 mU ml^{-1} de enzima. La mezcla de todos los componentes se incubó a 35 °C durante 4 horas en oscuridad. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y como control se prepararon reacciones con la enzima inactivada por calor. Los resultados se expresaron en concentración (μM) a partir de los coeficientes de extinción molar calculados.

Una vez seleccionada la acetosiringona como el mediador más efectivo, las reacciones de decoloración con los ocho colorantes textiles se llevaron a cabo por duplicado, con 400 mU ml^{-1} de enzima en tampón acetato 50 mM pH 4,5, 50 μM de colorante y 100 μM de acetosiringona. La mezcla de todos los componentes se incubó a 35 °C durante 4 horas en oscuridad. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y como control se prepararon reacciones con la enzima inactivada por calor. Los resultados se expresaron

en concentración (μM) a partir de los coeficientes de extinción molar calculados.

3.4.3. Demostración del ciclo redox de quinonas en *Streptomyces cyaneus* y su aplicación a la degradación de colorantes textiles

3.4.3.1. Producción de radical hidroxilo por la lacasa nativa purificada de *S. cyaneus*

Para demostrar la implicación de la lacasa en la producción de especies reducidas de oxígeno, se comprobó la eficacia de la lacasa nativa purificada de *S. cyaneus* para oxidar benzohidroquinona (BQH_2), metoxibenzohidroquinona (MBQH_2) y 2,6-dimetoxibenzohidroquinona (DBQH_2). La mezcla de reacción contenía 250 mU ml^{-1} de lacasa estimada frente a ABTS y $500 \mu\text{M}$ de cada una de las hidroquinonas en tampón acetato 50 mM pH 4,5. La concentración de las quinonas producidas por oxidación de las hidroquinonas por la lacasa se determinó espectrofotométricamente utilizando los siguientes coeficientes de extinción molar:

Benzoquinona: $\epsilon_{247} = 21.028 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Metoxibenzoquinona: $\epsilon_{360} = 1.252 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Dimetoxibenzoquinona: $\epsilon_{397} = 562 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Además, se calculó la cantidad de peróxido de hidrógeno producida en cada una de las reacciones y se estimó la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} y la producción de radical hidroxilo (ver apartado 3.1.5).

3.4.3.2. Producción de radical hidroxilo mediante el ciclo redox de quinonas por *S. cyaneus*

3.4.3.2.1. Determinación de las actividades quinona reductasa y lacasa asociadas al micelio de *S. cyaneus* y producción de radical hidroxilo

Para producir radical hidroxilo mediante el ciclo redox de quinonas, es necesaria la presencia de actividad quinona reductasa y lacasa asociadas al micelio. Para determinar el óptimo de producción de ambas enzimas asociadas al micelio, se utilizaron matraces de 100 ml con 40 ml de MBS suplementado con 6 g l^{-1} de extracto de levadura. Los matraces se inocularon con $40 \mu\text{l}$ de una suspensión de esporas que contenía 10^8 ufc

ml^{-1} . Los cultivos se incubaron en agitación a 150 rpm a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Diariamente se sacaron 3 matraces y de cada uno de ellos se filtró el micelio, se lavó con dos volúmenes de agua destilada y se resuspendió en matraces de 100 ml con 20 ml tampón fosfato 20 mM pH 5. La medida de las actividades quinona reductasa y lacasa se llevó a cabo según lo descrito en los apartados 3.1.5.3 y 3.1.5.4, respectivamente.

Paralelamente y para comprobar si el micelio de *S. cyaneus* en presencia de quinona puede promover la producción de radical hidroxilo, el micelio lavado se resuspendió en matraces de 100 ml con 20 ml de tampón fosfato 20 mM pH 5 y se le añadieron los componentes necesarios para que se produjese el ciclo redox de quinonas.

Así, se añadió Fe^{3+} quelado con EDTA en proporción $100:110 \mu\text{M}$ y la 2,6-DBQ $1,2 \text{ mM}$. Asimismo se añadió la 2-desoxirribosa ($2,8 \text{ mM}$) como sonda para detectar el radical hidroxilo (ver apartado 3.1.5.7).

Finalmente, una vez determinadas las actividades enzimáticas y valorada la producción de radical hidroxilo, se determinó el peso seco del micelio correspondiente a cada uno de los matraces utilizados en este experimento.

3.4.3.2.2. Optimización de la producción de radical hidroxilo mediante el ciclo redox de quinonas

Matraces de 500 ml con 100 ml de MBS suplementado con 6 g l^{-1} de extracto de levadura se inocularon con $0,5 \text{ ml}$ de una suspensión estandarizada de esporas de *S. cyaneus* mantenidas en glicerol al 20% (v/v). Estos matraces se incubaron a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ en agitación durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo, el micelio de cada uno de los matraces se lavó con dos volúmenes de agua destilada y se resuspendió en un volumen total de 25 ml de agua destilada.

Para determinar los factores que promueven la producción de radical hidroxilo, se incubó el micelio del microorganismo en tampón fosfato 50 mM pH 5 en presencia de DBQ y Fe^{3+} quelado con EDTA o Fe^{3+} quelado con oxalato y en presencia o ausencia de Mn^{2+} . En todos los casos,

Componente	Volumen (ml)		Concentración final
	Control	Problema	
Tampón fosfato 500 mM, pH 5	2	2	50 mM
2,6-DBQ 1,2 mM		8,4	500 μ M
Oxalato 60 mM-FeCl ₃ 20 mM		0,2	300 μ M-110 μ M
Colorante 1 mM	1	1	50 μ M
Micelio en agua (25 ml)	5	5	
Agua	12	3,4	

se introdujo en la mezcla de reacción 2-desoxirribosa como sonda para determinar las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y, a partir de ellas, poder estimar la cantidad de \cdot OH. Las soluciones de cloruro férrico, se prepararon justo antes de ser utilizadas. En la tabla superior, se detalla la mezcla de reacción en ml para cada una de las condiciones estudiadas.

3.4.3.3. Ensayos de degradación de los colorantes textiles de tipo azo mediante ciclo redox de quinonas

Una vez optimizado el proceso de producción de \cdot OH mediante ciclo redox de quinonas, se evaluó la eficacia de este sistema para la degradación de los colorantes seleccionados en este trabajo.

Para ello, se prepararon las reacciones de decoloración como se detalla en la tabla inferior. Los matraces control y problema se incubaron en agitación a 28 °C en oscuridad. Se recogieron muestras de 1 ml a tiempo 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8 y 24 horas, y en todas ellas se midió la absorbancia de los productos de reacción a la longitud de onda de máxima absorción de cada colorante. Los resultados se expresaron en concentración (μ M) a partir de los coeficientes de extinción molar calculados.

3.4.4. Técnicas analíticas utilizadas para el estudio de la degradación de los colorantes textiles

3.4.4.1. Análisis de toxicidad de los colorantes antes y después del proceso de decoloración

El análisis de la toxicidad (ISO/TC 147/SC 5) tanto de los colorantes control como de los decolorados mediante el sistema lacasa-acetosiringona y mediante la producción de \cdot OH a través del ciclo redox de quinonas, se llevó a cabo con el sistema Microtox®. Este sistema está basado en la disminución de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* por acción de sustancias tóxicas. Los resultados se expresan como EC₅₀, que es la concentración de agente contaminante que produce una reducción del 50 % de emisión de la luz inicial. El grado de toxicidad se expresó como (1/EC₅₀)x100.

Para realizar este análisis, es necesario en primer lugar ajustar el pH entre 7-8 a todas las muestras analizadas mediante la adición de NaOH 1 N. A las muestras (2,5 ml) se les añadió una solución comercial necesaria para el ajuste osmótico (0,25 ml) y a continuación se realizaron diluciones sucesivas con NaCl al 2% (p/v) para obtener las concentraciones recomendadas por el fabricante (AZUR Environmental). *Vibrio fischeri* se resuspendió en 1 ml de la solución adecuada manteniéndose a 4 °C.

Componente	Fe-EDTA		Fe-Oxalato		Concentración final
	-Mn	+Mn	-Mn	+Mn	
Tampón fosfato 500 mM, pH 5	2	2	2	2	50 mM
2,6-DBQ 1,2 mM	8,4	8,4	8,4	8,4	500 μ M
EDTA 22 mM-FeCl ₃ 20 mM	0,2	0,2			110 μ M-110 μ M
Oxalato 60 mM-FeCl ₃ 20 mM			0,2	0,2	300 μ M-110 μ M
Mn (II) 10 mM		0,2		0,2	100 μ M
2-desoxirribosa 140 mM	0,4	0,4	0,4	0,4	2,8 mM
Micelio en agua (25 ml)	5	5	5	5	
Agua	4	3,8	4	3,8	

Tabla 3.1. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Aplicación
5'Frag1Lac15	GTACCCGGTCACCTCGGTGGA	Obtención de sonda y del mutante <i>S. cyaneus</i> SclA-
3'Frag1Lac15	TCGTTGGGCGCCAGCGGGATC	Obtención de sonda y del mutante <i>S. cyaneus</i> SclA-
Lac15Rev2bis	GAGGGGAACAGACAACGAGA	Secuenciación <i>sclA</i>
Lac15Rev3bis	CTGTACGGCACCTACCTCGT	Secuenciación <i>sclA</i>
Lac15ext3'bis	GAGATGACGGAGGTCCAGAA	Secuenciación <i>sclA</i>
Lac15ext3' 3	TCATGTACCACTGCCACCTC	Secuenciación <i>sclA</i>
Lac15ext3' 4	CTCCTCGAACACGAGGACAT	Secuenciación <i>sclA</i>
EXP-NT	TGTCATATGTTGACCGACATCATCGAGA	Expresión heteróloga de SclA
EXP-CT	CCCGGATCCTCAGCCCGTGTGGCCCGCC	Expresión heteróloga de SclA

Símbolos: A = adenina, T = timina, G = guanina, C = citosina

A continuación, se añadieron 10 µl de la suspensión bacteriana a 0,5 ml de solución salina y se incubó durante 15 minutos. El valor inicial de absorbancia a 490 nm fue establecido por la fluorescencia inicial emitida por la bacteria antes de entrar en contacto con las diferentes diluciones de la muestra. A continuación, se mezclaron alícuotas de la suspensión de la bacteria con las distintas diluciones y se realizaron de nuevo medidas de absorbancia a los 5 y a los 15 minutos de incubación. Los análisis se llevaron a cabo por duplicado y como control se utilizó la solución de NaCl al 2%.

Para corregir la interferencia a 490 nm debida a los colorantes, se llevó a cabo la corrección de color adecuada según las indicaciones del software proporcionado por la casa comercial (MicrotoxOmni™ software).

3.4.4.2. Cromatografía líquida de alta eficacia asociada a detector de diodos (HPLC-PDA) de los colorantes control y tratados

El análisis cromatográfico por HPLC de los controles y las muestras tratadas, se llevó a cabo en una columna de fase reserva C₁₈ (Scharlau) acoplada a un HPLC Shimadzu LC-9^a asociado a un detector de diodos (PDA Waters 996). 10 µl de muestra se aplicaron a la columna y como fase móvil se utilizó agua destilada filtrada y desgasificada. Los distintos analitos se eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 100 % de acetonitrilo con un flujo de 1 ml min⁻¹. Los cromatogramas se obtuvieron mediante la realización de espectros de absorción del eluato entre 700 y 220 nm cada 3 segundos.

Para la cuantificación de los compuestos, se realizaron curvas patrón mediante la integración del área del pico cromatográfico correspondiente a concentraciones conocidas de los distintos colorantes, de acetosiringona y de DBQ. Para este fin, se utilizaron los cromatogramas correspondientes a cada una de las longitudes de onda características de cada compuesto.

3.5. Caracterización molecular de la lacasa de *S. cyaneus*

3.5.1. Plásmidos y oligonucleótidos

En la Tabla 3.1 se describen los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, indicando el nombre que les fue asignado, su secuencia en sentido 5'-3', subrayando los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, y su aplicación. Todos los oligonucleótidos proceden de la casa comercial Invitrogen.

Los plásmidos utilizados en este trabajo, así como su tamaño, hospedador y algunas de sus características principales se muestran en la Tabla 3.2.

3.5.2. Preparación de células competentes y electrocompetentes de *E. coli*

3.5.2.1. Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes a partir de la cepa DH10B de *E. coli*, se siguió el método del rubidio, que permite hacer más permeables las paredes celulares posibilitando que

Tabla 3.2. Plásmidos usados en este trabajo.

Plásmido	Tamaño	Huésped	Descripción	Fuente
pBSK+	3 Kb	<i>E. coli</i>	Amp ^R , β-gal, clonación	Stratagene
pUC19	2,7 Kb	<i>E. coli</i>	Amp ^R , β-gal, clonación	Invitrogen
pET28a(+)	5,3 Kb	<i>E. coli</i>	Kan ^R , expresión de proteínas	Novagen
pOJ216 (ermE*p)	3,8 Kb	<i>E. coli</i> <i>S. cyaneus</i>	Apra ^R , ermE*p, oriT	Este estudio
pCR [®] -Blunt	3,5 kb	<i>E. coli</i>	Kan ^R , Socin ^{TM-R} , gen <i>ωB</i> , clonación de productos de PCR	Invitrogen

Símbolos: β-gal: actividad β-galactosidasa; Amp^R: resistencia a ampicilina; Kan^R: resistencia a kanamicina; ermE*p: promotor de eritromicina; ωB: gen letal que aparece fusionado al lacZα en PCR[®]-Blunt

el ADN pueda atravesarlas con mayor facilidad. Para ello, se partió de un cultivo líquido (500 ml) en medio LB con una DO₆₀₀ entre 0,5 y 1. Dicho cultivo se traspasó a un tubo de centrifuga estéril y se enfrió en hielo durante 10 minutos. A continuación, las células se recogieron mediante centrifugación a 9.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Tras desechar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 10 ml de la solución RF1, previamente enfriada. A continuación, se añadieron 40 ml más de esta solución. Seguidamente, las células fueron incubadas en hielo durante 1 hora un mínimo de 30 minutos y hasta 8 horas. Transcurrido este tiempo, las células fueron recogidas por centrifugación a 3.500 g y 4 °C durante 10 minutos.

Posteriormente, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en unos 20 ml de la solución RF2 previamente enfriada. Se incubaron durante 30 minutos en hielo y finalmente se repartieron en alícuotas de 200 μl que se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

3.5.2.2. Preparación de células electrocompetentes

Para preparar células electrocompetentes a partir de la cepa de *E. coli* ET12567 (pUB307), se partió de un cultivo líquido (500 ml) en medio LB que contenía cloranfenicol y kanamicina a una concentración final de 25 μg ml⁻¹ y con una DO₆₀₀ entre 0,5 y 1. El caldo de cultivo se repartió en dos tubos de centrifuga de 250 ml que se centrifugaron a 9.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Tras decantar el sobrenadante, cada uno de los sedimentos se resuspendieron en 50 ml de agua destilada previamente enfriada y se centrifugaron de nuevo a 3.500 g durante 10 minutos. En el siguiente paso, el sedimento se resuspendió en 25

ml de agua destilada y se centrifugó de igual modo. Seguidamente, las células se resuspendieron en 8 ml de glicerol al 10 % (v/v) enfriado previamente y se recogieron por centrifugación en las mismas condiciones. Finalmente, las células se resuspendieron en 3-5 ml de glicerol al 10 % (v/v), dependiendo del tamaño del sedimento obtenido y se repartieron en alícuotas de 60 μl que se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

3.5.3. Manipulación de las muestras de ADN

3.5.3.1. Extracción de ADN

3.5.3.1.1. ADN cromosómico de *Streptomyces*

Se partió de un cultivo de la cepa en 20 ml de medio YEME, previamente inoculado con una suspensión de esporas e incubado durante 48 horas a 28 °C y en agitación a 180 rpm. El micelio se recogió por centrifugación a 4.000 g durante 10 minutos y a continuación se resuspendió en una solución que contenía EDTA 10 mM pH 8 y sacarosa al 10 % (p/v), centrifugando después en las mismas condiciones y volviendo a lavar con la misma solución. El micelio así obtenido se puede guardar congelado a -20 °C hasta su posterior utilización.

Para continuar el proceso, el micelio se resuspendió en 1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 y sacarosa al 25 % (p/v). A esta muestra se le añadieron 200 μl de lisozima (20 mg ml⁻¹ en Tris-HCl 50 mM pH 8) y se incubó a 37 °C durante al menos 30 minutos. Tras este tiempo, se adicionaron 400 μl de EDTA 250 mM pH 8 en agitación y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, añadiendo a continuación 160 μl de SDS al 10 % (p/v) con agitación

vigorosa. El siguiente paso consistió en añadir 20 µl de pronasa (10 mg ml⁻¹ en Tris-HCl 25 mM pH 8, incubada previamente a 37 °C durante 60 minutos) e incubar la muestra a 37 °C durante 30 minutos con agitación suave. Seguidamente, se añadieron 2 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8, y se llevó a cabo una extracción con 4 ml de fenol saturado con tampón TE, agitando suavemente por inversión unas 30 veces y centrifugando a 4.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante acuoso se transfirió a un nuevo tubo y se repitió la extracción. El nuevo sobrenadante fue sometido a un proceso de extracción con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) en las mismas condiciones de agitación y centrifugación. A la fase acuosa obtenida, se le adicionaron 0,1 volúmenes de etanol absoluto enfriado a -20 °C y se mantuvo a temperatura ambiente durante un periodo de 10 a 20 minutos. El cromosoma precipitado se transfirió a un nuevo tubo con ayuda de una micropipeta y se dejó secar brevemente antes de disolverlo en 2 ml de tampón TE. A continuación se añadieron 50 µl de ribonucleasa A (10 mg ml⁻¹ en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM) y la mezcla se incubó a 30 °C durante 60 minutos con agitación suave. Tras este tiempo, se añadieron 10 µl de pronasa y se incubó otra hora a 37 °C. Se añadieron 2 ml de fenol:cloroformo (1:1), se mezcló bien por inversión y se centrifugó nuevamente a 4.000 g durante 10 minutos. Esta extracción se repitió y a la fase acuosa obtenida se añadieron 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 7,5 y 2 volúmenes de etanol absoluto enfriado a -20 °C, dejando la mezcla en reposo 20 minutos para que precipite el ADN. Finalmente, el cromosoma obtenido fue transferido a un tubo estéril donde se dejó secar y a continuación se disolvió en 1 ml de tampón TE y se guardó congelado a -20 °C.

3.5.3.1.2. ADN plasmídico de *E. coli*

La obtención de preparaciones de plásmidos de *E. coli* se llevó a cabo utilizando dos kits basados en el método de la lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Para la obtención de preparaciones de plásmidos de gran pureza se utilizaron los siguientes kits: “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche), para el aislamiento a pequeña escala y

“Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purifications System” (Promega), para una extracción a mayor escala.

Por otro lado, para la obtención de un gran número de preparaciones de plásmidos con objeto de realizar comprobaciones rutinarias se aplicó el siguiente protocolo: a partir de un cultivo de la cepa de *E. coli* portadora del plásmido de interés en medio LB e incubado durante una noche, se tomaron 1,5 ml y se centrifugaron a 13.000 g durante 1 minuto. A continuación, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 µl de solución I. Seguidamente, se añadieron 200 µl de solución II, mezclando suavemente por inversión del tubo unas 10 a 15 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron rápidamente 150 µl de solución III y se mezcló por inversión unas 10 a 20 veces. A continuación, el sobrenadante se separó de los restos celulares por centrifugación a 13.000 g durante 10 minutos y se pasó a tubos estériles nuevos. Seguidamente, se añadieron 600 µl de isopropanol y se mezcló de nuevo por inversión. La muestra se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones anteriormente descritas y se retiró el sobrenadante por decantación. A continuación, se añadieron 150 µl de etanol al 70 % y la muestra se centrifugó de nuevo a 13.000 g durante 2 minutos. Por último, la muestra se dejó secar al aire y el precipitado obtenido se resuspendió en 50 µl de tampón TE. Las muestras se guardaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

3.5.3.2. Amplificaciones de ADN mediante PCR

La reacción de amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) se llevó a cabo con Fidelity™ PCR Master Mix (2x) (usb) en el caso de amplificaciones rutinarias y con la enzima “Platinum® Pfx DNA Polymerase” (Invitrogen) para las amplificaciones destinadas a la sobreexpresión del gen así como a la obtención del mutante *S. cyaneus* SclA⁻. Esta última polimerasa, se caracteriza por tener una temperatura óptima de reacción de 68 °C y por dar lugar a productos de PCR de extremos romos.

La mezcla de reacción se preparó rutinariamente en un volumen de 100 μl añadiendo los componentes a las concentraciones indicadas por los fabricantes. En el caso de Fidelity™ PCR Master Mix a la mezcla (50 unidades ml^{-1} de “Fidelity DNA Polymerase”, MgCl_2 3 mM, KCl 100 mM, dNTPs 0,4 mM) diluida a la mitad, se le añadieron el resto de componentes, cuyas concentraciones finales fueron: dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % (v/v), oligonucleótidos 1 μM y una cantidad apropiada de ADN molde. En cuanto a la enzima “Platinum® Pfx DNA Polymerase”, la mezcla de reacción se preparó de igual modo en un volumen de 100 μl diluyendo 10 veces el tampón comercial 10x y añadiendo el resto de los componentes, cuyas concentraciones finales fueron: dNTPs 0,3 μM cada uno, MgSO_4 1 mM, oligonucleótidos 1 mM, DMSO al 10 % (v/v), una cantidad apropiada de ADN molde y 1 unidad de polimerasa.

Las condiciones generales de la PCR fueron: un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 10 minutos; 30 ciclos en los que se repitió la siguiente secuencia: desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, anillamiento de los cebadores a la temperatura adecuada durante 1 minuto, polimerización a 72 °C (68 °C en el caso de Pfx) durante 2 minutos; y por último la reacción se concluyó con una polimerización a 72 ó 68 °C durante 12 minutos.

Los productos de amplificación se purificaron mediante el kit “High Pure PCR Product Purification Kit” de Roche.

3.5.3.3. Electroforesis de fragmentos de ADN

La separación de fragmentos de ADN en función de su masa molecular se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa.

Para ello, se prepararon geles al 0,8 % (p/v) en tampón TAE 1x, desarrollando la electroforesis en horizontal en el mismo tampón. De manera rutinaria, se utilizó un sistema compacto Mupid-2® (Cosmo Bio Co.) en carreras de unos 30 minutos a 100 V. Para analizar el ADN cromosómico mediante hibridación en Southern se prepararon geles de mayor tamaño y se utilizó la cubeta “Gel-o-Submarine Electrophoresis

Systems” (Jordan Scientific Co.) desarrollando la electroforesis durante una noche a 20 V. En ambos casos las muestras se mezclaron con tampón de carga (5x) y el tamaño de los fragmentos analizados se comparó con patrones de ADN de masa molecular conocida (“Molecular Weight Marker II”, Roche y “Lambda DNA/ PstI Marker”, Fermentas).

Para la tinción de los geles se empleó una solución de bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en TAE 1x) que tras unos 15 minutos permitió la visualización de las bandas en un transiluminador de luz UV.

Cuando se quiso recuperar un fragmento específico de ADN a partir de los geles se utilizó el kit “GFX-PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare).

3.5.3.4. Digestión enzimática de muestras de ADN

La digestión de las muestras de ADN con enzimas de restricción se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial Roche. Cuando la digestión se llevó a cabo con dos enzimas se utilizó el tampón más eficiente para ambas. En el caso de no existir un tampón compatible, la digestión se realizó en dos pasos con una precipitación entre ambos. En todos los casos, las enzimas se diluyeron al menos 20 veces.

3.5.3.5. Ligación de fragmentos de ADN

La unión de fragmentos de ADN a vectores plasmídicos fue llevada a cabo usando la enzima ADN ligasa procedente del bacteriófago T₄ (“T₄ DNA Ligase”, Roche). La mezcla de reacción se preparó en 20 μl , añadiendo el vector, previamente digerido, y el inserto en una proporción 1:2 (habitualmente se emplearon 20 y 40 ng respectivamente). Se adicionó también una unidad de ligasa junto con el tampón comercial y se incubó la reacción a 16 °C durante una noche.

3.5.3.6. Desfosforilación de extremos 5' de ADN

Con el fin de evitar que los vectores religaran una vez digeridos con la enzima correspondiente, se eliminó el grupo fosfato del extremo 5' de la cadena de ADN. Para ello se llevó a cabo una

reacción catalizada por una unidad de enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP, Roche), en su tampón correspondiente (Tris-HCl 50 mM pH 8, Na₂EDTA 0,1 mM) mediante incubación a 37 °C durante 1 hora.

3.5.4. Hibridación de ácidos nucleicos

3.5.4.1. Marcaje de sondas de ADN con DIG dUTP

Para el marcaje del ADN se utilizó el kit “DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche). Según este procedimiento, un fragmento específico de ADN desnaturizado se utiliza como molde para la síntesis de hebras complementarias por parte del fragmento Klenow de la ADN polimerasa, en presencia de cebadores que hibridan al azar con el ADN molde y añadiendo a la mezcla de dNTPs, DIG-11-dUTP (desoxiuridina trifosfato unida a digoxigenina). Éste es incorporado cada 20-25 nucleótidos en el ADN sintetizado. Las sondas fueron marcadas durante 1-20 horas a 37 °C. En un volumen de 20 µl se marcaron de 10 ng a 3 µg de ADN en presencia de 2 µl de la mezcla 10x de hexanucleótidos, 2 µl de la mezcla 10x de dNTPs que contiene el DIG-dUTP y 2 unidades de polimerasa Klenow. La reacción de marcado se detuvo adicionando a la mezcla 2 µl de EDTA 0,2 M pH 8. El ADN marcado se precipitó añadiendo 2 µl de LiCl 4 M y 60 µl de etanol absoluto, manteniendo la reacción a -70 °C durante 30 minutos. Tras centrifugar en frío durante 15 minutos, el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70 % y se dejó secar. Por último, el ADN marcado se resuspendió en tampón TE y se mantuvo a -20 °C hasta su utilización.

3.5.4.2. Detección de ADN con sondas marcadas.

La detección de secuencias específicas de ADN mediante el empleo de sondas marcadas con DIG dUTP es un proceso que consta de 4 etapas: 1) transferencia del ADN a una membrana de nylon, 2) prehibridación de la membrana, 3) hibridación con la sonda marcada y 4) detección de positivos mediante el uso de un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina.

3.5.4.2.1. Transferencia de ADN a membranas de nylon

La disposición del ADN de partida determina el requerimiento de distintos métodos de transferencia, por lo que podemos distinguir:

- Hibridación de colonias

Esta técnica se utilizó para analizar un gran número de colonias de *E. coli* resultantes de un proceso de transformación, cuando se trataba de clonar algún fragmento. Para ello, las colonias se transfirieron sobre una membrana circular cuadrículada de nylon “Nytran Supercharge” de 82 mm de diámetro (Scheleicher & Schuell) situada en una placa petri con medio LB y los antibióticos adecuados. En paralelo y manteniendo el mismo orden, las colonias se repicaron sobre otra placa utilizada como placa madre, para poder recuperar posteriormente algunos de los clones que resultasen positivos.

Tras la incubación a 37 °C, las placas madre se guardaron a 4 °C y se procedió al tratamiento de las membranas. Así, éstas se colocaron con las colonias hacia arriba sobre papel Whatman 3MM humedecido en solución de desnaturización, de manera que la membrana se empapase en dicha solución, y se incubó durante 3 minutos, repitiendo el proceso sobre un nuevo papel. A continuación, se transfirieron a un nuevo papel Whatman humedecido en solución de neutralización y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, repitiendo también este paso. Seguidamente, se enjuagaron en tampón SSC 2x y se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel de filtro. Una vez secos, se realizó la fijación del ADN mediante la incubación de los filtros a 80 °C durante 2 horas.

- Hibridación de Southern

Está técnica está basada en la transferencia de ADN desnaturizado desde un gel de agarosa a una membrana de nylon (Southern, 1975). Para ello, en primer lugar, el ADN cromosómico que se quería analizar fue digerido con la endonucleasa de restricción adecuada y cargado en un gel preparativo de agarosa al 0,7 % (p/v). Tras la

electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió junto a una regla para identificar posteriormente la masa molecular de las bandas positivas.

A continuación, el gel fue sometido a una serie de tratamientos que, en todos los casos, fueron efectuados con agitación suave a temperatura ambiente. De este modo, el gel se incubó en primer lugar durante 3 minutos en 200 ml de solución de despurinización. Transcurrido este tiempo, el gel se enjuagó dos veces en agua destilada antes de pasar a ser incubado en 200 ml de solución de desnaturalización durante 15 minutos, repitiendo este paso con solución fresca. Seguidamente, el gel se enjuagó en agua destilada y después se incubó en 200 ml de solución de neutralización durante 30 minutos. Finalmente, el gel se enjuagó una vez más en agua destilada y se mantuvo en SSC 2x antes de iniciar la transferencia.

Para llevar a cabo la transferencia, se preparó un recipiente que contenía tampón SSC 2x. Sobre este recipiente, se colocó un cristal sobre el que se dispusieron tres piezas de papel Whatman 3MM, previamente humedecidas con SSC 2x, quedando ambos extremos del papel sumergidos en el tampón del recipiente. A continuación, se colocó el gel sobre el papel, evitando la formación de burbujas entre ambos. Posteriormente, y evitando la formación de burbujas, se situó sobre el gel un fragmento de membrana de nylon Hybond-N+® (GE Healthcare), previamente sumergida en agua Milli Q® y tampón SSC 2x y de un tamaño ligeramente superior al del gel. Seguidamente, sobre el filtro de nylon, se depositaron, una a una, tres piezas de papel Whatman del mismo tamaño que la membrana humedecidas en SSC 2x. Por último, se depositaron servilletas de papel secas, para forzar la ascensión del tampón por capilaridad, colocando sobre ellas un peso de unos 500 g y sustituyendo periódicamente las humedecidas por secas.

Una vez transcurrida la transferencia a lo largo de toda la noche, se recuperó la membrana y se marcó sobre ella el contorno del gel. A continuación, se lavó en agitación durante 10 minutos en 200 ml de tampón SSC 2x y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se

realizó la fijación del ADN de igual modo al descrito en el punto anterior.

3.5.4.2.2. Prehibridación de la membrana

Tras la fijación del ADN, las membranas se humedecieron en tampón SSC 2x y se incubaron en la solución de prehibridación comercial “Dig Easy Hyb” de Roche a 42 °C durante al menos 2 horas en un horno de hibridación (Hybridisation Oven/Shaker SI 20H, Stuart Scientific). En este paso se utilizaron 200 µl de solución por cada cm² de membrana.

3.5.4.2.3. Hibridación de la membrana con la sonda marcada

Una vez marcada la sonda (ver apartado 3.5.4.1) ésta se desnaturalizó hirviéndola 10 minutos y enfriándola rápidamente en hielo. A continuación, se añadieron de 5 a 25 ng de la misma a la solución de hibridación que a su vez se añadió a la membrana, empleando en esta ocasión 40 µl de solución por cm² de membrana. La incubación se llevó a cabo a 42 °C durante toda la noche en el mismo horno que el usado para la prehibridación. Tras la incubación, la membrana se lavó a temperatura ambiente dos veces durante 5 minutos con la solución de lavado 2x y dos veces durante 15 minutos con la solución de lavado 0,1x.

3.5.4.2.4. Detección con fosfatasa alcalina

Este procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del protocolo correspondiente al “DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche). Todas las incubaciones y lavados descritos a continuación fueron efectuados en agitación a temperatura ambiente.

Una vez lavado el filtro para eliminar el exceso de sonda, la membrana se sumergió durante 1 a 5 minutos en 100 ml de tampón de lavado. A continuación, se incubó durante 30 minutos en 100 ml de la solución de bloqueo 1x.

El siguiente paso consistió en la incubación durante 30 minutos con agitación vigorosa en 50 ml de solución de bloqueo 1x a la que se habían añadido 10 µl (dilución 1:5000) de anticuerpo anti-

DIG-AP (anticuerpo policlonal ovino antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina). Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó dos veces durante 15 minutos en 100 ml de tampón de lavado para eliminar el anticuerpo no unido a la sonda marcada y se equilibró durante 2 a 5 minutos en 20 ml de tampón de detección.

Finalmente, la membrana se incubó en oscuridad en una bolsa de plástico sellada que contenía la solución de desarrollo de color (200 µl de la solución de NBT/BCIP del kit en 10 ml de tampón de detección). Como consecuencia de la reacción enzimática, se formó un compuesto de color violeta unido a la sonda ligada a la secuencia de ADN complementaria. Cuando el precipitado coloreado alcanzó la intensidad deseada, la reacción se detuvo lavando la membrana con agua Milli Q®.

3.5.5. Transformación de *E. coli* con ADN plasmídico

3.5.5.1. Transformación por choque térmico

La transformación de células competentes de *E. coli* DH10B con un ADN plasmídico exógeno, se realizó mediante el método del choque térmico (Hanahan, 1983). A una alícuota de células descongelada y mantenida en hielo, se le añadieron de 1 a 10 ng del plásmido.

La preparación obtenida se mantuvo en hielo durante 30 minutos. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico consistente en introducir el tubo eppendorf durante 1 minuto en un baño a 42 °C. Tras la transformación, las células se recuperaron añadiendo 1 ml de medio líquido SOC sin antibiótico e incubándolas durante 1 hora a 37 °C y 150 rpm para permitir el reinicio de la actividad metabólica y la expresión del carácter de resistencia al antibiótico. Finalmente, las células se sembraron en placas de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado.

3.5.5.2. Transformación por electroporación

Esta técnica se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* ET12567 utilizada en los experimentos de conjugación. Para ello se mezclaron 60 µl de

células electrocompetentes con 1 µg de ADN plasmídico.

La mezcla obtenida se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de ancho, previamente enfriada en hielo y la electroporación se llevó a cabo en un electroporador Micropulser™ de Biorad.

Tras el choque eléctrico, las células fueron recuperadas rápidamente en 1 ml de LB sin antibiótico e incubadas durante 1 hora a 37 °C y 200 rpm. Finalmente, las células fueron sembradas en placas de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado.

3.5.6. Conjugación

El proceso de conjugación intergenérica llevado a cabo entre *E. coli* y *S. cyaneus* fue esencialmente el descrito por Mazodier *et al.* (1989).

Para que el proceso de conjugación tenga lugar es necesario disponer de plásmidos bifuncionales que sean transferidos desde *E. coli* a *Streptomyces*. Tras la selección con el antibiótico adecuado y con ácido nalidíxico (que permite seleccionar los transconjugantes, al impedir la síntesis de ADN en *E. coli*) se obtienen colonias de *Streptomyces* portadoras del plásmido. El proceso de conjugación utilizado (Figura 3.1) presenta algunas modificaciones ya que se utilizaron como células donadoras *E. coli* ET12567 (pUB307) (Bennett *et al.*, 1977; Flett *et al.*, 1997) y el vector utilizado fue el plásmido bifuncional pOJ260 que contiene un *oriT* y al que se ha añadido el promotor de la eritromicina (*ermE**p). Este plásmido fue cedido por el Dr. Carlos Olano (Universidad de Oviedo).

Una vez transformadas las células ET12567 (pUB307) mediante electroporación con el plásmido bifuncional con el fragmento clonado, se seleccionaron colonias aisladas que fueron incubadas durante una noche en 5 ml de medio LB. Este medio fue suplementado con cloranfenicol (antibiótico utilizado para mantener la selección del transposón Tn9 insertado en el gen *dam*), kanamicina (para mantener la selección del vector pUB307, que porta los genes de transferencia *tra* para la formación del puente de conjugación) y el antibiótico para el que confiere resistencia el plásmido del *oriT*.

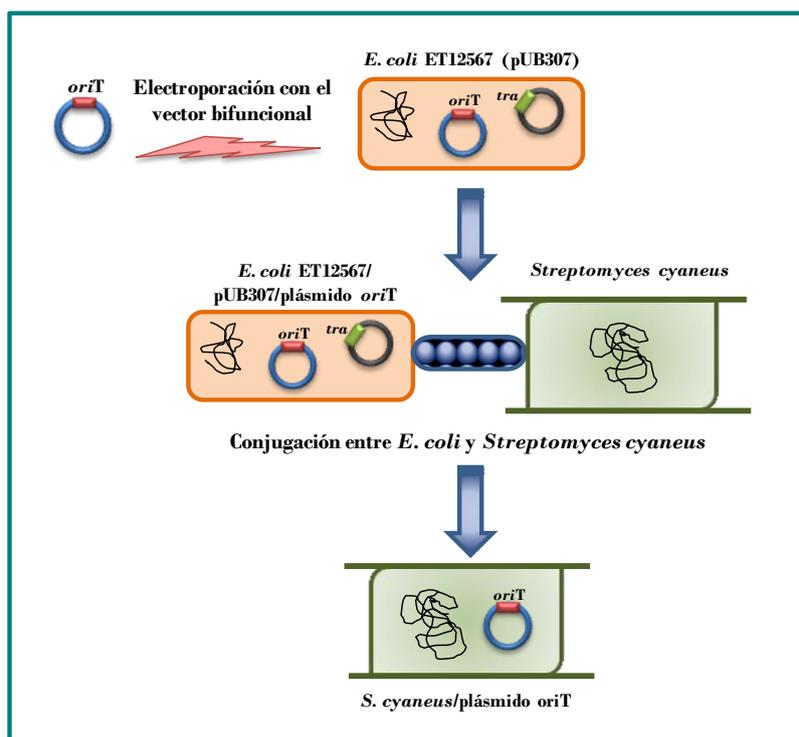


Figura 3.1. Representación esquemática del proceso de conjugación intergenérica entre *S. cyaneus* y *E. coli* ET12567 (pUB307)

A continuación, se tomó 1 ml de cultivo y las células recogidas por centrifugación se lavaron dos veces con medio LB sin antibiótico para finalmente ser resuspendidas en 100 μ l de medio LB. Por otro lado, 50 μ l de una suspensión de esporas de *S. cyaneus* conteniendo 10^8 ufc ml^{-1} se sometieron a un choque térmico a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos con el fin de estimular la germinación. Finalmente, la suspensión de esporas de *S. cyaneus* se añadió a las células de *E. coli* y la mezcla se sembró en placas de medio A, las cuales fueron incubadas a 28 $^{\circ}\text{C}$ durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, cada placa fue recubierta con ácido nalidíxico (500 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y el antibiótico de selección del vector. Las placas se incubaron durante al menos 5 días hasta la aparición de los transconjugantes.

3.5.7. Clonación del gen *sclA*

En la Figura 3.2 se muestra una representación esquemática de los pasos seguidos para la clonación y secuenciación de *sclA*. En primer lugar, teniendo en cuenta que parte de la secuencia del gen *sclA* era conocida (N $^{\circ}$ acceso GenBank: EF507879.1) se diseñaron dos oligonucleótidos

basados en el inicio y final de dicha secuencia con los que se obtuvo un producto de amplificación a partir del ADN cromosómico de *S. cyaneus*.

El producto de PCR se marcó con digoxigenina y se utilizó como sonda frente al ADN cromosómico de *S. cyaneus*, digerido previamente con distintas enzimas de restricción. Gracias al análisis de hibridación de Southern se localizó un fragmento cromosómico que contenía la secuencia utilizada como sonda. Este fragmento se purificó a partir de un gel de agarosa preparativo y se ligó con el plásmido pBSK. Tras transformar células competentes de *E. coli* DH10B con la mezcla de ligación, se sembraron las células en placas de LB con ampicilina y X-Gal, de modo que las colonias blancas obtenidas se analizaron mediante hibridación en placa para identificar un clon positivo portador de pBSK-*SclA*. El plásmido pBSK-*SclA*, con un fragmento de unas 7 kb *SacI/SacI*, se digirió con varias enzimas de restricción y se analizó por hibridación de Southern con el fin de localizar un fragmento de menor tamaño portador de la secuencia positiva. Se obtuvo así el vector pUC19-*SclA* con un inserto de 2,3 kb *SphI/SphI* más fácil de secuenciar.

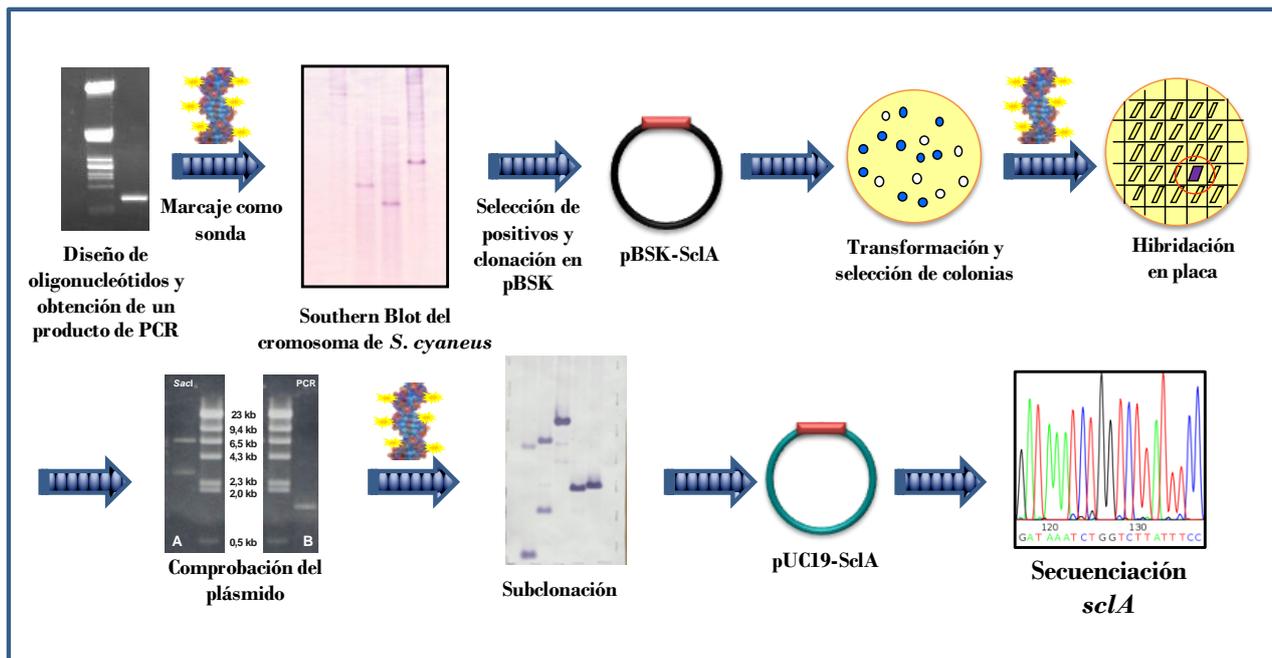


Figura 3.2. Esquema general del proceso seguido para la clonación y secuenciación del gen *sclA*

Usando cebadores universales así como otros internos apropiados, se secuenció el inserto completo y la secuencia fue analizada con distintos soportes informáticos.

3.5.8. Tratamiento informático de las secuencias

La secuencia obtenida a partir del plásmido pUC19-SclA se comparó con las bases de datos Swiss-Prot/TrEMBL del servidor EXPASY (*Expert Protein Analysis System*, del *Swiss Institute of Bioinformatics*) utilizando el programa BLAST (<http://expasy.org/tools/blast/>), con el fin de confirmar su similitud con otras lacasas bacterianas descritas. Por otro lado, las secuencias parciales obtenidas se alinearon usando el programa CLUSTALW del servidor EBI (*European Bioinformatics Institute*, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). La traducción a aminoácidos y búsqueda de marcos abiertos de lectura para la identificación del gen se hizo con la herramienta TRANSLATE de EXPASY (<http://expasy.org/tools/dna.html>) y el programa FRAMEPLOT (<http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl>). El mapa de restricción del gen se realizó con la herramienta NEBCutter V2.0 del servidor NEB (New England Biolabs).

La búsqueda de posibles dominios conservados dentro de la secuencia de la proteína SclA se llevó a cabo con la herramienta PROSITE de EXPASY, PFAM e INTERPROSCAN. La detección de un posible péptido señal se hizo con la herramienta SIGNALP del servidor CBS (Center for Biological Sequence Analysis, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). El árbol de las relaciones filogenéticas entre las oxidasas multicobre de *Streptomyces* se realizó por el método del “Neighbour Joining” con la herramienta CLUSTALW en el servidor GENOMENET (*Bioinformatics Center del Institute for Chemical Research, Kyoto University*, <http://align.genome.jp/>).

3.5.9. Expresión heteróloga de la proteína SclA

A partir de la secuencia del gen *sclA* se diseñó un oligonucleótido coincidente con el extremo C-terminal, añadiendo un sitio *Bam*HI, y un oligonucleótido correspondiente al extremo N-terminal, incluyendo un sitio *Nde*I de manera que coincidiese con el marco de lectura del gen. Tras digerir los productos de amplificación con las enzimas apropiadas, se ligaron con el vector pET28a previamente digerido con las mismas enzimas dando lugar a la construcción pET28-SclA. Esta ligación se utilizó para transformar

células competentes de *E. coli* DH10B, que fueron sembradas en medio LB con kanamicina (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y las colonias obtenidas se analizaron para comprobar que portaban las construcciones apropiadas.

A partir de las colonias positivas, se obtuvo una preparación de plásmido que se usó para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) que se sembraron de nuevo en medio LB con kanamicina. Utilizando una colonia de las crecidas en estas placas, se preparó un precultivo de 3 ml de LB con kanamicina (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5 a 1. Las células así obtenidas, se utilizaron para inocular un matraz con 100 ml de medio LB con kanamicina que se incubó de igual modo hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, momento en el que se añadió IPTG hasta una concentración de 1 mM. Tras añadir el inductor de la expresión de la proteína recombinante, las células se incubaron a diferentes temperaturas de incubación (37, 28 y 16 °C) para estudiar el efecto de la temperatura sobre la solubilidad de la proteína.

3.5.9.1. Análisis de la expresión

Para llevar a cabo este análisis, se siguieron las instrucciones del “pET System Manual” (Novagen) con algunas modificaciones. En el momento previo a la inducción, y posteriormente en distintos intervalos de tiempo, se tomaron las siguientes muestras del matraz: 1 ml para medir la DO_{600} del cultivo, 1 ml para analizar las proteínas totales y 15 ml para analizar las proteínas de las fracciones subcelulares. A partir de estas muestras se pudo determinar la evolución de la proteína recombinante en el tiempo y su localización.

Para la obtención de las proteínas totales, las muestras de 1 ml se centrifugaron a 10.000 g durante 1 minuto; tras desechar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 100 μl de tampón PBS y 100 μl de tampón de carga para electroforesis, y se lisaron mediante un sonicador Microson® XL2000 (Misonix) en 10 pulsos de 2 segundos espaciados 20 segundos y al 50 % de potencia, manteniendo las muestras en hielo durante todo el proceso. A continuación, se incubaron a 70 °C durante 3 minutos para

desnaturalizar las proteínas y se guardaron congeladas a -20 °C hasta su análisis.

Las proteínas de las distintas fracciones celulares se obtuvieron por los siguientes métodos:

- Proteínas extracelulares: las muestras de 15 ml se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos y a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y las proteínas se concentraron diez veces por ultrafiltración.
- Proteínas de la fracción periplásmica: el precipitado celular obtenido en el paso anterior se resuspendió en 10 ml de tampón Tris-HCl 30 mM pH 8 con sacarosa al 20 % (p/v), a lo que se añadieron 20 μl de EDTA 0,5 M pH 8. La mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos y a 4 °C. El precipitado celular se resuspendió posteriormente en 10 ml de MgSO_4 5 mM previamente enfriado y se agitó nuevamente en frío. Tras centrifugar nuevamente, el sobrenadante se concentró diez veces por ultrafiltración y se conservó a -20 °C hasta su análisis.
- Proteínas de la fracción citoplásmica soluble: el precipitado celular obtenido en el paso anterior se resuspendió en 1,5 ml de Tris-HCl 20 mM pH 7,5 enfriado previamente, se transfirió a un tubo eppendorf y se incubó a 30 °C durante al menos 15 minutos. A continuación, se sonicaron las muestras con un tratamiento de 12 pulsos de 5 segundos espaciados 30 segundos, al 50 % de potencia y en hielo. Se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos y a 4 °C y el sobrenadante se conservó a -20 °C hasta su análisis.
- Proteínas de la fracción citoplásmica insoluble: el precipitado del paso anterior, formado principalmente por cuerpos de inclusión, se lavó dos veces con 750 μl de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, centrifugando a 10.000 g y a 4 °C durante 5 minutos entre cada paso. El precipitado obtenido se resuspendió en 1,5 ml de SDS al 1 % (p/v), agitando bien

hasta su disolución. La muestra se conservó a -20 °C hasta su análisis.

Para analizar las proteínas recuperadas en cada paso se realizó una electroforesis SDS-PAGE (ver apartado 3.3.1). Para ello, las proteínas de las distintas fracciones subcelulares se mezclaron con tampón de carga en una proporción 1:1. El volumen de muestra a cargar, que ha de ser la misma en todos los casos con el fin de establecer comparaciones, se calcula según la siguiente fórmula:

$V = \text{volumen del pocillo} / (\text{factor de concentración} \times \text{DO}_{600})$

El factor de concentración habitualmente fue de 10 atendiendo a los volúmenes manejados en el protocolo.

El análisis de estos geles permitió determinar el período de tiempo, desde el momento en que se indujo la expresión, en el que se alcanzaba la máxima cantidad de proteína recombinante soluble, así como la fracción celular en que se encontraba.

3.5.10. Recuperación de la enzima a partir de los cuerpos de inclusión

Como alternativa al efecto del descenso de la temperatura de incubación sobre la solubilización de la materia presente en los cuerpos de inclusión, se ensayó el protocolo descrito por Colombo *et al.* (2001).

Para ello, se llevó a cabo la producción de la enzima según lo descrito en el apartado 3.6, manteniendo la temperatura de incubación a 37 °C tras la adición del IPTG. Transcurridas 3 horas desde la inducción, las células fueron recogidas por centrifugación a 12.000 *g* a 4 °C y a continuación se lavaron con la solución I. Seguidamente, las células obtenidas a partir de 1 l de cultivo, se resuspendieron en 50 ml de la misma solución y se rompieron en una prensa French® (Sim-Aminco) tras dos pases a 1.500 psig, enfriando previamente la celda de ruptura y recogiendo el lisado celular en un tubo inmerso en hielo. Los restos celulares y otros materiales se separaron mediante una centrifugación previa a

1.000 *g* durante 20 minutos. A continuación, el material insoluble se recuperó del sobrenadante por centrifugación a 12.000 *g* durante 20 minutos. El precipitado recogido se resuspendió en 60 ml de la solución II, y tras centrifugar de nuevo en las mismas condiciones, se resuspendió finalmente en 60 ml de la solución III. Por último, el caldo proteico obtenido se dializó a 4 °C durante una noche frente a 5 l de la solución IV, que contenía ditioeritritol (DTE) como agente renaturalizante.

Para determinar la actividad lacasa recuperada, se eliminó el exceso de DTE mediante una columna “PD-10 Desalting Column” (GE Healthcare) con un límite de exclusión molecular de 5 kDa.

3.6. Producción y purificación de la enzima recombinante

3.6.1. Producción de la enzima recombinante

La producción de la enzima recombinante se basó en la metodología descrita en el apartado 3.5.9. Se comenzó con la transformación de células competentes de la cepa BL21 (DE3) con el plásmido pET28-SclA, que fueron sembradas en placas de medio LB con kanamicina (25 µg ml⁻¹). Posteriormente, una colonia se inoculó en un tubo que contenía 3 ml de LB con kanamicina (50 µg ml⁻¹) y se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento; a continuación, se transfirió a un matraz de 250 ml con 40 ml del mismo medio y se incubó de igual modo hasta alcanzar la fase exponencial (DO₆₀₀: 0,5-1), sirviendo este cultivo como preinóculo. La producción de la enzima se llevó a cabo en matraces de 1 l con 250 ml de medio LB suplementado con kanamicina, que fueron inoculados con 4 ml del preinóculo anterior e incubados a 37 °C y 200 rpm. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,5 a 1, se cambió su temperatura de incubación a 16 °C; una vez atemperado el cultivo, se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se mantuvo a 16 °C. En el momento de producción máxima de la enzima soluble, establecido según el apartado 3.5.9.1, las células se recogieron por centrifugación a 12.000 *g* durante 10 minutos y a 4 °C. A continuación, se lavaron resuspendiéndolas en tampón PBS y se centrifugaron en las mismas

condiciones. Las células recogidas se guardaron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

Para obtener la proteína recombinante de la fracción citoplasmática soluble, las células se resuspendieron en $50\text{ }\mu\text{l}$ de tampón fosfato I 10 mM pH 7, previamente enfriado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por cada ml inicial de cultivo. Seguidamente, las células se rompieron en una prensa French® (Sim-Aminco) tras dos pases a 1.500 psig , enfriando previamente la celda de ruptura y recogiendo el lisado celular en un tubo inmerso en hielo. Por último, el lisado se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, con el fin de separar el sobrenadante que contenía la enzima soluble de los restos celulares.

3.6.1.1. Obtención de la forma activa de la enzima recombinante

Al sobrenadante obtenido de la ruptura celular se le añadió sulfato de cobre (II) hasta una concentración de 1 mM , con el fin de que la proteína captase el cobre necesario para completar su centro activo. Además, se añadió PMSF (preparado en alcohol isoamílico 100 mM) a una concentración final de $0,5\text{ mM}$, con el fin de inhibir la acción de proteasas. El sobrenadante se incubó con el cobre durante 3 horas en hielo y a continuación se introdujo en una bolsa de diálisis y se dializó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ frente a 5 litros de tampón fosfato I 10 mM pH 7, durante una noche, con el fin de eliminar el exceso de cobre no unido a la proteína. La muestra se guardó congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su purificación.

3.6.2. Purificación de la enzima recombinante

Para la purificación de la lacasa recombinante se utilizaron las columnas Gravi-Trap (GE Healthcare). Estas columnas poseen una matriz cargada con iones Ni^{2+} que se unen selectivamente a las histidinas presentes en la superficie de las proteínas. La enzima recombinante obtenida presenta una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal, lo que incrementa su afinidad por el níquel quedando retenida en la columna con mucha mayor intensidad que el resto de proteínas del extracto celular de *E. coli*. La elución de las proteínas se consigue empleando imidazol, molécula idéntica a la cadena lateral del

aminoácido histidina, compitiendo y desplazando así a las proteínas unidas a la matriz.

Para llevar a cabo este proceso, se siguieron las recomendaciones del fabricante. Así, en primer lugar, se equilibró la columna con el tampón de unión (tampón fosfato 20 mM pH 7,4 que contenía NaCl 500 mM y 20 mM de imidazol para minimizar la unión de otras proteínas con cierta afinidad por la matriz). A continuación se añadió el caldo enzimático obtenido según el apartado anterior y diluido a la mitad en tampón de unión 2x. Una vez unida la proteína a la matriz, se realizó un paso de lavado con el tampón de lavado, cuya composición es la misma que la del tampón de unión. Finalmente, la enzima recombinante se eluyó tras añadir un volumen determinado de tampón de elución (tampón fosfato 20 mM , NaCl 500 mM , imidazol 250 mM). Además a todas las soluciones empleadas, se les añadió Tween 20 a una concentración del $0,1\text{ }\%$ (v/v) para mantener en la medida de lo posible la solubilidad de la proteína recombinante.

Finalmente, la enzima purificada obtenida se dializó mediante una columna "PD-10 Desalting Column" (GE Healthcare) empleando como fase móvil tampón fosfato 10 mM pH 7 y se concentró en los casos en que fue necesario mediante un sistema de ultrafiltración Amicon Ultra (Millipore), con un tamaño de poro de 5 kDa .

3.6.2.1. Electroelución

Como último paso de purificación, se utilizó la técnica de electroelución, a partir de geles de poli(acrilamida) en los que se habrían aplicado las fracciones más activas de actividad lacasa.

Para ello se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1 preparando geles de $1,5\text{ mm}$ de espesor. Para localizar las bandas del gel correspondientes a la actividad lacasa se siguió el método descrito en el apartado 3.3.2.2. Por último, para poder extraer las proteínas de las bandas de gel recortadas, éstas se introdujeron en bolsas de diálisis que contenían tampón de carrera 1x y se sometieron a una electroforesis horizontal (Mini-Sub® Cell GT, BioRad) aplicando un voltaje de 90 V durante 30 minutos.

3.7. Caracterización de la lacasa recombinante purificada

3.7.1. pH óptimo de reacción

El pH óptimo de reacción de la actividad lacasa frente a los distintos sustratos, se determinó en un rango de pH de 3,0 a 8,0, empleando el tampón Britton-Robinson a una concentración final de 50 mM.

3.7.2. Estabilidad al pH

Para determinar la estabilidad al pH en un rango de 3,0 a 9,0, la enzima se incubó en el tampón Britton-Robinson a una concentración final de 25 mM durante un tiempo máximo de 24 horas, tomándose muestras a diferentes tiempos.

3.7.3. Temperatura óptima de reacción

La temperatura óptima de reacción se determinó valorando la actividad enzimática a distintas temperaturas, en un rango de 25 a 85 °C. Todos los componentes de la reacción excepto la enzima, se mantuvieron atemperados, determinándose la actividad en un espectrofotómetro Hitachi modelo U-2001 con el zócalo de la cubeta termostatizado.

3.7.4. Estabilidad a la temperatura

La estabilidad a la temperatura de la lacasa purificada, se determinó incubando la enzima en tampón fosfato I 25 mM pH 7, a diferentes temperaturas comprendidas en un intervalo de 30 a 70 °C durante distintos tiempos hasta un máximo de 24 horas. Una vez enfriadas las muestras, se determinó la actividad de las mismas.

3.7.5. Determinación de la masa molecular

Para la determinación de la masa molecular de la enzima se utilizó un patrón de proteínas para electroforesis (Bio-Rad) de masas moleculares conocidas: fosforilasa B (103 kDa), albúmina bovina (80,6 kDa), ovoalbúmina (49,5 kDa), anhidrasa carbónica (36,5 kDa), inhibidor de tripsina (28,8 kDa) y lisozima (19,4 kDa). La masa

molecular se calculó comparando los valores de R_f de los patrones con el obtenido para la muestra problema, tras realizar una electroforesis en condiciones desnaturalizantes con β -mercaptoetanol.

3.7.6. Determinación del punto isoelectrico

El punto isoelectrico (pI) de la enzima purificada se determinó mediante la aplicación de la técnica de isoelectroenfoque en placa horizontal, según se describe en el apartado 3.3.3. Para su estimación, se utilizaron proteínas patrón (GE Healthcare) que abarcaban un amplio rango de pI (entre 3,5 y 9,3), con objeto de comparar su R_f con el de la lacasa estudiada, tras teñir el gel según el método descrito en el mismo apartado.

3.7.7. Constantes cinéticas

Para la determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima ($V_{máx}$) de reacción de la enzima purificada, se siguió el método gráfico de Lineweaver-Burk ($1/V$ frente a $1/S$) siendo S la concentración de sustrato ensayada y V la velocidad inicial de reacción enzimática. Para obtener estos datos se realizaron distintas valoraciones según el método general descrito en el apartado 3.1.5.3.2, modificando el pH de la reacción en función del sustrato. Las concentraciones de sustrato ensayadas estuvieron comprendidas en el rango 0 a 25 mM.

3.7.8. Oxidación de un compuesto no fenólico en presencia de un mediador redox

Para evaluar la capacidad de la lacasa recombinante para oxidar un compuesto no fenólico se escogió el colorante Methyl Orange como modelo. La mezcla de reacción contenía 40 mU de enzima, 50 μ M de colorante y acetosiringona 0,1 mM en tampón acetato 50 mM pH 4,5. La absorbancia de la reacción a 457 nm se monitorizó durante 30 minutos y los resultados se expresaron en concentración (μ M) a partir del coeficiente de extinción molar calculado (ver apartado 3.4.1).

3.8. Estrategias para el estudio de la función desempeñada por la lacasa de *S. cyaneus*

3.8.1. Obtención de un mutante no productor de lacasa de *S. cyaneus* (*S. cyaneus* SclA⁻)

Para la obtención de un mutante de *S. cyaneus* no productor de lacasa se realizó en primer lugar, un mapa de restricción del gen con el fin de conocer su posición en el fragmento *SacI/SacI* incluido en el plásmido pBSK. Para ello, se llevaron a cabo una serie de digestiones sencillas y dobles con distintas enzimas de restricción de la construcción pBSK-SclA. A partir de los resultados obtenidos, se decidió optar por la estrategia de mutagénesis por disrupción génica para la obtención del mutante.

Para poner en práctica esta técnica, era necesario en primer lugar, amplificar una porción interna del gen de aproximadamente 1 kb, para lo que se utilizaron los mismos cebadores empleados en la clonación de *scIA* (ver Tabla 3.1). El producto de amplificación obtenido, se clonó mediante el kit “Zero Blunt® PCR Cloning Kit” (Invitrogen) con el fin de disponer del producto amplificado en cantidad suficiente. Así, para obtener dicho fragmento se digirió PCR-Blunt®-SclA con la enzima de restricción *EcoRI*. Por otro lado, el plásmido pOJ260, se digirió de igual modo con *EcoRI* y a continuación se trató con la enzima CIAP. Por último, el producto de amplificación del gen se ligó en pOJ260 de manera que se obtuvo la construcción pOJ260-SclA1.

Una vez realizadas las comprobaciones necesarias para conocer la orientación del inserto, pOJ260-SclA1 se utilizó para transformar por electroporación la cepa de *E. coli* ET12567 (pUB307). A continuación se llevó a cabo la conjugación de una de las colonias electroporadas con esporas de *S. cyaneus*, seleccionándose aquellas esporas portadoras de la mutación gracias a su resistencia a apramicina, conferida por el plásmido pOJ260.

3.8.1.1. Comprobación del mutante *S. cyaneus* SclA⁻

3.8.1.1.1. Nivel molecular

Para la comprobación del mutante *S. cyaneus* SclA⁻ a nivel molecular se llevó a cabo una hibridación de Southern. Para ello, el ADN cromosómico de las cepas silvestre y mutante se digirió con la enzima de restricción *SphI* y como sonda se utilizó la construcción pOJ260-SclA1 que fue marcada con digoxigenina.

3.8.1.1.2. Nivel bioquímico

Para comprobar la ausencia de actividad lacasa en la cepa mutante *S. cyaneus* SclA⁻ se llevó a cabo un ensayo de detección de dicha actividad, en comparación con la cepa silvestre, en medio MS tanto sólido como líquido.

Para la detección en medio líquido, se utilizó una suspensión de esporas estandarizada de ambas cepas para inocular en una proporción del 2 % matraces de 500 ml con 100 ml de medio líquido MS que se incubaron en agitación (150 rpm) y a 28 °C durante 22 días. Cada día se tomaron muestras de 1 ml de cada uno de los matraces, se centrifugaron y se valoró la actividad en el sobrenadante según lo descrito en apartado 3.1.5.3.2.

Para la detección en medio sólido, la misma suspensión de esporas se utilizó para realizar siembras en superficie en el medio sólido MS, suplementado con 1 g l⁻¹ de ABTS, en el que se podría detectar la actividad según lo descrito en el apartado 3.1.5.3.1.

3.8.2. Implicación en procesos de morfogénesis y esporulación

Con objeto de comprobar la posible implicación de la lacasa de *S. cyaneus* en los procesos de morfogénesis y esporulación que tienen lugar durante el ciclo de diferenciación celular del microorganismo, se realizaron observaciones al microscopio óptico y electrónico de barrido con las cepas silvestre y mutante (SclA⁻) de *S. cyaneus*.

3.8.2.1. Microscopía óptica

Para el estudio fenotípico de las cepas silvestre y mutante de *S. cyaneus* mediante microscopía óptica, se inocularon suspensiones de esporas

estandarizadas (10^7 ufc ml⁻¹) de ambas cepas sobre cubreobjetos estériles introducidos de forma inclinada en placas de medio MS, suplementado con 25 µl ml⁻¹ de apramicina en el caso de la cepa *S. cyaneus* SclA-. Las placas se inocularon con un asa de siembra en el punto de contacto entre el agar y el cubreobjetos y se incubaron a 28 °C durante 2, 4 y 6 días para observar las distintas fases del ciclo de diferenciación celular de los microorganismos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los cubreobjetos se extrajeron del medio, se fijaron a la llama y se pegaron sobre un portaobjetos. A continuación, las preparaciones se tiñeron según la tinción de Gram y se observaron en un microscopio óptico Axiolabs (Zeiss) conectado a una cámara digital “Nikon Digital Sight DS-Fi1”.

3.8.2.2. Microscopía electrónica de barrido

Para el estudio fenotípico de las cepas silvestre y mutante de *S. cyaneus* mediante microscopía electrónica de barrido, las muestras se prepararon realizando cultivos de las cepas sobre cubreobjetos mediante el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior. Transcurridos 2 y 5 días tras la siembra de los microorganismos, los cubreobjetos se extrajeron del medio de cultivo, se introdujeron en cápsulas de papel Whatman n° 1 de unos 6 mm de diámetro y se fijaron con glutaraldehído al 5% (v/v) en tampón cacodilato sódico 200 mM pH 7,2 durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se lavaron 2 veces durante 10 minutos en tampón cacodilato sódico 200 mM pH 7,2 y seguidamente, se deshidrataron gradualmente en concentraciones crecientes de etanol-acetona (Merck) según el siguiente protocolo: 10 minutos en etanol absoluto al 25 %; 10 minutos en etanol absoluto al 50 %; 10 minutos en etanol absoluto al 70 %; 10 minutos en etanol absoluto al 90 %; 10 minutos en etanol absoluto al 100 % (repetir dos veces); 10 minutos en acetona al 100 % (repetir dos veces); y al menos una noche en acetona anhidra al 100 %.

Una vez fijadas las muestras, se realizó el punto crítico de secado en un secador Polaron E300. Por último, las muestras se colocaron en portaobjetos circulares de aluminio de 2,5 cm de diámetro, se metalizaron con oro-paladio en un metalizador

Polaron 5400 y se observaron en un microscopio electrónico de barrido digital Zeiss DMS-950.

3.8.3. Implicación en procesos de pigmentación

Para comprobar la posible implicación de la lacasa de *S. cyaneus* en procesos de pigmentación se realizaron siembras de las cepas silvestre y mutante en tres medios de cultivo sólidos: GAE, MS y Bennet.

Las placas se sembraron a partir de una suspensión de esporas estandarizada (10^8 ufc ml⁻¹) de ambas cepas mediante las técnicas de siembra por agotamiento y en masa. Transcurridos unos 5 a 6 días de incubación a 28 °C, momento en el que se produjo la esporulación y aparición de la pigmentación, se tomaron fotografías de las placas, tanto del césped microbiano en el caso de la siembra en masa, como de colonias aisladas en el caso de la siembra por agotamiento en estría. Para conseguir un mayor aumento se utilizó una lupa binocular Nikon.

3.8.4. Implicación en procesos de resistencia al cobre

Para comprobar la posible implicación de la lacasa de *S. cyaneus* en procesos de resistencia al cobre, se llevó a cabo un estudio de la tolerancia a este metal durante el crecimiento de las cepas silvestre y mutante. Dicho estudio se realizó en dos condiciones diferentes: una, en la que las células fueron crecidas en medio sólido MS en ausencia de cobre externo (cultivos no inducidos); y otra, en la que las células fueron crecidas en medio MS suplementado con cobre, previamente a realizar el estudio de tolerancia (cultivos inducidos).

3.8.4.1. Cultivos no inducidos

A partir de una suspensión de esporas estandarizada (10^8 ufc ml⁻¹) de ambas cepas crecidas en medio sólido MS, se inocularon matraces de 100 ml con 30 ml de MBS suplementado con extracto de levadura al 0,6 % (p/v) y una solución de sulfato de cobre 10 mM para obtener las siguientes concentraciones finales de cobre: 50, 200 y 500 µM. El medio utilizado

para el cultivo de la cepa mutante se suplementó además con 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de apramicina.

Los matraces se incubaron en agitación (150 rpm) a 28 °C durante 7 días. Cada día se tomaron dos matraces de los cultivos pertenecientes a cada cepa, se filtraron y se estimó el peso seco del micelio. Como control se utilizó el mismo medio sin sulfato de cobre.

3.8.4.2. Cultivos inducidos

Tanto *S. cyaneus* como *S. cyaneus* SclA⁻ fueron sembrados en medio sólido MS suplementado con sulfato de cobre a una concentración final de 400 μM . Transcurridos 5 a 6 días de incubación a 28 °C se obtuvo una suspensión de esporas estandarizada para cada cepa, que se utilizó para inocular matraces de 100 ml con 30 ml de MBS suplementado con extracto de levadura al 0,6 % (p/v) y una solución de sulfato de cobre 10 mM, para obtener las siguientes concentraciones finales de cobre: 300, 600 y 1000 μM . El medio utilizado para el cultivo de la cepa mutante se suplementó además con 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de apramicina. Los matraces se incubaron en agitación (150 rpm) a 28 °C durante 6 días. Cada día se tomaron dos matraces de los cultivos pertenecientes a cada microorganismo, se filtraron y se estimó el peso seco del micelio. Como control se utilizó el mismo medio sin sulfato de cobre.

3.8.5. Implicación en la degradación del polímero de lignina

Para poner de manifiesto la posible implicación de la lacasa de *S. cyaneus* en la degradación de lignina, se llevaron a cabo estudios de fermentación en estado sólido sobre paja de trigo, con las cepas silvestre y mutante de este microorganismo.

3.8.5.1. Sustrato y condiciones de fermentación en estado sólido

El sustrato de fermentación utilizado fue paja de trigo (*Triticum aestivum* var. *maestro*) molida en un molino de aspas (Janke & Kunkel) con el fin de obtener un tamaño de partícula de 40 mesh. Una vez desecado a 50 °C, el sustrato fue esterilizado a

120 °C durante 20 minutos en matraces de 1 l que contenían 5 gramos (Hernández-Coronado *et al.*, 1997).

Para la obtención de los preinóculos con los que fueron inoculados los matraces, suspensiones estandarizadas de esporas se incubaron a 28 °C durante 36 horas en agitación en MBS que contenía extracto de levadura al 0,6 % (p/v), sacarosa 1 M y apramicina (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en el caso de la cepa mutante. Transcurrido el tiempo de incubación, el micelio de ambas cepas se recogió por centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos y se lavó con agua destilada. El micelio se resuspendió en el volumen de MBS suplementado con NaCl al 3,5 % (p/v), extracto de levadura al 0,1 % (p/v) y apramicina (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en el caso de la cepa mutante, necesario para conseguir una humedad relativa del sustrato del 85 %. A continuación, los matraces fueron incubados a 28 °C durante 7 ó 14 días en estático. Como control se utilizaron matraces que contenían paja de trigo pretratada sin inocular.

3.8.5.2. Obtención de lignina mediante extracción alcalina de la paja de trigo

Para la obtención de la álcali-lignina, se siguió el método de extracción mediante NaOH 0,1 N, descrito por Hernández-Coronado *et al.* (1997). Para ello, tras el período de incubación, se añadieron 200 ml de NaOH 0,1 N por cada 5 gramos de paja de trigo y a continuación, las muestras se sometieron en el autoclave a 100 °C durante 1 hora. Posteriormente, el contenido de cada matraz se filtró a través de papel Whatman N° 54 y se lavó de nuevo con 200 ml de NaOH 0,1 N. El sobrenadante resultante se acidificó con HCl concentrado, hasta un valor de pH entre 1,5-2. La lignina precipitada se recogió por centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos y se lavó dos veces con agua destilada. Finalmente, se liofilizó en un liofilizador Cryodos-50 (Telstar) y se estimó gravimétricamente el peso seco de la álcali-lignina solubilizada.

3.8.5.3. Análisis de la álcali-lignina mediante pirólisis asociada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (Py-GC-MS)

La pirólisis se llevó a cabo utilizando 1 mg de la álcali-lignina obtenida a partir de la paja de trigo fermentada por las cepas silvestre y mutante de *S. cyaneus* y del control, en un pirolizador de doble disparo (double-shot) modelo 2020 (Laboratorios Frontier) conectado a un sistema GC-MS Agilent 6890 equipado con una columna capilar de sílice HP 5MS (30 m x 250 μm x 0,25 μm d.i.) y con un detector selectivo de masa Agilent 5973 (IE a 70 eV). La pirólisis fue llevada a cabo a 500 °C. Las condiciones del sistema GC-MS fueron las siguientes: la temperatura del horno se mantuvo durante 1 min a 50 °C y después se incrementó hasta 100 °C a razón de 30 °C min^{-1} , y hasta 300 °C a 10 °C min^{-1} .

A continuación, una fase isoterma a 300 °C durante 10 minutos y la temperatura final de 500 °C fue alcanzada a razón de 20 °C min^{-1} . Como gas transportador se utilizó helio con un flujo controlado de 1ml min^{-1} .

Los productos de pirólisis derivados de las distintas álcali-ligninas se identificaron de acuerdo con las bases de datos de las librerías Wiley y Nist y en base a los tiempos de retención y espectros descritos en la literatura.

4. Resultados

4.1. Estudio del potencial oxidativo de la cepa *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, utilizando como modelo colorantes textiles

4.1.1. Evaluación de la capacidad degradativa de la lacasa nativa producida por *S. cyaneus*

4.1.1.1. Producción y purificación de la lacasa

La purificación de la lacasa producida por *S. cyaneus* se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Arias *et al.* (2003). Para ello, se partió de sobrenadante de cultivos de 12 días de incubación, obtenidos a partir del medio de cultivo MS, que contenían aproximadamente 200 mU ml⁻¹ de actividad lacasa frente a ABTS. A partir de este sobrenadante, se procedió a una precipitación secuencial de las proteínas con sulfato amónico, primero al 20 y después, al 50 %. A continuación, el precipitado se aplicó a una cromatografía de intercambio hidrofóbico, y las fracciones activas, una vez dializadas y concentradas, se resolvieron mediante cromatografía de intercambio iónico. En la Tabla 4.1 se resume el proceso de purificación de esta enzima.

En el proceso de purificación de la lacasa de *S. cyaneus* se obtuvo un rendimiento de un 60,41 % y un factor de purificación de 8,57, que resultaron ligeramente superiores a los descritos por Arias *et al.* (2003). A continuación, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones recogidas de la cromatografía de intercambio iónico, para comprobar el grado de purificación alcanzado en este proceso.

En la Figura 4.1.A se muestra una banda de proteína con la misma movilidad electroforética que la banda de actividad frente a ABTS (Figura 4.1.B).

Además, la masa molecular de 75 kDa, estimada por comparación con los patrones, coincide con los datos publicados por Arias *et al.* (2003).

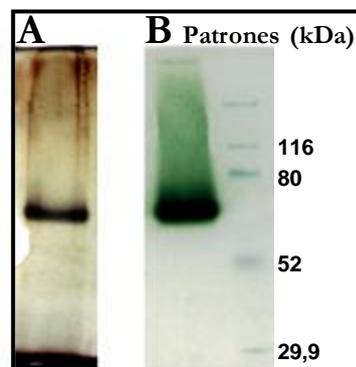


Figura 4.1. SDS-PAGE de la lacasa purificada de *S. cyaneus*. Gel teñido con tinción de plata (A) y zimograma obtenido con ABTS (B).

Por último, se llevó a cabo una caracterización parcial de la lacasa purificada, estimándose el pH y la temperatura óptimos de reacción, la estabilidad a pH y temperatura, K_m y $V_{máx}$. En la Tabla 4.2 se muestran las características físico-químicas y cinéticas de la lacasa purificada.

Tabla 4.2. Características físico-químicas y cinéticas de la lacasa de *S. cyaneus* determinadas utilizando ABTS como sustrato.

pH óptimo de reacción	4,5-5
Temperatura óptima reacción	50-55° C
Estabilidad al pH	5-7 (24 h)
Estabilidad a temperatura	30-40° C (24 h)
K_m (mM)	0,38
$V_{máx}$ (U mg proteína⁻¹)	0,55

4.1.1.2. Degradación enzimática de colorantes textiles tipo azo

4.1.1.2.1. Caracterización espectrofotométrica de los colorantes

Tabla 4.1. Rendimiento y factor de purificación de la lacasa producida por *Streptomyces cyaneus*.

Paso de purificación	Proteína Total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Caldo de cultivo	89,5	86,24	0,96	1	100
Precipitación con (NH ₄)SO ₄ al 20 %	63,5	81,4	1,28	1,33	94,38
Precipitación con (NH ₄)SO ₄ al 50 %	47,1	75,3	1,6	1,66	87,31
Hidrofobicidad (Econo Pac Methyl)	18,2	65,8	3,61	3,76	76,3
Intercambio iónico (Econo PACQ)	6,33	52,1	8,23	8,57	60,41

Las longitudes de onda de máxima absorción en el visible (λ) características de cada uno de los colorantes de tipo azo utilizados en los ensayos de decoloración, se obtuvieron mediante la realización de espectros de absorción UV/Vis (Tabla 4.3). Una vez obtenidas dichas longitudes de onda, se realizó el cálculo de los coeficientes de extinción molar a pH 5, también mostrados en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Longitud de onda de máxima absorción en el visible (λ) y coeficientes de extinción molar (ϵ) de los colorantes a pH 5.

Colorante	λ (nm)	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)
Acid Yellow 17	402	34.114
Chromotrope 2R	505	31.495
Crocein Orange G	480	22.895
Methyl Orange	457	27.933
New Coccine	506	25.746
Orange II	485	23.251
Tartrazine	427	28.524
Tropaeolin O	388	22.276

En el Anexo I se muestran además, las estructuras químicas de los colorantes de tipo azo, obtenidas de la página web de la casa comercial Sigma (www.sigmaaldrich.com).

4.1.1.2.2. Decoloración de los colorantes textiles por la lacasa purificada de *S. cyaneus* y por distintos sistemas lacasa-mediador

En primer lugar, se evaluó la capacidad de la lacasa de *S. cyaneus* para decolorar por sí misma los ocho colorantes de tipo azo seleccionados en este estudio. Como se puede observar en la Tabla 4.4, tan sólo en el caso de los colorantes Methyl Orange y New Coccine se obtuvieron porcentajes de decoloración de aproximadamente el 18 % respecto al control tras 3 horas de incubación. En el resto de los casos, no se observaron decoloraciones superiores al 4 % o decoloración alguna.

Con objeto de aumentar el potencial oxidativo de la lacasa, se ensayó la acción conjunta de esta enzima con 5 compuestos fenólicos que pudieran actuar como mediadores de oxidación. Como estudio preliminar, se ensayaron distintas concentraciones de cada uno de los mediadores,

utilizando el colorante Crocein Orange G como modelo.

Tabla 4.4. Porcentaje de decoloración por la lacasa de *S. cyaneus*.

Colorante	% decoloración
Acid Yellow 17	0
Chromotrope 2R	3,8
Crocein Orange G	2,1
Methyl Orange	18,8
New Coccine	17,5
Orange II	3
Tartrazine	0
Tropaeolin O	1

Los resultados obtenidos mostraron que a concentraciones superiores a 100 μM del mediador, se producía una rápida precipitación de los componentes de la reacción (datos no mostrados). Por el contrario, en algunas de las reacciones que contenían 100 μM de mediador se observó un descenso significativo de la absorbancia tras 1 hora de incubación. Como se muestra en la Tabla 4.5 los mejores resultados de decoloración se alcanzaron en presencia de acetosiringona (82 %) mientras que con el ácido síringico, ácido 4-hidroxibenzoico y 4-hidroxiacetofenona se obtuvieron porcentajes de decoloración entre el 10 y el 15 %. Con el ácido vainílico no se detectó ningún cambio significativo.

Tabla 4.5. Porcentaje de decoloración del Crocein Orange G por la lacasa de *S. cyaneus* en presencia de distintos compuestos fenólicos.

Compuesto fenólico	% decoloración
Ácido síringico	12
Ácido 4-hidroxibenzoico	10
4-Hidroxiacetofenona	15
Ácido vainílico	0
Acetosiringona	82

Una vez seleccionada la acetosiringona como mediador de oxidación más efectivo, se llevaron a cabo una serie de experimentos para determinar la capacidad de este sistema lacasa-mediador para degradar los 8 colorantes de tipo azo seleccionados en este trabajo. En la Figura 4.2 se muestra la cinética de degradación de los colorantes por la enzima en presencia de

acetosiringona, en comparación con los controles con lacasa inactivada.

El sistema lacasa-mediador fue especialmente efectivo en el caso de los colorantes New Coccine, Crocein Orange G, Orange II, Chromotrope 2R y Methyl Orange, que alcanzaron porcentajes de decoloración tras 4 horas de incubación de 92, 90, 88, 89 y 87 % respectivamente, aunque fue durante la primera media hora cuando se produjo la mayor parte de la degradación de los compuestos. En el caso de los colorantes Tartrazine, Acid Yellow 17 y Tropaeolin O, también se observó pérdida de color, aunque los porcentajes de decoloración al cabo de las 4 horas no superaron el 50 %.

4.1.1.2.3. Análisis de la toxicidad de los colorantes antes y después del proceso de decoloración

En este ensayo, se llevó a cabo un análisis de la toxicidad de los colorantes antes y después del tratamiento con el sistema lacasa-acetosiringona. Para ello, se seleccionaron cuatro de los colorantes en los que se habían alcanzado los mayores porcentajes de decoloración: New Coccine, Orange II, Methyl Orange y Chromotrope 2R. Se calculó el valor de EC_{50} para una concentración de 50 μM de los compuestos seleccionados antes y después del tratamiento enzimático. El valor inicial de EC_{50} fue muy similar en todos los casos, situándose en un rango entre 45 y 65 μM .

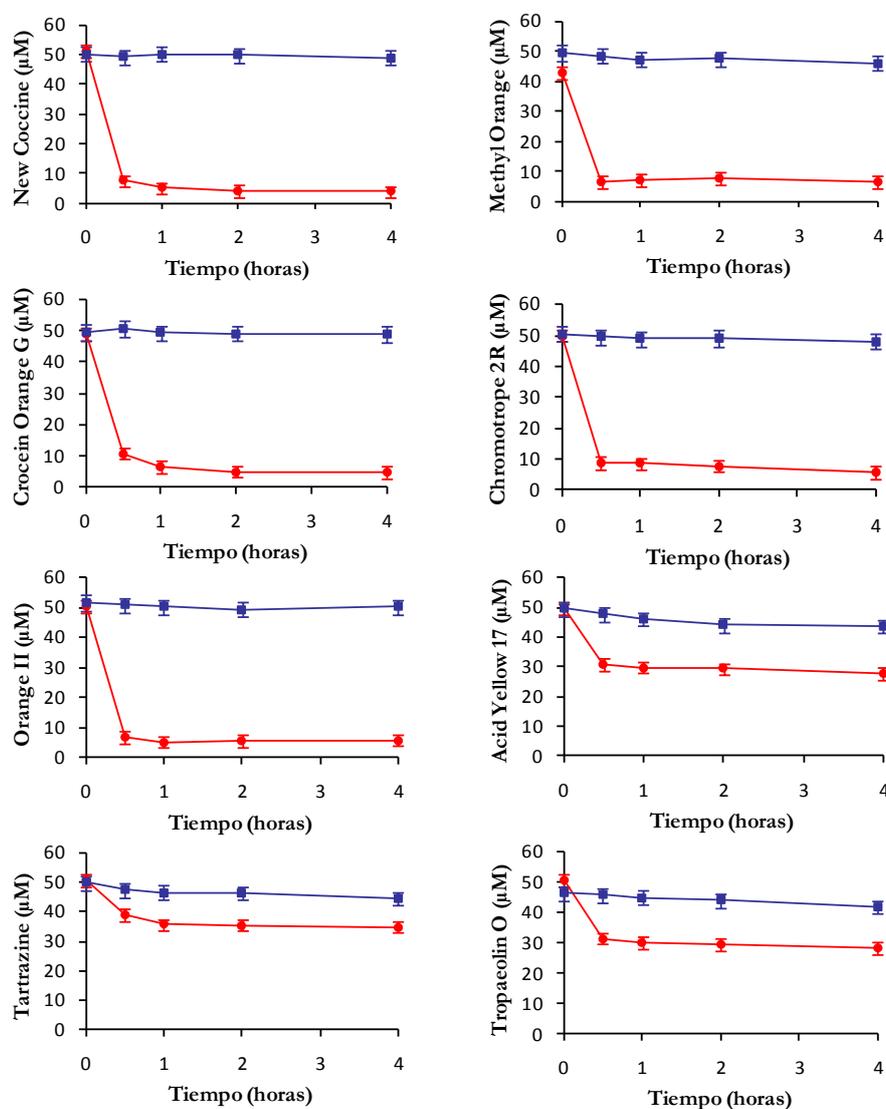


Figura 4.2. Cinética de decoloración de los colorantes de tipo azo utilizando el sistema lacasa-acetosyringona (—), con respecto al control con enzima inactivada (—).

Tras el tratamiento enzimático, se produjo un aumento en el valor de EC_{50} de 63 a 200 μM en el caso del colorante New Coccine y de 54 a 100 μM , en el caso del Chromotrope 2R. Por el contrario, se observó un descenso en el valor de EC_{50} de 46 a 22 μM y de 46 a 9 μM para los colorantes Orange II y Methyl Orange, respectivamente. Cuando estos valores se transformaron en grado de toxicidad de los compuestos (Figura 4.3) se observó que en el caso del New Coccine y Chromotrope 2R, se produjo un descenso de la toxicidad en la muestra decolorada. Sin embargo, en el caso de los colorantes Orange II y Methyl Orange, se produjo un aumento del grado de toxicidad en las muestras decoloradas con respecto al control. Previamente, se comprobó que la acetosiringona a una concentración de 100 μM , no resultaba tóxica para *Vibrio fischeri*.

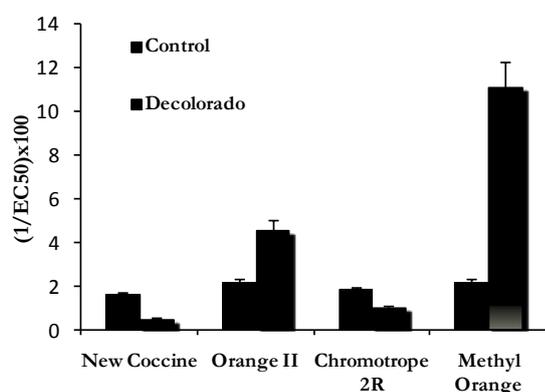


Figura 4.3. Grado de toxicidad de los colorantes antes (control) y después del tratamiento con el sistema lacasa-acetosiringona (decolorado). El grado de toxicidad se expresa como $(1/EC_{50}) \times 100$.

4.1.1.2.4. Análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de los colorantes y de los productos de decoloración

Para completar el estudio del proceso de decoloración llevado a cabo por el sistema lacasa-acetosiringona, se realizó un análisis por HPLC-PDA de los mismos colorantes en los que se había analizado el grado de toxicidad (New Coccine, Orange II, Methyl Orange y Chromotrope 2R) antes y después del tratamiento. En la Figura 4.4 se muestran los perfiles cromatográficos correspondientes a los colorantes Methyl Orange (Figura 4.4, cromatograma A, número 2), Orange II (Figura 4.4, cromatograma C, número 3) y a la acetosiringona (Figura 4.4, cromatogramas A y C,

número 1) antes del tratamiento enzimático. En ambos casos se observa que tras 4 horas de incubación con la lacasa de *S. cyaneus*, desaparecen los picos correspondientes al colorante y a la acetosiringona (Figura 4.4, cromatogramas B y D), mientras que aparecen nuevos máximos en el perfil cromatográfico (L4, L5, L6 y L7 en el cromatograma B y L8, L9, L10, L11 y L12 en el cromatograma D) como consecuencia de la acción del sistema lacasa-mediador sobre los colorantes y/o por la acción de la lacasa sobre el mediador. Además, se llevó a cabo la cuantificación, tanto de los colorantes como del mediador, una vez efectuada la decoloración, mediante la determinación del área de los picos obtenidos en los cromatogramas correspondientes a cada una de las distintas longitudes de onda características de cada compuesto. Para ello, se utilizaron las siguientes curvas patrón obtenidas para el mediador y cada uno de los colorantes:

Acid Yellow 17: $A=31.034c$ ($r=0,99$; $c=\mu\text{M}$)
 Chromotrope 2R: $A=27.866c$ ($r=0,99$; $c=\mu\text{M}$)
 Crocein Orange G: $A=17.363c$ ($r=0,99$; $c=\mu\text{M}$)
 Methyl Orange: $A=24.307c$ ($r=0,99$; $c=\mu\text{M}$)
 New Coccine: $A=25.189c$ ($r=0,99$; $c=\mu\text{M}$)
 Orange II: $A=19.588c$ ($r=0,99$; $c=\mu\text{M}$)
 Tartrazine: $A=26.978c$ ($r=0,99$; $c=\mu\text{M}$)
 Tropaeolin O: $A=20.853c$ ($r=0,99$; $c=\mu\text{M}$)
 Acetosiringona: $A=20.544c$ ($r=0,99$; $c=\mu\text{M}$)
 (A = Área; c=concentración)

Los resultados mostraron que salvo en el caso del colorante Orange II, para el que se detectó una concentración residual de 0,86 μM , en el resto de compuestos, tanto colorantes como mediador, se observó la completa desaparición de los mismos, siendo las concentraciones iniciales de 50 y 100 μM , respectivamente.

4.1.2. Ciclo redox de quinonas en *S. cyaneus* y capacidad degradativa de los radicales hidroxilo producidos

4.1.2.1. Producción de radical hidroxilo por la lacasa purificada

El ensayo para demostrar la posible implicación de la lacasa de *S. cyaneus* en la producción de radical hidroxilo mediante la

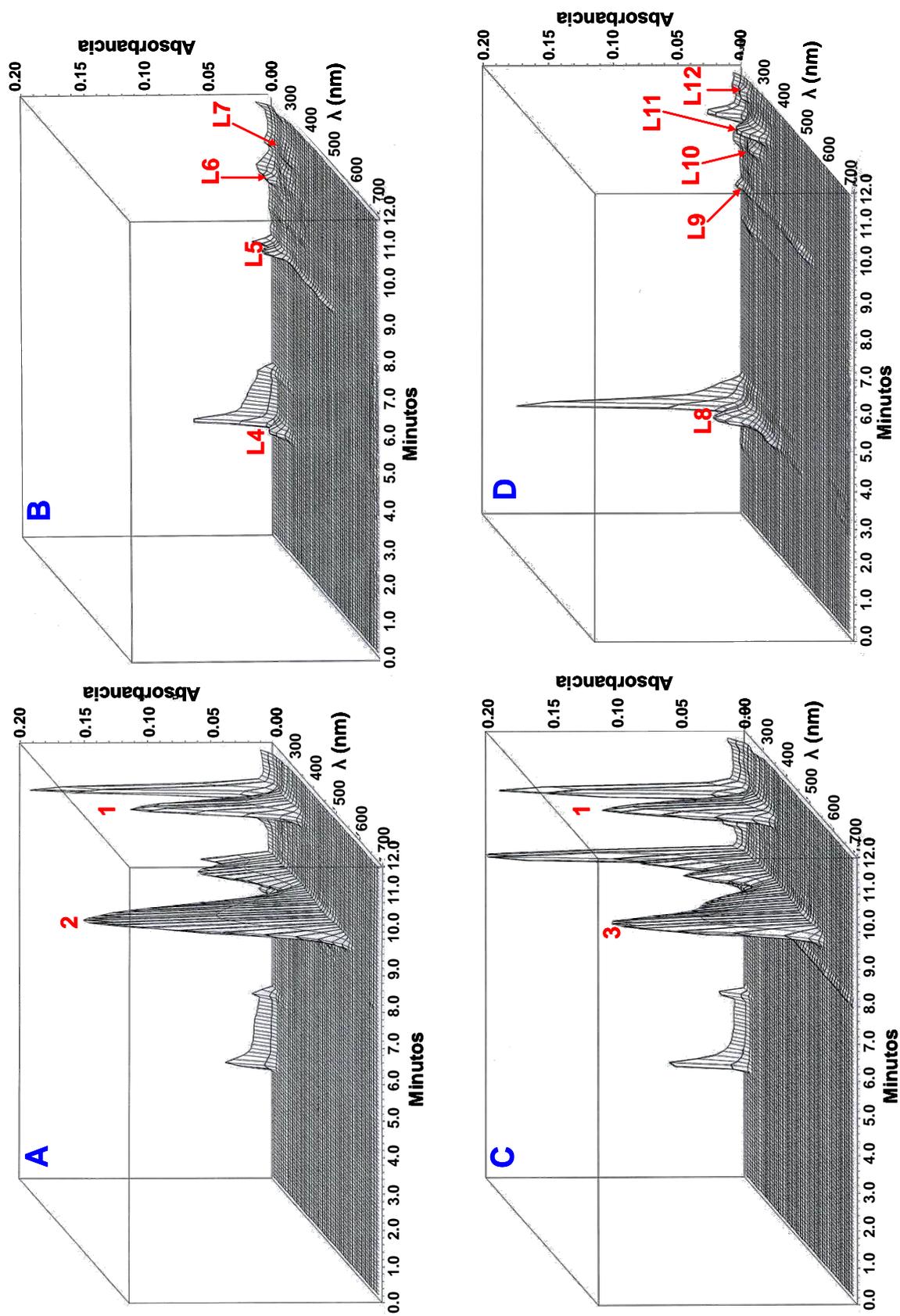


Figura 4.4. Cromatogramas obtenidos mediante PDA de los colorantes Methyl Orange y Orange II, antes y después del tratamiento con lactasa-acetosiringona. Cromatograma A: Methyl Orange (2), acetosiringona (1); cromatograma B: compuestos de degradación del Methyl Orange y/o la acetosiringona (L4-L7); cromatograma C: Orange II (3), acetosiringona (1); cromatograma D: compuestos de degradación del Orange II y/o la acetosiringona (L8-L12).

oxidación de las distintas hidroquinonas puso de manifiesto que la producción de radical hidroxilo estimada como TBARS fue más efectiva en el caso de la MBQH₂ y de la DBQH₂, aunque la velocidad de reacción expresada como producción de sus respectivas quinonas por minuto, demostró que la DBQH₂ es el mejor sustrato de esta lacasa. Asimismo, se puso de manifiesto la mayor efectividad de esta hidroquinona al comprobarse que la producción de H₂O₂ y la reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺, reactivos necesarios para que se lleve a cabo la reacción de Fenton, fue también mayor que con ninguna de las otras hidroquinonas probadas (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Producción de ·OH por la lacasa de *S. cyaneus* en presencia de diferentes hidroquinonas y efectividad de la enzima en la producción de H₂O₂ y en la reducción de Fe³⁺.

	Quinona (μM min ⁻¹)	H ₂ O ₂ (μM)	Fe ²⁺ (μM)	TBARS (A ₅₃₂ min ⁻¹)
BQH ₂	12,9	0	230,3	0,0
MBQH ₂	3,3	3,5	404,6	0,03
DBQH ₂	24,3	41,8	429,0	0,231

4.1.2.2. Producción de radical hidroxilo mediante el ciclo redox de quinonas utilizando micelio de *S. cyaneus*

La producción de radical hidroxilo a través del ciclo redox de quinonas, requiere comprobar previamente la presencia de actividades quinona reductasa y lacasa asociadas al micelio de *S. cyaneus*. De forma paralela, para comprobar si el micelio de *S. cyaneus* en presencia de quinona promueve la producción de radical hidroxilo, se determinó diariamente la producción de este radical.

Los resultados obtenidos mostraron que el máximo de producción de la actividad quinona reductasa asociada al micelio se alcanzó entre el primer y segundo día de incubación, que se corresponde con la fase exponencial de crecimiento del microorganismo. Por otra parte, la actividad lacasa se detectó a partir del segundo día de incubación, que coincide con el inicio de la fase estacionaria (Figura 4.4.A). En la Figura 4.4.B se muestra la producción de ·OH en los distintos días de incubación por unidad de peso seco del microorganismo (mg). En esta figura se puede

observar que el máximo de producción de hidroxilo se alcanzó con micelio de 2 días de incubación, que a su vez se corresponde con unos valores de actividad quinona reductasa y lacasa suficientes para promover el ciclo redox de quinonas. En todas las determinaciones llevadas a cabo (tanto de actividades enzimáticas como de producción de radical hidroxilo) se comprobó la relación lineal de las mismas (datos no mostrados).

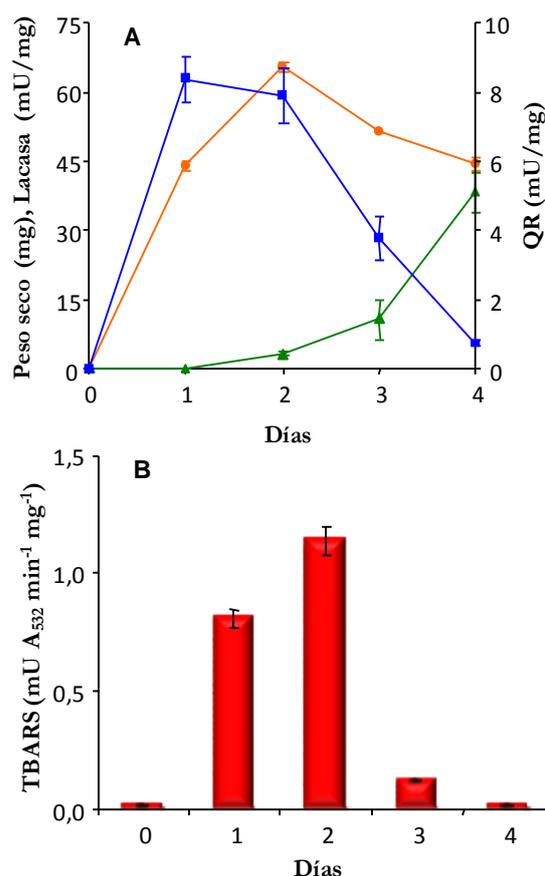


Figura 4.4. Cinética de producción de actividad quinona reductasa (QR) (↔) y lacasa (↔) asociada al micelio de *S. cyaneus* y curva de crecimiento del microorganismo (—) (A). Producción de ·OH, expresado como TBARS (B), en los distintos días de incubación por unidad de peso seco del microorganismo (mg).

A la vista de estos resultados se seleccionó el micelio correspondiente a 48 horas de incubación para optimizar la producción de ·OH mediante el ciclo redox de quinonas. En esta optimización, se consideró el efecto de factores fundamentales que pueden promover la producción de dicho radical como son, agentes quelantes del Fe³⁺ y la adición de Mn²⁺. Asimismo, se llevó a cabo en paralelo un experimento para comprobar si la cantidad de

radical hidroxilo producida en las distintas condiciones ensayadas, podría relacionarse directamente con el grado de decoloración alcanzado por un colorante de tipo azo (New Coccine).

En la Figura 4.5.A se muestra la dinámica de producción de radical hidroxilo en las distintas condiciones ensayadas. La mayor producción de $\cdot\text{OH}$ se alcanzó en presencia de oxalato como quelante de hierro y ausencia de manganeso. Por otro lado, se comprobó que el mayor grado de decoloración del New Coccine se producía en estas mismas condiciones (Figura 4.5.B). Asimismo, se pudo comprobar que existía una perfecta correlación entre la cantidad de $\cdot\text{OH}$ producido y el grado de decoloración alcanzado.

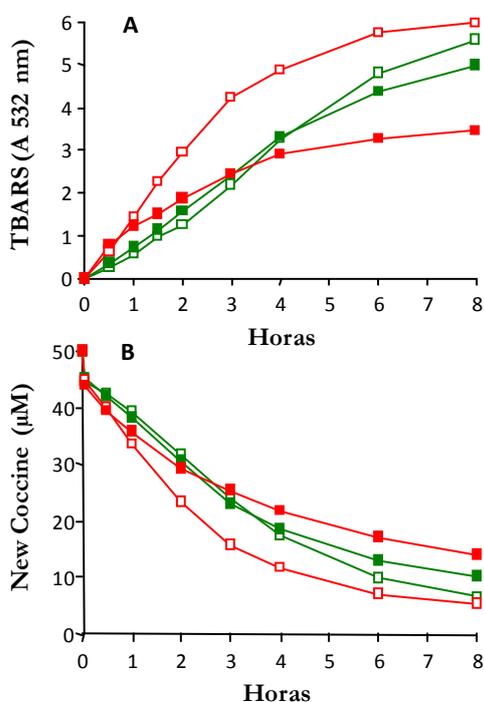


Figura 4.5. Producción de radical hidroxilo estimado como producción de TBARS (A) en presencia de oxalato (□), oxalato-Mn²⁺ (■), EDTA (□) y EDTA-Mn²⁺ (■) y decoloración de New Coccine (B) en las mismas condiciones.

4.1.2.3. Decoloración de colorantes textiles mediante radicales hidroxilo

Una vez establecidas las condiciones óptimas de producción de radical hidroxilo, se llevó a cabo el ensayo de decoloración de los ocho colorantes tipo azo ensayados con el sistema lacasa-acetosiringona. En la Figura 4.6 se muestra la cinética de decoloración de los colorantes por el

$\cdot\text{OH}$ generado mediante el ciclo redox de quinonas, en comparación con sus respectivos controles en ausencia de quinona y de complejo Fe³⁺-oxalato. En todos los casos, la oxidación avanzada fue muy efectiva a la hora de degradar los compuestos, obteniéndose porcentajes de decoloración tras 8 horas de incubación del 90 % en el caso del Orange II, Chromotrope 2R, Tartrazine y New Coccine; 85 % en el caso del Crocein Orange G y Acid Yellow 17; y finalmente, un 75 y un 70 % en el caso del Tropaeolin O y del Methyl Orange, respectivamente. En la mayor parte de los casos, el grado máximo de decoloración se alcanzó tras 4 horas de incubación con porcentajes que oscilaron del 70 al 82 %. Sin embargo, en la cinética de decoloración del Methyl Orange, parece que la pérdida de color es lineal a lo largo del tiempo de incubación.

4.1.2.4. Análisis de la toxicidad de los colorantes antes y después del proceso de decoloración

Al igual que en el caso de la decoloración llevada a cabo con el sistema lacasa-acetosiringona, se procedió al análisis de la toxicidad de los mismos colorantes (New Coccine, Orange II, Chromotrope 2R y Methyl Orange) antes y después del tratamiento de oxidación avanzada. El análisis de la toxicidad de estos colorantes demostró, que el $\cdot\text{OH}$ generado por el ciclo redox de quinonas es capaz no sólo de decolorar, sino también de destoxificar los compuestos analizados, como se muestra en la Figura 4.7, donde se observa una disminución del grado de toxicidad en todos los casos.

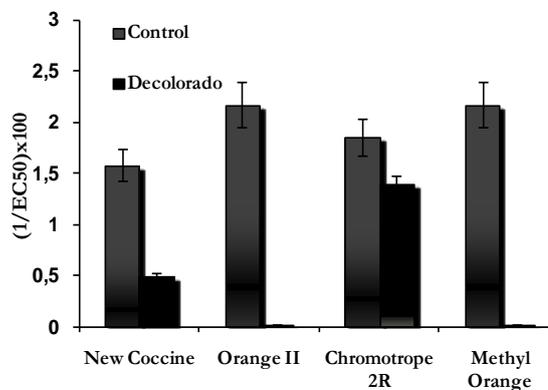


Figura 4.7. Grado de toxicidad de los colorantes antes (control) y después del tratamiento de oxidación avanzada (decolorado). El grado de toxicidad se expresa como $(1/EC50) \times 100$.

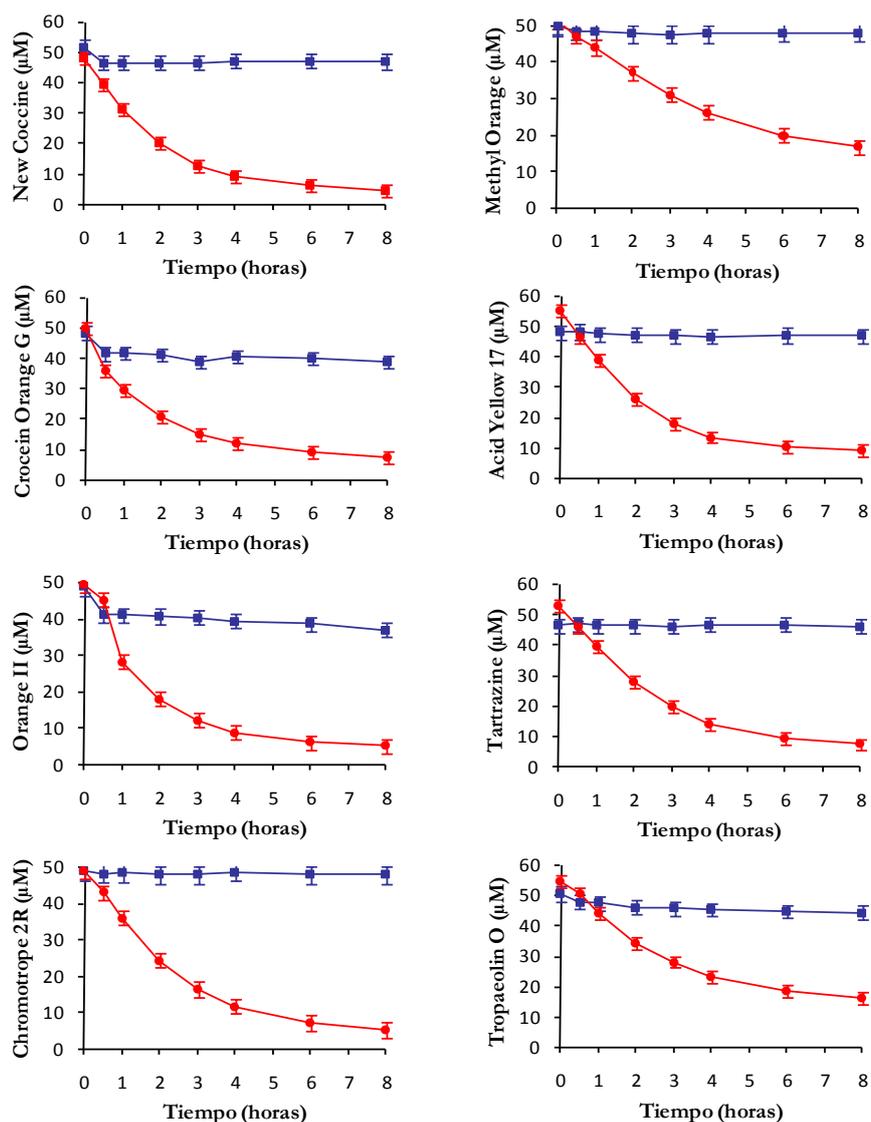


Figura 4.6. Cinética de decoloración de los colorantes de tipo azo mediante $\cdot\text{OH}$ inducido por ciclo redox de quinonas (—), con respecto al control sin quinona ni el complejo Fe^{3+} -oxalato (—).

4.1.2.5. Análisis mediante HPLC de los colorantes y de los productos de decoloración

Por último, para completar el estudio de la decoloración llevada a cabo por el tratamiento de oxidación avanzada, se realizó un análisis por HPLC-PDA de los mismos colorantes de los que se analizó el grado de toxicidad, antes y después del tratamiento. En la Figura 4.8 se muestran los perfiles cromatográficos correspondientes al Methyl Orange (Figura 4.8, cromatograma A, número 2) y al Orange II (Figura 4.8, cromatograma C, número 3) y a la quinona (Figura 4.8, cromatogramas A y C, número 1) antes de la inducción del $\cdot\text{OH}$ y tras 24 horas de tratamiento (Figura 4.8, cromatogramas B y D, respectivamente).

En el caso del Orange II, se observa una completa desaparición tanto del colorante como de la quinona (Figura 4.8, cromatograma D), mientras que en el caso del Methyl Orange se produce un descenso significativo del pico correspondiente al colorante y una desaparición del pico de la quinona (Figura 4.8, cromatograma B, número 2). En todos los casos se observó la aparición de compuestos no coloreados con distintos tiempos de retención y algunos de ellos con máximos de absorción alrededor de 280 nm en el perfil cromatográfico (R4, R5, R6, R7 y R8 en el cromatograma B y R9, R10, R11, R12 y R13 en el cromatograma D) como consecuencia de la acción del $\cdot\text{OH}$ sobre los compuestos.

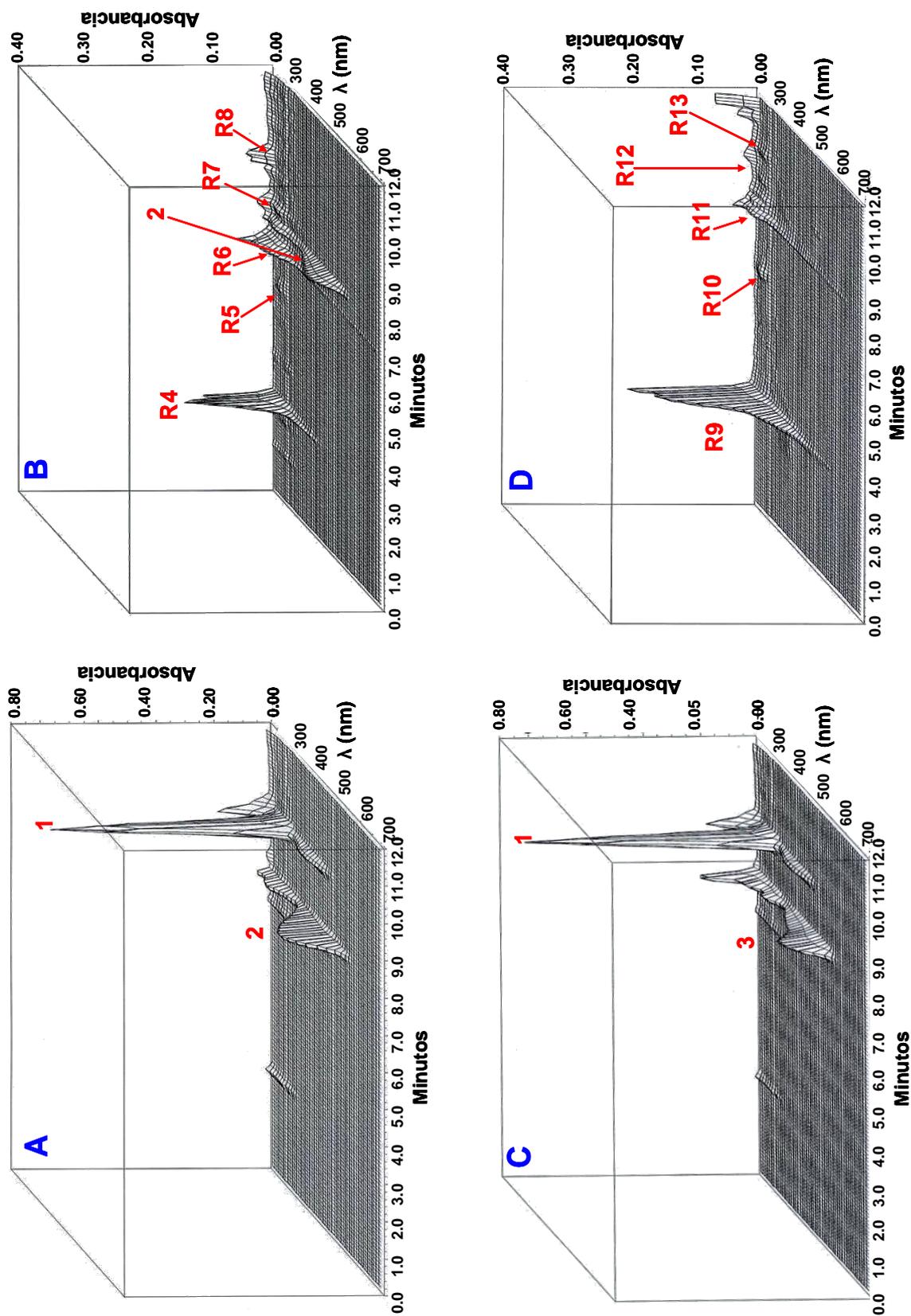


Figura 4.8. Cromatogramas obtenidos mediante PDA de los colorantes Methyl Orange y Orange II, antes y después del tratamiento de oxidación avanzada. Cromatograma A: Methyl Orange (2), 2,6-DBQ (1); cromatograma B: compuestos de degradación del Methyl Orange y/o la 2,6-DBQ (R4-R8); cromatograma C: Orange II (3), 2,6-DBQ (1); cromatograma D: compuestos de degradación del Orange II y/o la 2,6-DBQ (R9-R13).

Resultados

Además, se llevó a cabo la cuantificación tanto de los colorantes como de la quinona residual tras 24 horas de incubación. Para ello, se calculó el área de los picos obtenidos en los cromatogramas correspondientes a cada una de las distintas longitudes de onda características de cada compuesto, siendo la curva patrón obtenida para la 2,6-DBQ:

$$A=6.475c; (r=0,99; c=\mu\text{M})$$

Los resultados mostraron que salvo en el caso del colorante Methyl Orange, para el que se detectó una concentración residual de 10,15 μM , en el resto de compuestos, tanto colorantes como quinona, se observó la completa desaparición de los mismos, siendo las concentraciones iniciales de 50 y 500 μM , respectivamente.

4.2. Caracterización molecular y físico-química de la lacasa de *S. cyaneus*

4.2.1. Clonación del gen de la lacasa

Para la clonación del gen de la lacasa de *S. cyaneus* (*scLA*, *Streptomyces cyaneus* laccase), cuya proteína producto se llamó SclA, se siguieron los siguientes pasos (esquematisados en la Figura 3.2):

1) Obtención de un producto de PCR que formase parte del gen. Para ello, fue necesario diseñar los oligonucleótidos apropiados. Basándonos en que parte del gen de esta lacasa había sido secuenciado previamente y depositado en las bases de datos (Nº acceso GenBank: EF507879.1) utilizamos los extremos de dicha secuencia para el diseño de dos oligonucleótidos. El primero de ellos se basó en los 21 primeros nucleótidos de la secuencia, obteniéndose la siguiente composición de bases: 5' GTA CCC GGT CAC CTC GGT GGA 3'. Para la elección del segundo oligonucleótido nos basamos en los 21 últimos nucleótidos de la secuencia, de manera que la secuencia final sería: 5' TCG TTG GGC GCC AGC GGG ATC 3'. Ambos oligonucleótidos se usaron en una reacción de amplificación, de acuerdo a las condiciones descritas en el apartado 3.5.3.2, con una temperatura de anillamiento de 60 °C y empleando

como ADN molde una preparación del cromosoma de *S. cyaneus*. Se obtuvo así, una única banda, tal como se muestra en la Figura 4.9, con un tamaño aproximado de 1,3 kb.

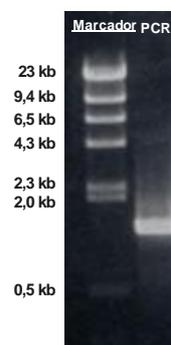


Figura 4.9. Gel de poliacrilamida en el que se muestra la amplificación por PCR de un fragmento de *scLA*.

2) Southern blot. El producto de PCR obtenido anteriormente, se marcó con digoxigenina con el fin de emplearlo como sonda para localizar, a través de una hibridación de Southern, un fragmento del cromosoma de *S. cyaneus* que contuviese el gen *scLA* completo. Previamente, el ADN cromosómico se digirió con las enzimas de restricción *SmaI*, *SaI*, *SacI*, *BamHI*, *KpnI* y tras someter los productos de dichas digestiones a una electroforesis, se transfirieron a una membrana sobre la que se añadió la sonda marcada para realizar la hibridación (Figura 4.10).

El revelado del Southern blot mostró una serie de señales positivas, destacando algunas de mayor intensidad en ciertas digestiones.

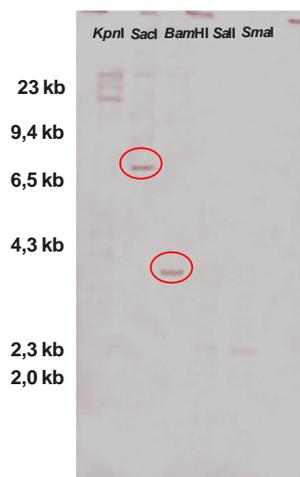


Figura 4.10. Detección de *scLA* en fragmentos cromosómicos por Southern blot. Los fragmentos seleccionados aparecen marcados con una línea roja.

3) Selección de positivos y clonación en pBSK. Teniendo en cuenta el tamaño de la proteína desnaturizada (75 kDa), se estimó que el gen *scIA* tendría un tamaño en torno a 2 kb, por lo que se escogieron las bandas correspondientes a las digestiones de *SacI* (7 kb aprox.) y *BamHI* (4 kb aprox.) puesto que su tamaño garantizaba la obtención del gen completo. Dichas bandas fueron purificadas a partir de la región equivalente en un gel preparativo, donde se cargó un mayor volumen de los productos de ambas digestiones del cromosoma. Los fragmentos de ADN purificados de ambas bandas se ligaron con el vector pBSK y a continuación, las ligaciones se utilizaron para transformar células competentes de la cepa DH10B de *E. coli*.

4) Hibridación de colonias en placa. Las colonias resultantes de la transformación fueron analizadas por hibridación en placa, empleando la misma sonda marcada del Southern anterior. Se analizaron unas cien colonias de cada ligación, obteniéndose un único positivo correspondiente a la transformación con fragmentos procedentes de la digestión con *SacI* (Figura 4.11).

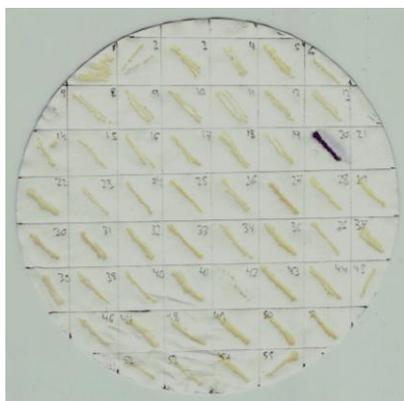


Figura 4.11. Hibridación en placa de transformantes portadores de fragmentos del cromosoma de *S. cyaneus*, obtenidos por digestión con *SacI*, en la que se observa, en color morado, la presencia de una colonia positiva.

El plásmido obtenido de la colonia positiva (pBSK-*ScIA*) se digirió con *SacI* para comprobar el tamaño del inserto, que resultó ser de aproximadamente 7 kb (Figura 4.12.A). Como comprobación adicional de la presencia del gen se realizó una amplificación del mismo con los

oligonucleótidos utilizados para la obtención de la sonda (Figura 4.12.B).

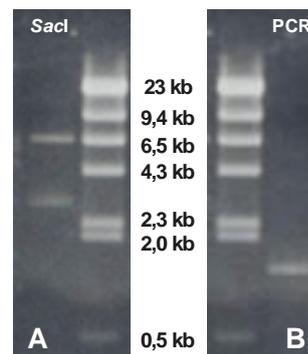


Figura 4.12. Electroforesis de los fragmentos obtenidos tras la digestión de pBSK-*ScIA* con *SacI* (A) y del producto de amplificación del gen (B).

5) Subclonación. Debido a que secuenciar dicho inserto resultaba una tarea costosa e innecesariamente larga por su elevado tamaño, se optó por subclonar dicho fragmento con el fin de conseguir un plásmido con un inserto menor que contuviera el gen completo *scIA*.

El primer paso de esta estrategia consistió en digerir pBSK-*ScIA* con una serie de enzimas de restricción que sólo cortaban el plásmido en el MCS (*Multiple Cloning Site*): *NotI*, *ApaI*, *SphI*, *SmaI* y *KpnI*. En paralelo se llevó a cabo la misma digestión con el producto de PCR obtenido al principio del proceso de clonación, para descartar que alguna de las enzimas cortara el propio gen. Para determinar cuál de los fragmentos resultantes de las digestiones (Figura 4.13.A) contenía el gen, se realizó un Southern blot con dichas digestiones y la misma sonda marcada empleada en todas las hibridaciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.13.B. Como se puede observar en la figura, en la digestión correspondiente a *SphI* se detectó un fragmento positivo con un tamaño aproximado de 2,5 kb que se seleccionó para ser purificado a partir de un gel preparativo y ligarlo en el plásmido pUC19. De esta manera, se obtuvo el plásmido pUC19-*ScIA* que se utilizó para la secuenciación del inserto con el fin de obtener la secuencia completa del gen *scIA*.

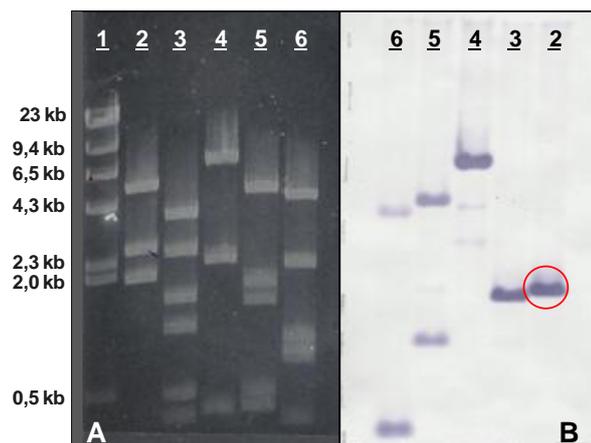


Figura 4.13. Selección de fragmentos de pBSK-SclA para subclonar el inserto. A) Electroforesis de los fragmentos obtenidos tras la digestión de pBSK-SclA. B) Hibridación de los fragmentos digeridos con la sonda marcada, rodeado por un círculo rojo el fragmento seleccionado. En ambas imágenes: 1; marcador de peso molecular; 2, digestión con *SphI*; 3, digestión con *ApaI*; 4, digestión con *NorI*; 5, digestión con *SmaI*; 6, digestión con *KpnI*.

4.2.1.1. Secuenciación y análisis de la secuencia

La secuenciación del inserto de pUC19-SclA dio como resultado un fragmento de ADN de 2572 pb, incluyendo los sitios *SphI* que lo flanqueaban. La búsqueda de marcos abiertos de lectura mediante el programa FRAMEPLOT llevó a la identificación de una región de 629 aminoácidos que se adaptaba a las características de tamaño determinadas para la proteína (Figura 4.14). A continuación, la secuencia se analizó por distintos métodos para su caracterización.

En primer lugar, se comparó la secuencia completa de esta región con las bases de datos disponibles en internet revelando un 85 y 81 % de similitud con las fenoxacinonas sintetas de *Streptomyces viridochromogenes* y *S. antibioticus*, respectivamente; un 79 % con la lacasa de *S. lavendulae*; un 73 % con la lacasa de *S. clavuligerus* y un 46 % con la de *S. griseus*. El resto de proteínas con las que presentaba alguna similitud eran oxidasas multicobre, aunque la semejanza hallada fue inferior al 50 %.

Por otro lado, la búsqueda de un posible péptido señal típico del sistema de secreción SEC, usando la herramienta SIGNALP (servidor EXPASY) mostró que aparentemente el gen de la lacasa de *S. cyaneus* carece de este tipo de péptido (Figura 4.15).

La secuencia se analizó también en busca de regiones conservadas. Las más características de las oxidasas multicobre son los dominios de unión a los átomos de cobre, que se caracterizan por la abundancia del aminoácido histidina. Así, en el caso de esta proteína, se pudieron identificar manualmente los cuatro dominios característicos, comprendidos entre los siguientes intervalos de proteínas: 142-161; 179-190; 504-520; 580-600. Además, la gran similitud que presentaba esta lacasa con la fenoxacinona sintasa de *S. antibioticus* nos llevó a realizar un estudio comparativo entre ambas más profundo, lo que permitió la identificación de una serie de secuencias reguladoras comunes a ambas, aguas arriba del gen.

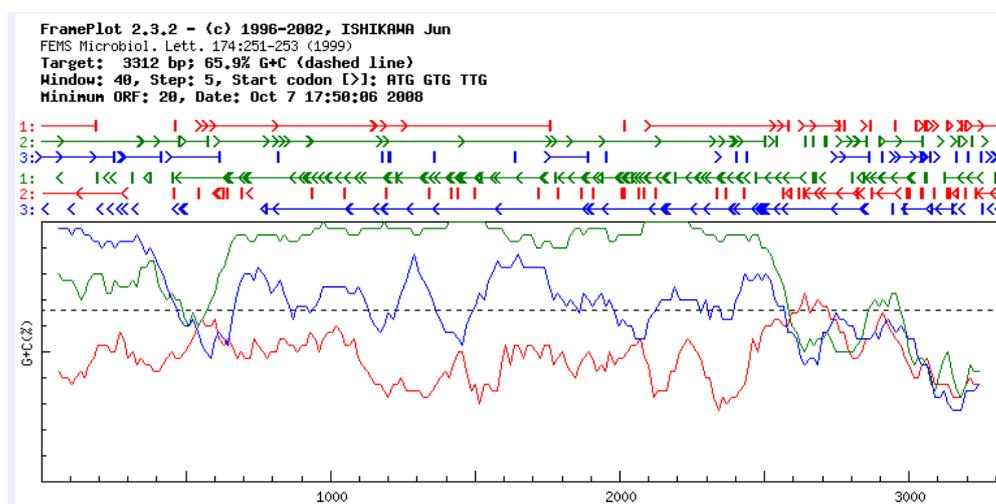


Figura 4.14. Estimación de la presencia de marcos abiertos de lectura mediante la herramienta FRAMEPLOT en la secuencia obtenida del inserto de pUC19-SclA. La línea verde indica con un % en G+C en la tercera posición de los codones cercano a 90, la presencia de un gen con la mayor probabilidad.

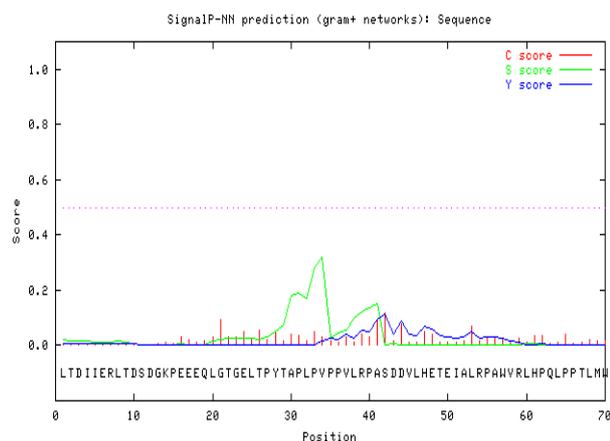


Figura 4.15. Estimación de la presencia de un péptido señal en la secuencia de SclA usando la herramienta SIGNALP. La línea verde indica la probabilidad de que un aminoácido pertenezca a un péptido señal; las líneas rojas indican la probabilidad de que un péptido señal se procese en ese punto; la línea azul es una combinación de las anteriores y mostraría una probabilidad de procesamiento del péptido señal más fiable.

La secuencia obtenida a partir del inserto de pUC19-SclA, así como las principales regiones identificadas en ella aparecen en la Figura 4.16.

Por último la secuencia de SclA fue analizada con las herramientas PROSITE, PFAM e INTERPROSCAN para la localización de regiones conservadas, identificando la presencia de varios motivos asociados a las oxidasas multicobre, con un alto nivel de confianza, tal como se muestra en la Tabla 4.7.

En la Figura 4.17 aparece una representación filogenética en forma de árbol donde se muestran las relaciones entre SclA y una serie de oxidasas multicobre de *Streptomyces*. La herramienta PROSITE nos permitió además realizar una comparación de las regiones de unión al cobre de algunas de ellas.

Tabla 4.7. Regiones conservadas identificadas en la secuencia de aminoácidos de SclA con las herramientas PROSITE, PFAM e INTERPROSCAN.

Herramienta	Aminoácidos	Base de datos	Motivo conservado	Nº acceso
PROSITE	581-601	pat	Multicopper_oxidase1	PS00079
PROSITE	586-597	pat	Multicopper_oxidase2	PS00080
PFAM	448-607	pfam	Cu_oxidase_2	PF07731
PFAM	57-133	pfam	Cu_oxidase_3	PF07732
PFAM	137-211	pfam	Cu_oxidase_3	PF07732
INTERPROSCAN	26-205	Interpro	Cupredoxin	IPR008972
INTERPROSCAN	206-364	Interpro	Cupredoxin	IPR008972
INTERPROSCAN	469-607	Interpro	Cupredoxin	IPR008972

El alineamiento de las regiones de unión al cobre de SclA y de algunas de estas proteínas se muestra en la Figura 4.18, pudiéndose apreciar diferencias notables entre ellas, tanto en el número de aminoácidos como en las propias secuencias. En rojo aparecen marcados los aminoácidos presentes en todas las secuencias; con el resto de colores se marcan los aminoácidos constantes en más de una secuencia pero que difieren del resto, siendo esta similitud mayor cuanto mayor es el grado de relación filogenética entre las secuencias.

4.2.2. Expresión heteróloga de la lacasa

Para lograr la sobreexpresión del gen *sclA* y obtener así elevadas cantidades de proteína, se empleó un sistema de expresión heterólogo utilizando *E. coli* como cepa receptora y un plásmido de tipo pET. Este tipo de plásmidos incluyen un promotor transcripcional del bacteriófago T7. Por otro lado, las cepas de *E. coli* empleadas contienen el gen de la ARN polimerasa, la cual es producida mediante la inducción con IPTG a través del promotor *lacUV5*. Además, algunos de estos vectores de tipo pET permiten la adición de una cola de histidinas a la proteína, facilitando su posterior purificación por cromatografía de afinidad.

Para lograr la expresión heteróloga de *sclA* se siguió el siguiente proceso:

1) Diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen. Para conseguir la inserción del gen en una posición adecuada en el plásmido pET28a(+) (Figura 4.19) era necesario añadir en los extremos del gen las dianas para las enzimas de restricción adecuadas.

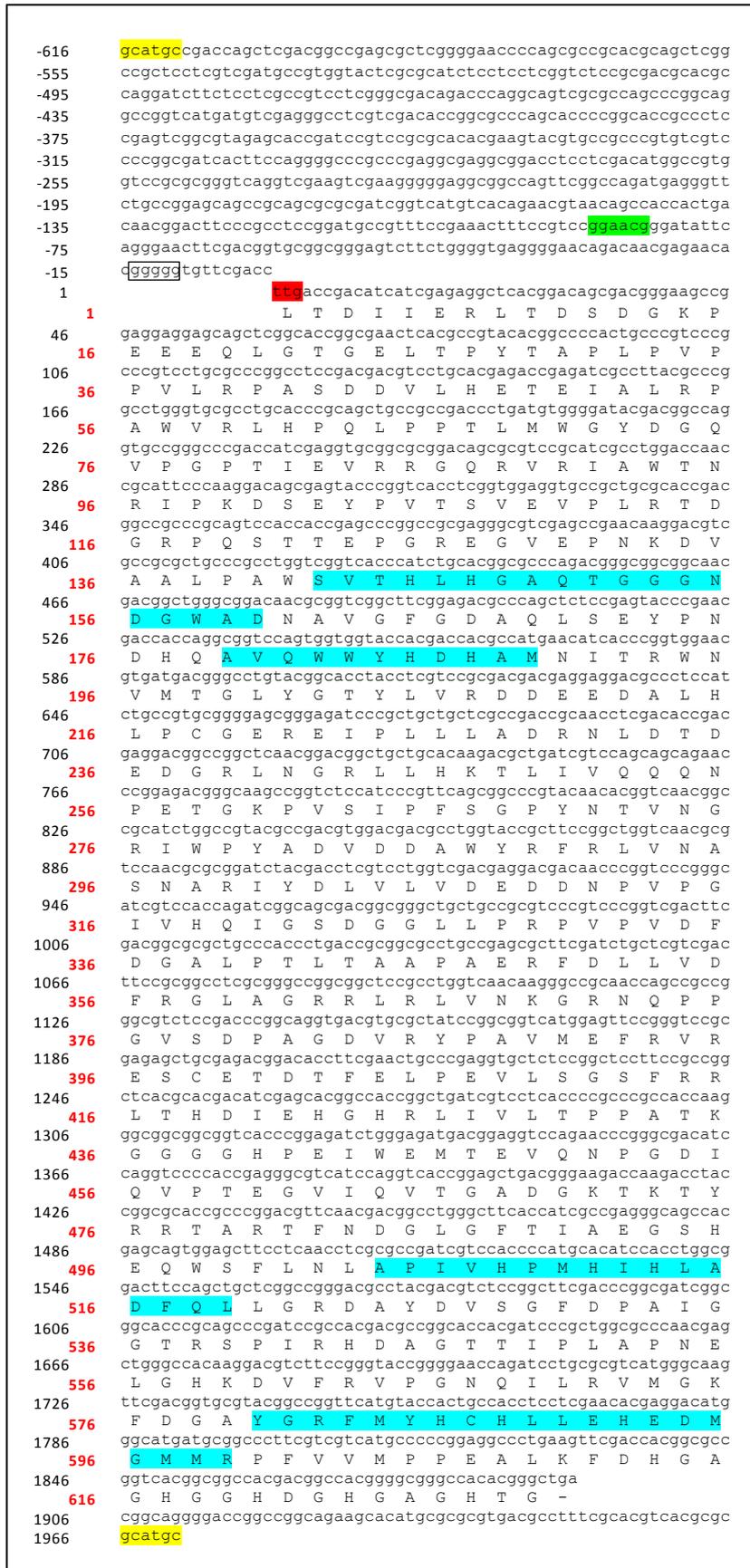


Figura 4.16. Secuencia del inserto de pUC19-SclA. En amarillo: los sitios de corte de la enzima *Sph*I; en rojo: el codón de iniciación; en azul: secuencias de unión al cobre; en verde y recuadro: regiones reguladoras.

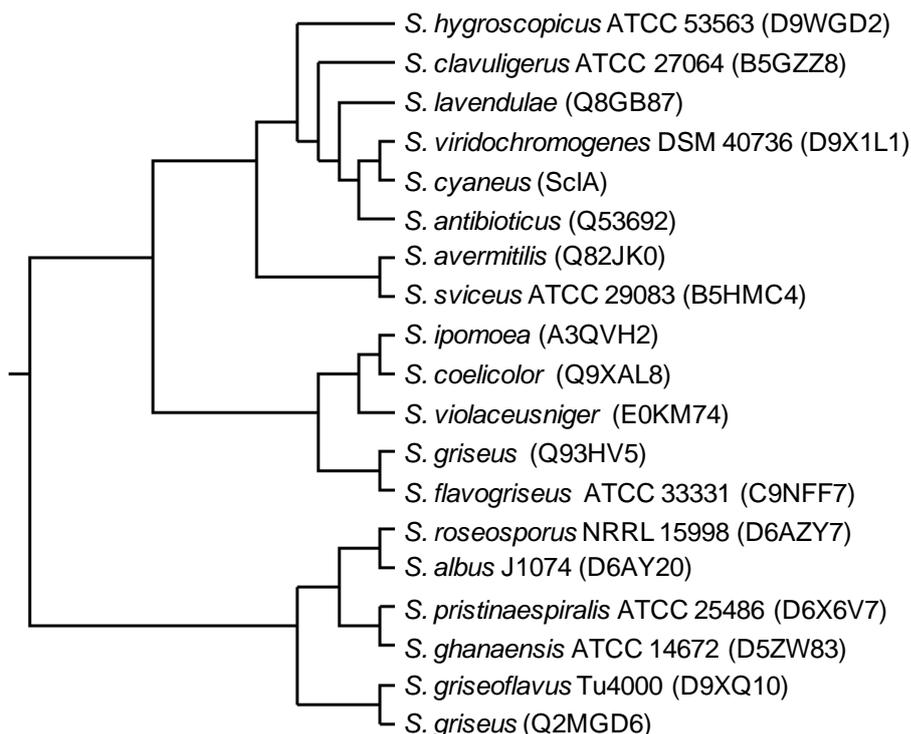


Figura 4.17. Relaciones filogenéticas entre las oxidasas multicobre de *Streptomyces* según el método del “Neighbour Joining”. Se indica la especie a la que pertenece la proteína y su número de acceso en UniProt.

Especie	Núm. acc.	aa	Primera secuencia de unión al cobre	Segunda secuencia de unión al cobre
<i>S. ipomoea</i>	A3QVH2	335	99 A S L H V H G L D Y E I S S D G T A M	150 A G · Y W H Y H D H V V
<i>S.coelicolor</i>	Q9XAL8	343	99 A S L H V H G L D Y E I S S D G T A M	150 A G · Y W H Y H D H V V
<i>S. griseus</i>	Q93HV5	348	99 A S L H V H G V D Y D I A N D G T R M	150 A G · Y W H Y H D H V V
<i>S. griseus</i>	Q2MGD6	729	316 V T L H W H G V D V P N A E D G V A G	355 A G T F W · Y H S H Q Q
<i>S. albus J1074</i>	D6AY20	539	122 T S L H W H G L A L R N D M D G V P G	162 P G T Y W · F H P H S G
<i>S. lavendulae</i>	Q8GB87	631	142 T V T H L H G A Q T G G G N D G W A D	179 A V Q W W · Y H D H A M
<i>S. antibioticus</i>	Q53692	642	158 S V T H L H G A Q T G G G N D G W A D	195 A T Q W W · Y H D H A M
<i>S. cyaneus</i>	629	141	S V T H L H G A Q T G G G N D G W A D	178 A V Q W W · Y H D H A M
<i>S. avermitilis</i>	Q82JK0	482	111 T T V H F H G A H I P P K M D G G P Q	148 A K T L W · Y H P H A L

Especie	Núm. acc.	aa	Tercera secuencia de unión al cobre	Cuarta secuencia de unión al cobre
<i>S. ipomoea</i>	A3QVH2	335	227 G E Y Y H T F H M H G H R W A D	281 A G A W M Y H C H V Q S H S D M G M V G
<i>S.coelicolor</i>	Q9XAL8	343	227 G E Y Y H T F H M H G H R W A D	281 A G A W M Y H C H V Q S H S D M G M V G
<i>S. griseus</i>	Q93HV5	348	227 G E F Y H T F H I H G H R W A D	281 A G A W M Y H C H V Q S H S D M G M A G
<i>S. griseus</i>	Q2MGD6	729	638 S L D D H P M H L H G H R M L V	688 P G L W M D H C H N L D H A R D G M V L
<i>S. albus J1074</i>	D6AY20	539	471 T D M W H P L H L H G H T F A L	514 P G L W M L H C H N V Y H A E A G M M T
<i>S. lavendulae</i>	Q8GB87	631	507 P P V V H P M H I H L A D F Q I	583 Y G R F M Y H C H L L E H E D M G M M R
<i>S. antibioticus</i>	Q53692	642	520 S P I L H P M H I H L A D F Q V	596 Y G R F M Y H C H L L E H E D M G M M R
<i>S. cyaneus</i>	629	503	A P I V H P M H I H L A D F Q L	579 Y G R F M Y H C H L L E H E D M G M M R
<i>S. avermitilis</i>	Q82JK0	482	401 T Q L E H S F H L H D V P F Q L	456 T Y M Y M L H C H L L Q H E D E G M M A

Figura 4.18. Alineamiento de las secuencias del cobre entre SciA y otras oxidasas multicobre de *Streptomyces*.

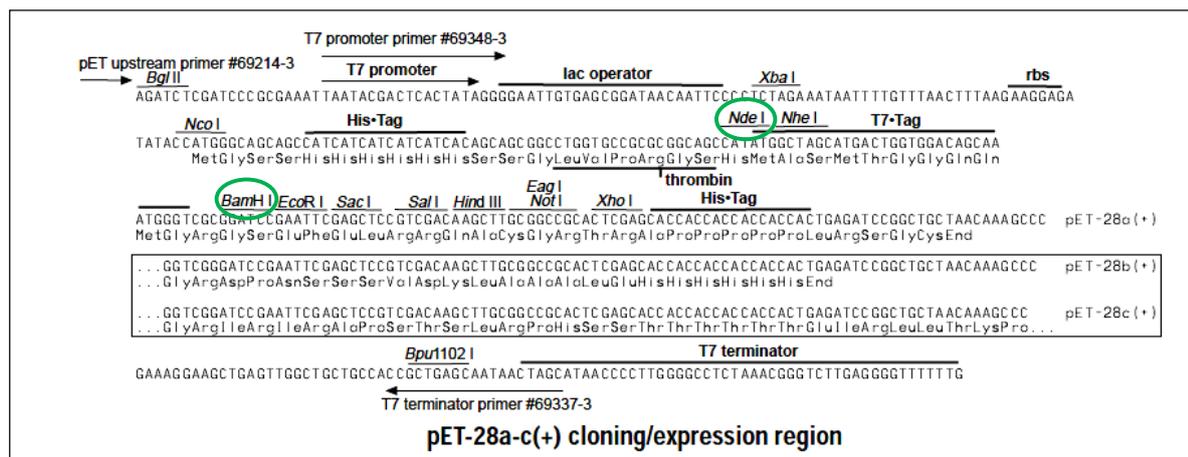


Figura 4.19. Región de clonación múltiple del plásmido pET28. En color verde se indican las dianas de restricción donde se insertó *scfA*.

Para el extremo 5', la diana elegida fue *NdeI* cuya secuencia de reconocimiento es CATATG, con lo que el oligonucleótido se diseñó coincidente con el inicio de *scfA*. Gracias a que *NdeI* corta en el centro de dicha secuencia se puede mantener el marco de lectura sin alterar la traducción correcta del gen. Además, la traducción comienza a partir del sitio *NcoI*, aguas arriba del gen, lo que permite añadir a la secuencia de la proteína en su extremo 5' una cola de histidinas. En cuanto al extremo 3', el oligonucleótido incluyó los últimos tripletes del gen junto a la diana para *BamHI*. La secuencia final para ambos oligonucleótidos, mostrando en cursiva las dianas para las enzimas de restricción, fue la siguiente:

- Extremo N-terminal:

5' TGT *CATATG* TTG ACC GAC ATC ATC
GAG A 3'

- Extremo C-terminal:

5' CCC *GGATCC* TCA GCC CGT GTG
GCC CGC C 3'

En la Figura 4.20 se muestra el producto único de amplificación obtenido mediante la técnica de PCR, empleando los oligonucleótidos descritos anteriormente.

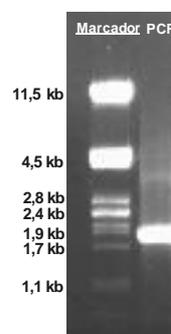


Figura 4.20. Gel de agarosa en el que se muestra la amplificación por PCR de *scfA* para su clonación en el vector pET28a.

Este producto de PCR se ligó entonces al vector pET28a, digerido previamente con las mismas enzimas de restricción, lo que daría lugar al plásmido pET28-*ScfA*. La ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa de *E. coli* DH10B y a continuación, de las colonias obtenidas se analizaron seis de ellas para comprobar la presencia de la construcción correcta mediante digestión con *BamHI* (Figura 4.21.A). Algunas de estas construcciones, se analizaron mediante una digestión adicional con *BglII*, que al poseer un sitio de corte tanto en el MCS del plásmido como en la secuencia de *scfA* (ver Figura 4.36) da lugar a la obtención de dos fragmentos de tamaños aproximadamente de 5,5 y 1,5 kb (Figura 4.21.B).

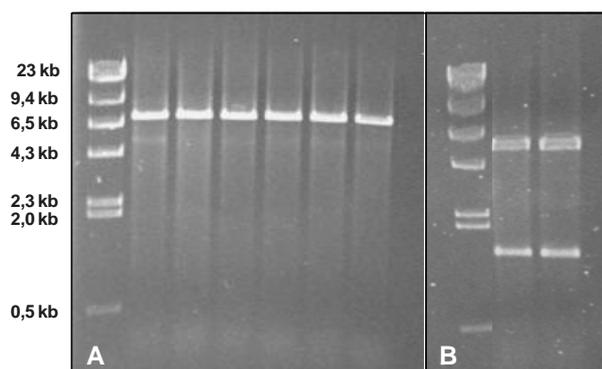


Figura 4.21. Comprobación de los plásmidos pET28-SclA. A) Digestión de los plásmidos con *Bam*HI. B) Digestión de dos de los plásmidos con *Bgl*II.

Uno de los plásmidos positivos obtenidos se utilizó entonces para transformar células competentes de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* y poder así estudiar la inducción y expresión de la proteína. Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.5.9. El análisis por electroforesis de las proteínas totales, obtenidas tras la incubación de las células transformadas a 37 °C y su inducción con IPTG, mostró la presencia de una banda mayoritaria como correspondería a una proteína sobreexpresada con este sistema y con un peso molecular muy similar al estimado para la proteína (Figura 4.22).

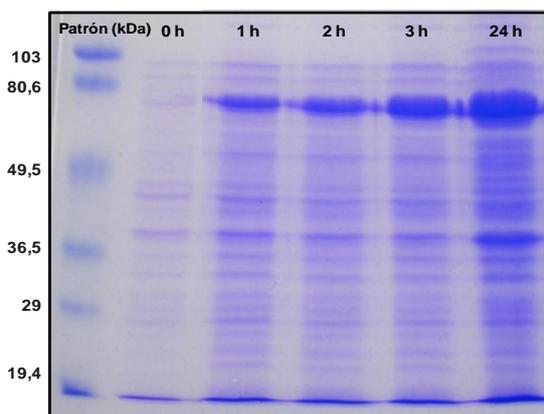


Figura 4.22. Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas totales de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET28-SclA y tras la inducción con IPTG. Se muestran las proteínas desnaturizadas a distintos tiempos tras la adición del IPTG.

Sin embargo, cuando se analizaron por separado las fracciones citoplasmáticas soluble e insoluble, prácticamente la totalidad de la proteína se encontraba en forma insoluble durante todo el

tiempo transcurrido desde la inducción (Figura 4.23).

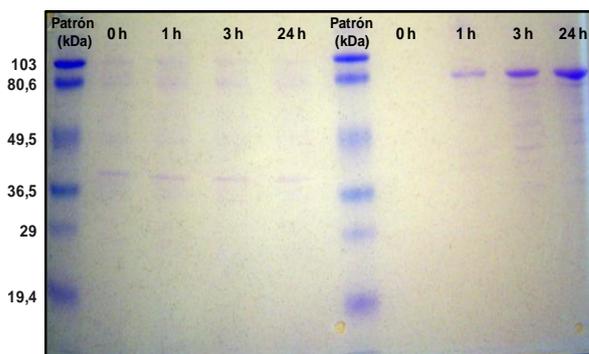


Figura 4.23. Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas de la fracción citoplasmática soluble (izquierda) e insoluble (derecha) de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET28-SclA y tras la inducción con IPTG. Se muestran las proteínas desnaturizadas a distintos tiempos tras la adición del IPTG.

Con el fin de aumentar la cantidad de enzima en la fracción soluble, se probó el efecto de reducir la temperatura del cultivo a 28 °C tras la inducción, así como disminuir la concentración final de IPTG empleado hasta 0,5 mM. No obstante, pudimos comprobar de nuevo que prácticamente toda la proteína sobreexpresada se encontraba en forma de cuerpos de inclusión en la fracción insoluble o en algunos casos descendió el nivel de sobreexpresión (datos no mostrados).

Finalmente, se optó por reducir la temperatura de incubación tras la inducción hasta 16 °C alargando el tiempo total de incubación a 48 horas. En primer lugar, se comprobó, a través del análisis de las proteínas totales, que el sistema de expresión seguía funcionando a esta temperatura (Figura 4.24.A) En la Figura 4.24.B se puede observar la aparición de una banda muy tenue en la fracción citoplasmática soluble correspondiente a la proteína sobreexpresada. De este modo, se determinó que la temperatura óptima de producción era de 16 °C y el momento apropiado para detener el cultivo, tras 48 horas de la inducción, puesto que la relación entre cantidad de proteína sobreexpresada y disponibilidad de la misma en forma soluble, era la idónea.

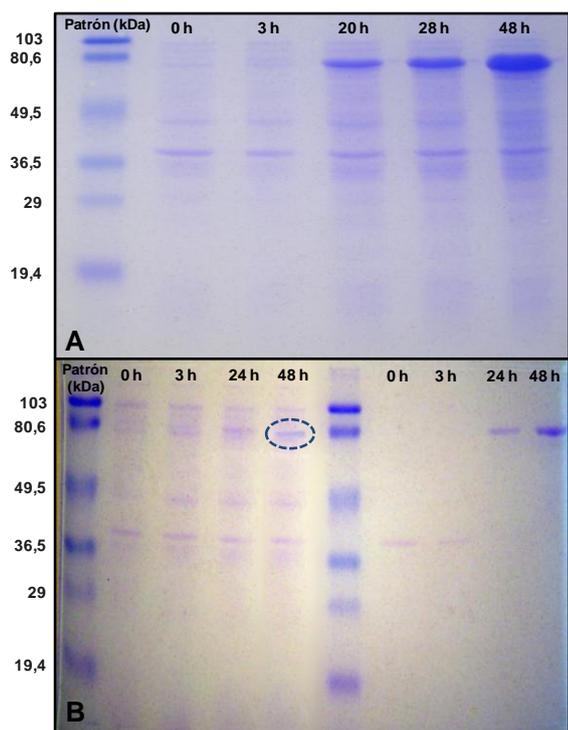


Figura 4.24. Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas totales (A) y de la fracción soluble (B, izquierda) e insoluble (B, derecha) de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET28-SclA e incubada a 16 °C. Se muestran las proteínas desnaturalizadas a distintos tiempos tras la adición del IPTG.

Para poder estimar la actividad lacasa en todas las condiciones ensayadas, la fracción soluble se incubó durante 3 horas en presencia de sulfato de cobre 1 mM y posteriormente se dializó. Para descartar que la oxidación del sustrato se produjese por alguna enzima constitutiva de *E. coli*, se utilizó como control una muestra obtenida en el momento previo a la inducción con IPTG. Así, la actividad lacasa total obtenida para un cultivo incubado a 16 °C fue de 4 y 48 U l⁻¹ aproximadamente, a las 24 y 48 horas tras la inducción con IPTG, respectivamente.

Por último, la conversión de la enzima en su forma activa también se verificó a través de zimogramas. La actividad lacasa presente en la fracción soluble se puso de manifiesto en geles de poliacrilamida empleando los sustratos ABTS y 2,6-dimetoxifenol y adicionando Cu²⁺ a la solución (Figura 4.25).

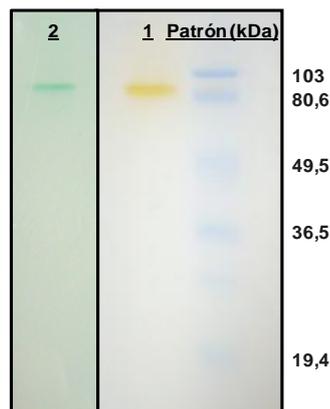


Figura 4.25. Zimograma de la fracción citoplasmática soluble realizado con 2,6-dimetoxifenol (1) y ABTS (2).

4.2.2.1. Recuperación de la proteína a partir de los cuerpos de inclusión

Como alternativa a la obtención de una mayor cantidad de la enzima en la fracción soluble, se ensayó un método para la recuperación de la misma a partir de los cuerpos de inclusión.

Para ello, a partir de un precipitado celular de *E. coli* procedente de 1 l de medio LB e incubado según las condiciones descritas en el apartado 3.5.10, se siguió la metodología descrita por Colombo *et al.* (2001) para la solubilización de proteínas a partir de cuerpos de inclusión producidos por *E. coli*.

Los resultados obtenidos mostraron que el proceso no fue eficaz a la hora de aumentar los niveles de enzima soluble. Tras la renaturalización de la enzima mediante diálisis en presencia del agente reductor DTE y su posterior diálisis para eliminar los restos del mismo, que podrían enmascarar la oxidación del sustrato ABTS, se cuantificó la actividad lacasa recuperada siendo los valores obtenidos de 160 mU ml⁻¹. Es decir, a partir de 1 l de cultivo se obtendría una actividad total de 2,4 U, lo que supone un 95 % menos que lo obtenido en las condiciones óptimas descritas en el apartado anterior.

Tabla 4.8. Rendimiento y grado de purificación de la lacasa recombinante en cada etapa del proceso de purificación.

Paso de purificación	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Factor purificación	Rendimiento (%)
Caldo de cultivo	32	217,5	0,147	1,0	100
Fracción recogida tras la cromatografía	12,25	52	0,236	1,6	38,3
Electroelución	6,1	3,12	1,95	13,2	19

4.2.3. Producción y purificación de la lacasa recombinante

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la expresión de la enzima y la obtención de su forma activa, se planteó su producción en las condiciones óptimas descritas en el apartado anterior. La enzima activa se purificó por cromatografía de afinidad, a partir del sobrenadante del extracto crudo obtenido tras la ruptura de las células de *E. coli*, tras la incubación con cobre y diálisis.

Aunque el grado de purificación obtenido fue relativamente alto cuando se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, el rendimiento obtenido fue bajo ya que la pérdida de actividad total fue alrededor del 60 %. Con el fin de obtener la enzima en un grado de purificación mayor (Figura 4.26), aumentando así su actividad específica, se llevó a cabo un último paso de purificación mediante electroelución.

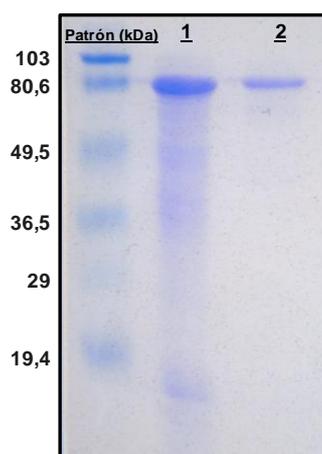


Figura 4.26. SDS-PAGE de SclA tras la electroelución (2) a partir de la fracción soluble procedente de la ruptura de células de *E. coli* (1).

En la Tabla 4.8 se muestra un resumen de los resultados obtenidos durante el proceso de purificación.

4.2.4. Caracterización físico-química y cinética de la enzima recombinante

4.2.4.1. Características físico-químicas

4.2.4.1.1. pH óptimo de reacción y estabilidad al pH

La enzima presentó su máximo de actividad a pH ácido para los dos sustratos utilizados: en el caso del ABTS, fue de 4,5 mientras que para el 2,6-dimetoxifenol fue inferior, próximo a 3 (Figura 4.27).

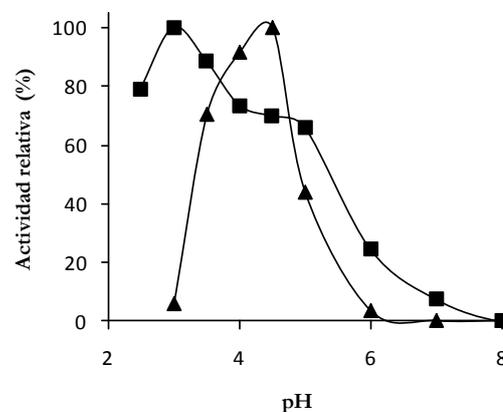


Figura 4.27. pH óptimo de reacción de SclA frente a distintos sustratos. (▲) ABTS, (■) 2,6-dimetoxifenol.

En cuanto a la estabilidad de la enzima frente al pH, cuando ésta se incubó en un rango de 3 a 9 durante 4 horas se pudo observar una pérdida de actividad a los valores de pH más ácidos mientras que a partir de un pH con valor de 6, la enzima se mantuvo estable e incluso la actividad detectada se incrementó respecto a la inicial (Figura 4.28).

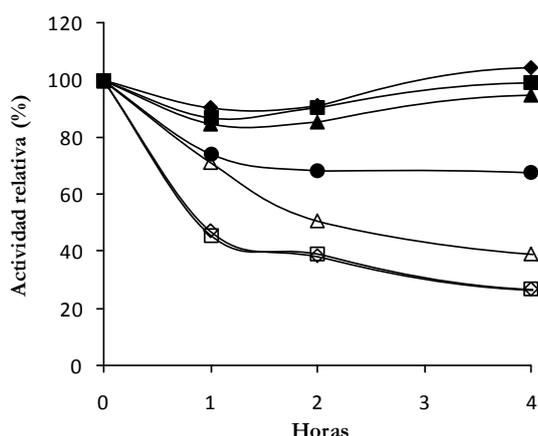


Figura 4.28. Estabilidad al pH de SclA. (⊗) pH 3; (□) pH 4; (△) pH 5; (●) pH 6; (◆) pH 7; (▲) pH 8; (■) pH 9.

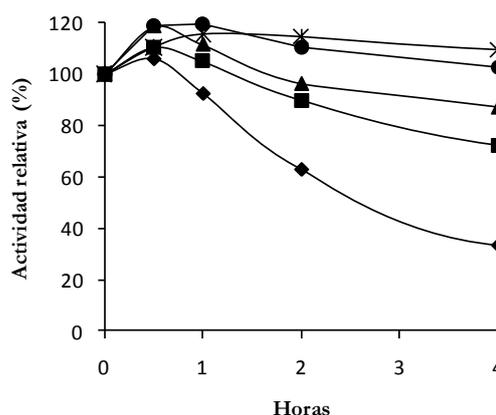


Figura 4.30. Estabilidad a la temperatura de SclA. (×) 30 °C; (●) 40 °C; (▲) 50 °C; (■) 60 °C; (◆) 70 °C.

4.2.4.1.2. Temperatura óptima de reacción y estabilidad a la temperatura

La temperatura óptima de reacción de la lacasa recombinante fue aproximadamente de 70 °C. Además, en el rango de 60 a 80 °C la actividad fue superior al 75 % de la máxima detectada (Figura 4.29).

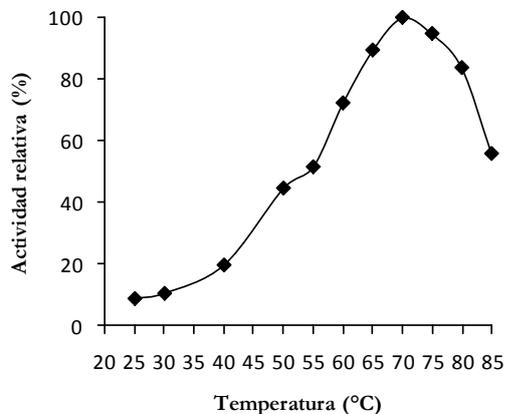


Figura 4.29. Temperatura óptima de reacción de SclA.

Cuando la enzima se incubó a distintas temperaturas se pudo comprobar que poseía una elevada tolerancia a la temperatura, observándose incluso un aumento de la actividad inicial al inicio del período de incubación. Tras 4 horas de incubación a 50 y 60 °C, la enzima mantuvo más del 50 % de la actividad inicial (Figura 4.30).

4.2.4.1.3. Masa molecular

La determinación de la masa molecular de la enzima recombinante en función de su posición en un gel SDS-PAGE dio como resultado un valor de aproximadamente 77,2 kDa para la proteína en su forma desnaturalizada. El cálculo se llevó a cabo a partir de una curva de calibración cuya ecuación de la recta se muestra en la Figura 4.31.

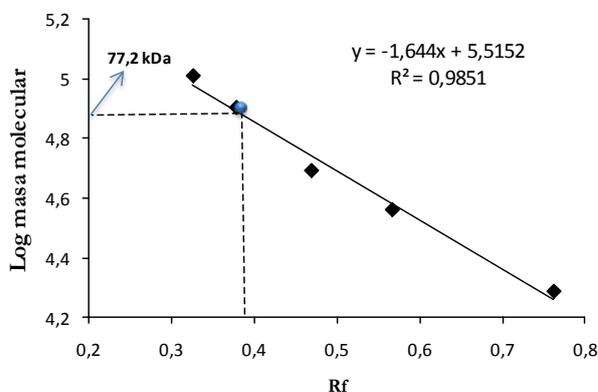


Figura 4.31. Curva de calibración para la determinación de la masa molecular de SclA por electroforesis en gel de poliacrilamida.

4.2.4.1.4. Punto isoelectrico

Para el cálculo del punto isoelectrico, la lacasa recombinante se sometió a un isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. La posición de la banda, trasladada a una recta de regresión (Figura 4.32) dio como resultado un valor de 6,37.

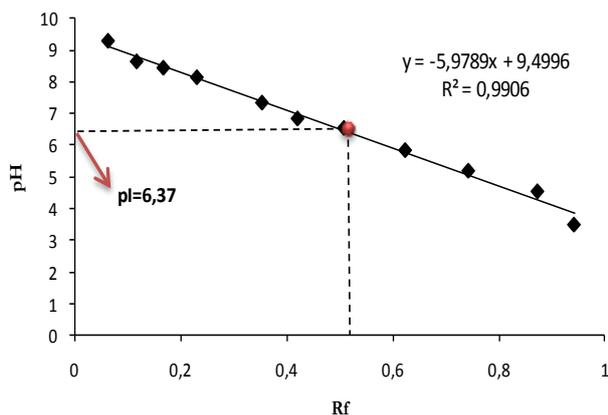


Figura 4.32. Curva de calibración para la determinación del punto isoeléctrico de SclA por isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida.

4.2.4.2. Características cinéticas

Las constantes cinéticas de la enzima recombinante (K_m , $V_{m\acute{a}x}$) se determinaron frente al sustrato ABTS. En el caso del 2,6-dimetoxifenol no fue posible calcular el valor de esta constante debido a que a concentraciones superiores a 0,1 mM de sustrato, se observó una fuerte inhibición de la actividad enzimática. Las constantes K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se calcularon a partir de representaciones de Lineweaver-Burk, obteniéndose un valor de 0,063 mM para la K_m y de 126,58 mU para la $V_{m\acute{a}x}$ para el sustrato ABTS (Figura 4.33).

4.2.4.3. Oxidación de un compuesto no fenólico en presencia de un mediador redox

Para evaluar la capacidad de SclA para oxidar de manera indirecta un compuesto que no es sustrato de la enzima, se seleccionó el colorante de

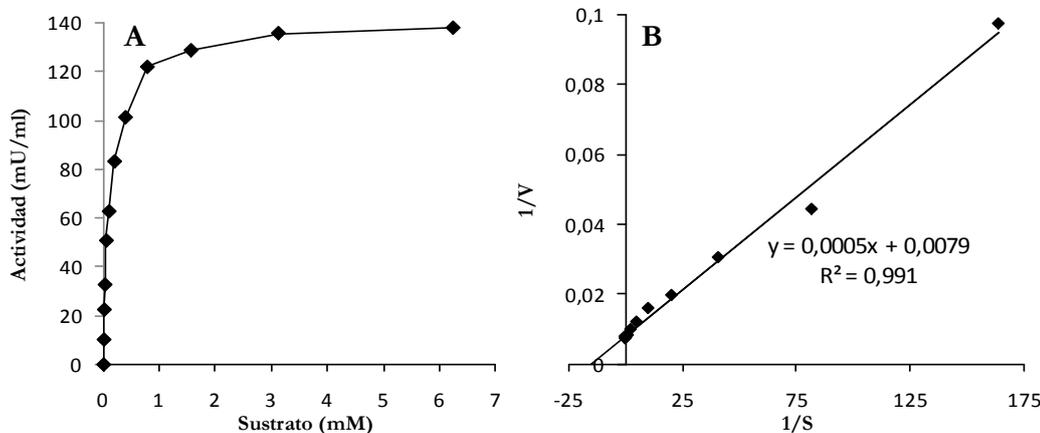


Figura 4.33. Determinación de la K_m de SclA empleando ABTS como sustrato. A) Relación entre la actividad y la concentración de sustrato. B) Representación de Lineweaver-Burk.

tipo azo Methyl Orange como compuesto modelo y la acetosiringona como mediador.

Los resultados del proceso de decoloración mostraron que la enzima fue capaz de degradar un 50 % aproximadamente del total de colorante inicial en tan sólo 30 minutos (Figura 4.34).

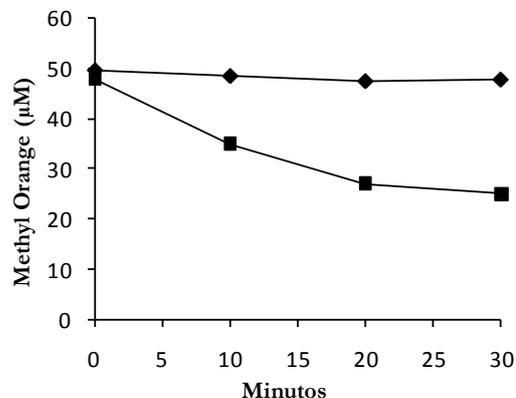


Figura 4.34. Degradación del colorante Methyl Orange por SclA en presencia de acetosiringona (■) en comparación con el control con enzima inactivada (◆).

4.3. Abordaje del estudio de la función de la lacasa en la cepa productora *S. cyaneus*

4.3.1. Obtención de un mutante no productor de lacasa de *S. cyaneus* (*S. cyaneus* SclA⁻)

Para la obtención de un mutante de *S. cyaneus* no productor de lacasa, se realizó en primer lugar, un mapa de restricción del gen con la herramienta NebCutter. Así, se pudieron establecer los sitios de restricción de dos enzimas de interés (*Bgl*II y *Pvu*II) que nos ayudarían a localizar el gen dentro del fragmento *Sac*I/*Sac*I del plásmido pBSK-SclA.

Estos sitios de restricción se localizaron dentro de la secuencia del gen en las posiciones 1.325 en el caso de *Bgl*II y 189 y 1.554 en el caso de *Pvu*II. A continuación, se llevaron a cabo una serie de digestiones sencillas y dobles con las enzimas *Sac*I y *Bgl*II del fragmento *Sac*I/*Sac*I y con *Pvu*II de los fragmentos purificados a partir de las digestiones anteriores (Figura 4.35), que permitieron elaborar un mapa con la localización y orientación de *sclA* dentro del fragmento *Sac*I/*Sac*I del plásmido pBSK-*SclA* (Figura 4.36). La clave para conocer la orientación exacta del gen fue la obtención de un fragmento de 1,1 kb resultante de la digestión del fragmento de 2,5 kb con *Pvu*II (rodeado por un círculo rojo en 3, Figura 4.35). Debido a que la distancia del gen al plásmido en uno de los extremos del gen era tan sólo de 1 kb, se optó por la técnica de interrupción génica en lugar de la de reemplazamiento génico, para la obtención del mutante, ya que para que tenga lugar esta última, es necesario que se produzca un doble sobrecruzamiento que ocurrirá con una mayor probabilidad cuanto mayor sea el tamaño del ADN que queda a ambos lados del gen a mutar.

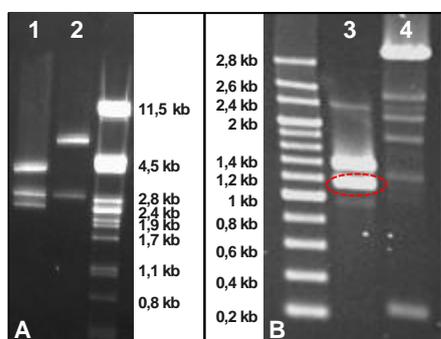


Figura 4.35. A) Electroforesis de los fragmentos procedentes de las digestiones de pBSK-*SclA* con *Sac*I (2) y *Sac*I+*Bgl*II (1). B) Electroforesis de las digestiones con *Pvu*II de los fragmentos de 2,5 (3) y 4,5 kb (4) procedentes de la digestión 1.

Una vez que se optó por la técnica de interrupción génica, fue preciso en primer lugar, amplificar una porción interna del gen de aproximadamente 1,3 kb, a la que se denominó *SclA*1 (Figura 4.37). Para ello, se utilizaron los mismos oligonucleótidos empleados para la obtención de la sonda en la clonación del gen *sclA*.

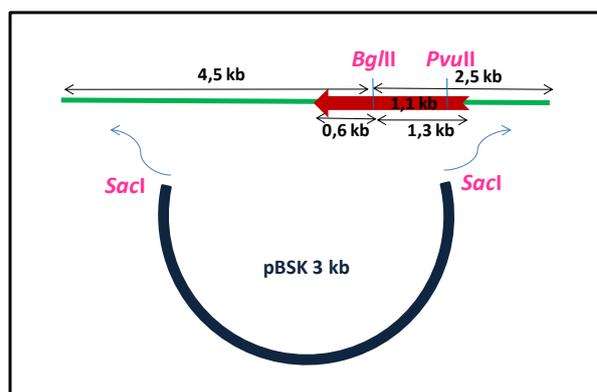


Figura 4.36. Localización y orientación del gen *sclA* (flecha roja) en el fragmento *Sac*I/*Sac*I de pBSK-*SclA*.

El producto de amplificación se clonó en primer lugar en el vector PCR®-Blunt con el fin de disponer en gran cantidad del mismo. Seguidamente, se clonó en el sitio *Eco*RI del vector pOJ216 que contenía además el promotor de la eritromicina (*ermE**p), para evitar efectos polares sobre la expresión de otros genes.

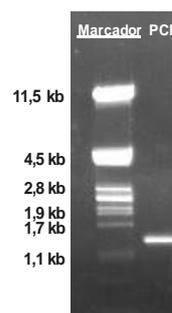


Figura 4.37. Gel de agarosa en el que se muestra la amplificación por PCR de un fragmento de *sclA* (SclA1) para su clonación en el vector pOJ216.

En la Figura 4.38 se muestra la construcción obtenida pOJ216-*SclA*1 así como un esquema del proceso de interrupción génica por sobrecruzamiento sencillo.

Una vez comprobado mediante una serie de digestiones que la construcción poseía la orientación correcta del fragmento génico, se utilizó para transformar células electrocompetentes de la cepa ET12567 (pUB307) de *E. coli*. A continuación, se llevó a cabo la conjugación con esporas de *S. cyanus*, seleccionándose aquellas esporas portadoras de la mutación gracias a su resistencia a apramicina, conferida por el plásmido pOJ260.

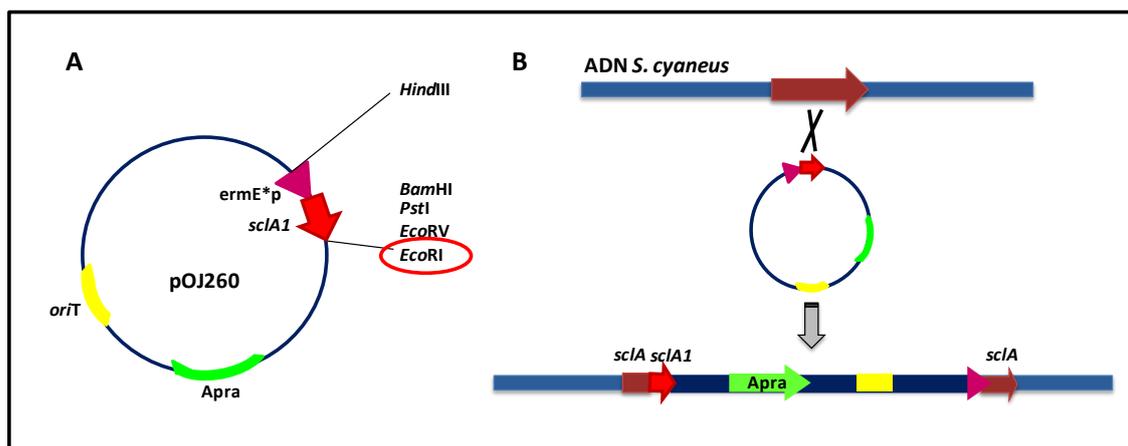


Figura 4.38. Construcción de pOJ216-SclA1 (A) y esquema del proceso de inserción de la construcción en el ADN cromosómico de *S. cyaneus* mediante sobrecruzamiento sencillo (B).

4.3.1.1. Comprobación de la obtención del mutante *S. cyaneus* SclA⁻

La comprobación de que la mutación del gen *sclA* se había llevado a cabo de forma correcta, se realizó de dos maneras, a nivel molecular y bioquímico.

4.3.1.1.1. Nivel molecular

A partir de preparaciones de ADN cromosómico de las cepas silvestre y mutante de *S. cyaneus*, se llevó a cabo una digestión de las mismas con la enzima *SphI*. Los productos de digestión se transfirieron a una membrana con el fin de realizar una hibridación de Southern, en la que se empleó la construcción pOJ216-SclA1 como sonda marcada. El revelado del Southern blot (Figura 4.39) mostró una señal positiva en el ADN cromosómico de *S. cyaneus* SclA⁻ de mayor tamaño (7 kb aprox.), debido a la inserción de la construcción pOJ216-SclA1 en el ADN del microorganismo mediante sobrecruzamiento sencillo.

4.3.1.1.2. Nivel bioquímico

Para detectar la ausencia de actividad lacasa en la cepa *S. cyaneus* SclA⁻, se realizaron cultivos tanto de la cepa mutante como silvestre en el medio MS sólido y líquido.

En el ensayo de detección de la actividad en medio sólido suplementado con ABTS, a los 5 días de incubación a 28 °C, se pudo observar un

halo verdoso rodeando a la colonia de la cepa silvestre, a consecuencia de la oxidación del sustrato por la enzima. Sin embargo, en la cepa mutante no se pudo observar la aparición de dicho halo (Figura 4.40).

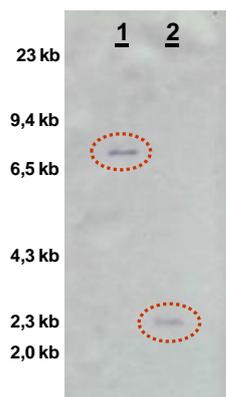


Figura 4.39. Hibridación de Southern del ADN cromosómico de *S. cyaneus* SclA⁻ (1) y de *S. cyaneus* (2) digerido con *SphI*.

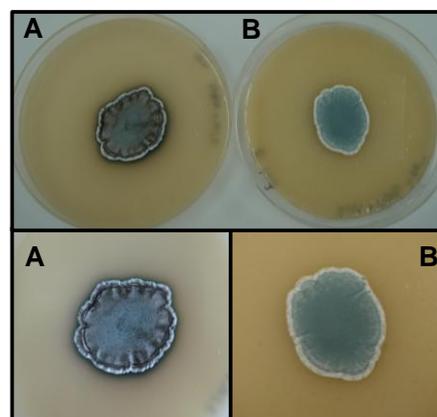


Figura 4.40. Actividad lacasa en medio sólido MS de las cepas silvestre (A) y mutante (B) de *S. cyaneus*.

Por otro lado, el ensayo de detección de actividad lacasa extracelular se llevó a cabo en el medio MS líquido. En la Figura 4.41 se muestra la dinámica de producción de la actividad lacasa en la cepa silvestre, así como la ausencia de dicha actividad enzimática en *S. cyanens* SclA⁻.

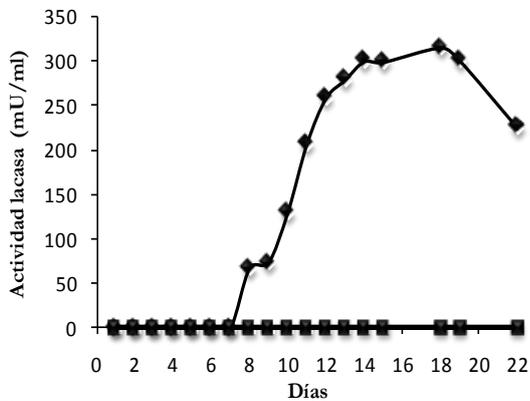


Figura 4.41. Actividad lacasa en medio MS por *S. cyanens* (◆) y *S. cyanens* SclA⁻ (■).

4.3.2. Estudio de la implicación de la lacasa en procesos de morfogénesis y esporulación

Con objeto de comprobar la posible implicación de la lacasa de *S. cyanens* en los procesos de morfogénesis y esporulación del microorganismo productor, se realizaron distintas observaciones al microscopio óptico y electrónico de barrido, para lo cual se tomaron muestras a distintos días de incubación.

4.3.2.1. Observaciones al microscopio óptico

La observación al microscopio óptico de cultivos de ambas cepas a distintos días de incubación, puso de manifiesto que en la cepa mutante, no se produjo ninguna alteración de las distintas fases de desarrollo, en comparación con la cepa silvestre, tal como se puede observar en la Figura 4.42. Estos resultados ponen de manifiesto que la lacasa de *S. cyanens* no estaría implicada en el proceso de diferenciación celular del microorganismo y que en ambas cepas se pudieron observar las etapas de germinación de las esporas y formación del micelio sustrato, desarrollo del micelio aéreo y diferenciación de los conidióforos en las muestras de 2, 4 y 6 días de incubación, respectivamente.

4.3.2.2. Observaciones al microscopio electrónico de barrido

La observación al microscopio electrónico de barrido de las diferentes fases del ciclo de diferenciación celular de las cepas silvestre y mutante de *S. cyanens*, reveló que en la cepa mutante no se produjo ninguna alteración morfológica ni temporal en las distintas etapas de dicho ciclo, en comparación con la cepa silvestre.

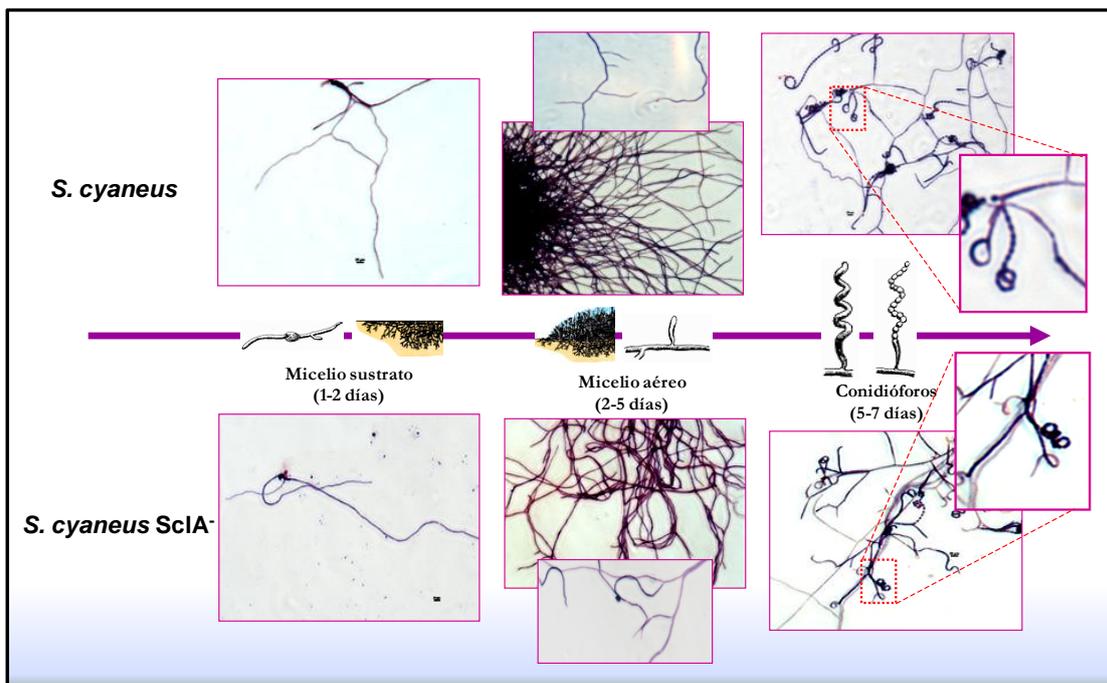


Figura 4.42. Observación al microscopio óptico de las distintas fases del ciclo de desarrollo de las cepas silvestre y mutante de *S. cyanens*.

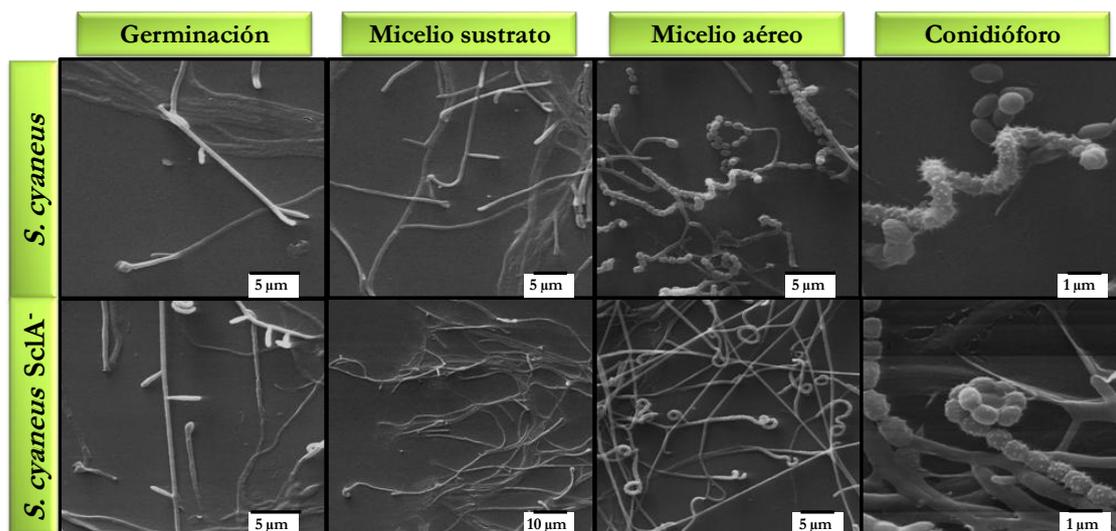


Figura 4.43. Observación al microscopio electrónico de barrido de las distintas fases del ciclo de desarrollo de las cepas silvestre y mutante de *S. cyaneus*.

En ambos microorganismos se puso de manifiesto la germinación de esporas, la ramificación en 90° del micelio sustrato y la aparición de las esporas espiculadas formando parte de los conidióforos (Figura 4.43).

4.3.3. Estudio de la implicación de la lacasa en procesos de pigmentación

Para comprobar la posible implicación de la lacasa de *S. cyaneus* en la pigmentación que normalmente presentan los cultivos de la cepa silvestre, se realizó la inoculación de esporas de las cepas silvestre y mutante en los medios de cultivo sólido GAE, MS y Bennet, mediante la técnica de agotamiento y siembra en masa.

Las fotografías tomadas a diferentes aumentos permitieron observar que tanto el césped microbiano como las colonias aisladas de ambas cepas presentaban la misma pigmentación de color verdeazulada en los tres medios de cultivo. Cuando las fotografías se tomaron con la ayuda de una lupa, el mayor aumento permitió observar en ambas cepas el aspecto algodónoso de las colonias (Figura 4.44).

4.3.4. Estudio de la implicación de la lacasa en procesos de resistencia al cobre

Para estudiar la posible implicación de la lacasa de *S. cyaneus* en procesos de resistencia al cobre, se

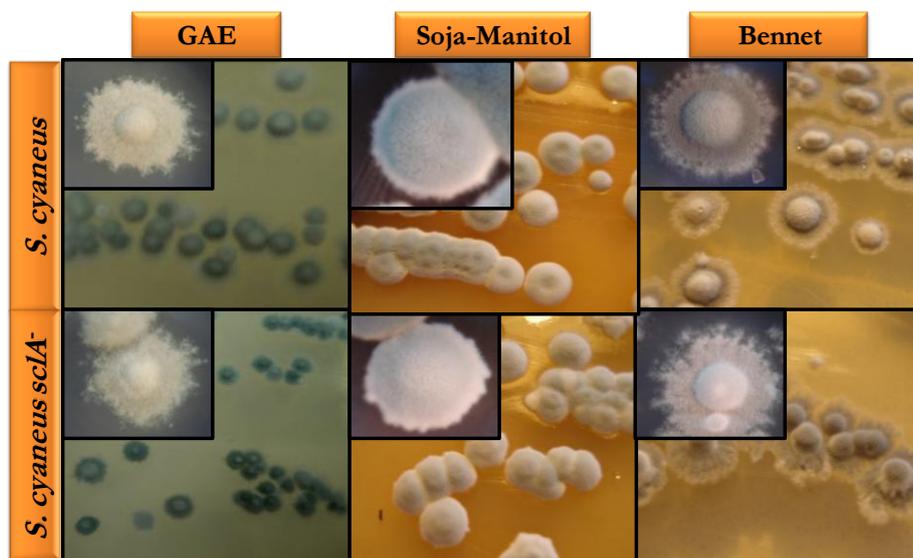


Figura 4.44. Fotografías de las colonias de *S. cyaneus* y *S. cyaneus SclA-* en los medios de cultivo: GAE, Soja-Manitol y Bennet.

llevó a cabo el estudio de la tolerancia a este metal durante el crecimiento de las cepas mutante y silvestre, partiendo tanto de cultivos inducidos como no inducidos, tal como se describió en el apartado 3.8.4.

4.3.4.1. Cultivos no inducidos

Cuando se realizaron cultivos no inducidos de ambas cepas frente a distintas concentraciones de sulfato de cobre, se pudo observar que el peso seco correspondiente al crecimiento de ambos microorganismos resultó prácticamente idéntico en todos los casos, observándose una inhibición del crecimiento en ambas cepas cuanto mayor era la concentración de cobre presente en el medio (Figura 4.45).

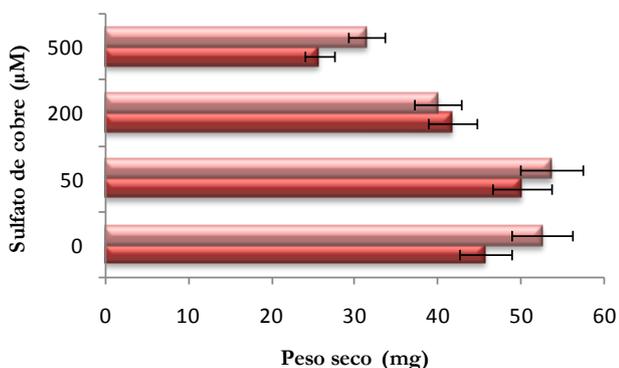


Figura 4.45. Peso seco máximo alcanzado por las cepas silvestre (en rojo) y mutante (en rosado) en presencia de distintas concentraciones de sulfato de cobre en cultivos no inducidos.

4.3.4.2. Cultivos inducidos

Como ya se ha comentado en el apartado 3.8.4.2, en este caso el ensayo se realizó con cultivos de ambas cepas previamente crecidos en medio MS sólido suplementado con una concentración de sulfato de cobre de 400 μM. Posteriormente, suspensiones de esporas de estos cultivos se inocularon en medio MS líquido suplementado con distintas concentraciones de sulfato de cobre. La estimación del peso seco máximo alcanzado por los cultivos de ambas cepas en presencia de las diferentes concentraciones de sulfato de cobre (Figura 4.46), puso de manifiesto que no había diferencias significativas entre la cepa silvestre y mutante en cuanto a su resistencia al cobre.

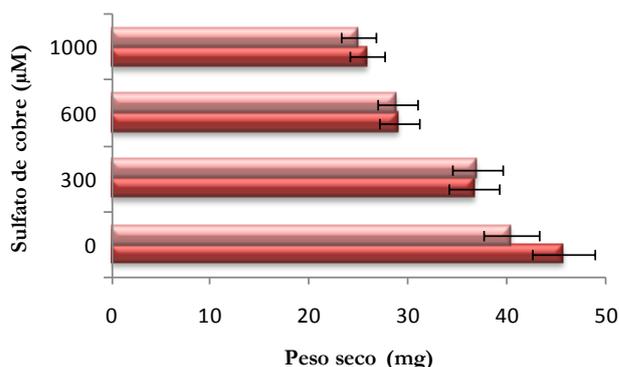


Figura 4.46. Peso seco máximo alcanzado por la cepa silvestre (en rojo) y mutante (en rosado) en presencia de distintas concentraciones de sulfato de cobre en cultivos inducidos.

4.3.5. Estudio de la implicación de la lacasa en la degradación de lignina

Para llevar a cabo el estudio de la posible implicación de la lacasa de *S. cyaneus* en la degradación de lignina, se llevó a cabo un proceso de SSF sobre paja de trigo con las cepas silvestre y mutante de este microorganismo.

4.3.5.1. Estimación gravimétrica de la álcali-lignina

En la Tabla 4.9 se muestra el peso seco en mg de la álcali-lignina obtenida de la paja de trigo control y fermentada por las cepas silvestre y mutante de *S. cyaneus* tras 7 y 14 días de incubación. Los resultados muestran que ambas cepas fueron capaces de solubilizar la lignina de la paja de trigo prácticamente con la misma eficacia.

Tabla 4.9. Peso seco en mg de la álcali-lignina obtenida de la paja de trigo control y fermentada con *S. cyaneus* y *S. cyaneus* SclA⁻.

	7 días	14 días
Control	15	11
<i>S. cyaneus</i>	49	56
<i>S. cyaneus</i> SclA⁻	44	50

4.3.4.2. Análisis de la álcali-lignina mediante Py-GC-MS

Transcurridos 7 y 14 días de incubación, se extrajo la álcali-lignina correspondiente al control y al sustrato transformado por ambas cepas y se sometió a Py-GC-MS. De los productos

resultantes de la pirólisis se identificaron compuestos diagnóstico característicos de los componentes de la lignocelulosa (polisacáridos, compuestos fenólicos y proteínas). Para este estudio se tuvo en cuenta la proporción relativa de los compuestos derivados de lignina, entre los que se distinguen fenol, guayacol y siringol, con sus correspondientes derivados *p*-metil, etil, vinil y propenil, cuyo origen ha sido atribuido a las unidades *p*-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S) de la lignina (Mulder, 1991; Ralph y Hatfield, 1991).

En las Tablas 4.10 y 4.11 se muestra la relación H:G:S obtenida a partir de las áreas relativas de los compuestos identificados tras la pirólisis de la álcali-lignina obtenida de la paja de trigo control y fermentada con las cepas silvestre y mutante de *S. cyaneus*, tras 7 y 14 días de incubación, respectivamente. Estos resultados mostraron que tanto en el caso de la cepa silvestre como mutante, la álcali-lignina obtenida a partir de la paja de trigo fermentada presentó un enriquecimiento en unidades H respecto al control.

Asimismo, se puede observar en esta relación que la álcali-lignina obtenida a partir de la paja de trigo fermentada con *S. cyaneus* SclA⁻, presenta una proporción relativa de unidades G inferior con respecto al control y a la álcali-lignina obtenida con la cepa silvestre.

En estas tablas también se muestra la proporción relativa de las distintas unidades de la lignina atendiendo a su grado de oxidación (aldehído, cetona, ácido) y la proporción (aldehído+cetona)/ácido.

En la Tabla 4.10 se puede observar que esta proporción es menor en la álcali-lignina obtenida de la paja de trigo fermentada con la cepa silvestre de *S. cyaneus* tras 7 días de incubación con respecto al control, mientras que no se observó tal diferencia tras 14 días de incubación (Tabla 4.11). En el caso de la cepa mutante, tras ambos períodos de incubación la proporción (aldehído+cetona)/ácido siempre fue superior a las correspondientes a la álcali-lignina control y a la obtenida con la cepa silvestre.

Tabla 4.10. Relación H:G:S, proporción relativa aldehído, cetona y ácido y relación (aldehído+cetona)/ácido de los compuestos identificados tras la pirólisis de la álcali-lignina tras 7 días de incubación.

	H:G:S	Aldehído	Cetona	Ácido	(Aldehído+Cetona)/Ácido
Control	18:53:29	17,2	58,3	12,6	6,0
<i>S. cyaneus</i>	19:52:29	28,6	56,25	15,2	5,6
<i>S. cyaneus</i> SclA⁻	23:47:30	26	63	10,9	8,2

Tabla 4.11. Relación H:G:S, proporción relativa aldehído, cetona y ácido y relación (aldehído+cetona)/ácido de los compuestos identificados tras la pirólisis de la álcali-lignina tras 14 días de incubación.

	H:G:S	Aldehído	Cetona	Ácido	(Aldehído+Cetona)/Ácido
Control	19:54:26	25,88	63,53	10,58	8,45
<i>S. cyaneus</i>	24:49:27	29,23	60,6	10,17	8,8
<i>S. cyaneus</i> SclA⁻	28:44:28	23,33	68,33	8,33	11

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. Estudio del potencial oxidativo de la cepa *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, utilizando como modelo colorantes textiles

Como ya se ha comentado en la Introducción de esta memoria, actualmente se está llevando a cabo un gran número de investigaciones encaminadas al diseño de estrategias para degradar oxidativamente compuestos contaminantes difícilmente degradables, cuya acumulación en los ecosistemas puede causar graves problemas medioambientales. Entre estas estrategias cabe destacar, la utilización de enzimas oxidativas producidas por microorganismos ligninolíticos, entre los que se encuentra la cepa *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, productora de una lacasa que ha sido purificada y caracterizada en nuestro laboratorio (Arias *et al.*, 2003).

Con objeto de conocer el potencial oxidativo de este microorganismo para degradar compuestos recalcitrantes, se seleccionaron 8 colorantes textiles de tipo azo, que como ya se ha comentado, debido a sus características estructurales y a la dificultad que entraña su degradación por los sistemas habituales de depuración de aguas residuales, suponen una amenaza grave para la vida en el medio acuático. El estudio de degradación de dichos compuestos, se realizó a través de dos estrategias oxidativas diferentes, por un lado, mediante el sistema lacasa-mediador y por otro, a través de la inducción de la producción de radicales hidroxilo en este microorganismo.

En primer lugar, se realizó una caracterización espectrofotométrica de los colorantes textiles, para determinar su coeficiente de extinción molar (ϵ). Esta caracterización se realizó a pH 5, ya que todas las reacciones de decoloración llevadas a cabo con la lacasa se realizaron a valores de pH comprendidos entre 4,5-5, que resultaron ser los valores óptimos para la actividad enzimática. Los valores de ϵ que se obtuvieron fueron muy similares en todos los colorantes y estuvieron comprendidos entre $20\text{-}30 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, lo que refleja que son compuestos de los que se precisa una baja concentración para obtener valores altos de absorbancia.

5.1.1. Purificación de la lacasa de *Streptomyces cyaneus*

Para la purificación de la lacasa producida por *S. cyaneus* se siguió básicamente el protocolo previamente descrito por Arias *et al.* (2003). En este proceso se obtuvieron unos valores en el rendimiento y el factor de purificación de la enzima muy similares a los ya descritos.

No obstante, el buen rendimiento obtenido, se debe al conocimiento previo adquirido sobre esta enzima. Así, la elección de un pH muy próximo al punto isoelectrico de la proteína (Arias *et al.*, 2003) para las fases móviles utilizadas en las distintas cromatografías, permitió aprovechar al máximo el poder de resolución de las columnas utilizadas. Asimismo, en las diferentes etapas de purificación, se consiguió separar la enzima de las fracciones más coloreadas, evitando de este modo, posibles interferencias en la medida de la absorbancia en los ensayos de decoloración. Por último, la diálisis de las fracciones activas una vez concentradas, permitió eliminar el sulfato amónico residual, que de otro modo podría haber interferido en las reacciones enzimáticas llevadas a cabo posteriormente.

5.1.2. Decoloración de los colorantes textiles por la lacasa purificada de *Streptomyces cyaneus* y por distintos sistemas lacasa-mediador

Una vez purificada la lacasa, se llevaron a cabo los ensayos necesarios para comprobar su capacidad para decolorar los diferentes colorantes de tipo azo. Los resultados mostraron que esta enzima por sí misma no es capaz prácticamente de decolorar este tipo de compuestos, lo cual podría ser debido a su naturaleza no fenólica, o a su elevado potencial redox. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros experimentos de degradación de colorantes textiles de tipo azo, llevados a cabo con la lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus* (Camarero *et al.*, 2005) y de un colorante de tipo índigo, tanto con la lacasa de *Sclerotium rolfsii* (Campos *et al.*, 2001), como con la lacasa de *Streptomyces coelicolor* (Dubé *et al.*, 2008).

La demostración previa de que el potencial oxidativo de las lacasas puede ser incrementado por la participación de compuestos mediadores de

oxidación (Bourbonnais y Paice, 1990), ha permitido el desarrollo de distintos sistemas lacasa-mediador capaces de degradar compuestos no fenólicos de alto potencial redox (Call y Mücke, 1997). En este sentido, se ha demostrado que distintas lacasas fúngicas cuando actúan en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HBT) como mediador, son capaces de decolorar colorantes textiles de distinta naturaleza (Rodríguez Couto *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2001; Maalej-Kammoun *et al.*, 2009). Este mediador que ha sido tradicionalmente descrito como uno de los más eficaces, en la actualidad ha sido puesto en entredicho debido a su toxicidad. De aquí surge la necesidad de encontrar nuevos compuestos fenólicos que puedan actuar como mediadores naturales de la lacasa y que no sean perjudiciales para el medio ambiente. En este sentido, trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, para elucidar los mecanismos enzimáticos implicados en la degradación de lignocelulosa por *Streptomyces*, pusieron de manifiesto que este microorganismo acumula en el medio gran cantidad de compuestos fenólicos derivados de la estructura de la lignina, cuando crece en condiciones de fermentación en estado sólido (SSF) sobre un residuo lignocelulósico (Hernández-Coronado *et al.*, 1998).

Entre estos compuestos fenólicos, provenientes de la despolimerización oxidativa de la lignina, se han identificado derivados de las tres unidades precursoras de este polímero, S (siringilo), G (guayacilo) y H (4-hidroxifenilo), que se caracterizan por la presencia de dos, uno, o ningún sustituyente de tipo metoxilo en posición *orto*, respectivamente (Higuchi, 1997).

Para la búsqueda de un mediador eficaz capaz de potenciar el poder oxidativo de la lacasa de *S. cyaneus* para decolorar un colorante de tipo azo como es el caso del Crocein Orange G, se ensayaron distintos compuestos fenólicos derivados de las unidades de la lignina: ácido siringico (S), ácido 4-hidroxibenzoico (H), 4-hidroxiacetofenona (H), ácido vainílico (G) y acetosiringona (S) (Figura 5.1), a distintas concentraciones. Los resultados obtenidos en estos ensayos, demostraron que la acetosiringona (unidad de tipo siringilo de la lignina) resultó ser el mejor mediador de oxidación, permitiendo una tasa de decoloración del 80 % tras 1 hora de incubación. En estudios similares realizados por otros autores, en los que se ensayaron distintos compuestos fenólicos como posibles mediadores de lacasas fúngicas y bacterianas para degradar un colorante textil, también la acetosiringona fue uno de los compuestos con los que se obtuvieron mejores resultados (Camarero *et al.*, 2005). Recientemente, también se ha demostrado en nuestro laboratorio la efectividad de este mediador en la degradación del colorante de tipo azo Orange II por la lacasa alcalina de *S. ipomoea* (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). Por otro lado, la acetosiringona también ha demostrado su eficacia al mediar la oxidación de otro tipo de compuestos como por ejemplo fungicidas e hidrocarburos (Kang *et al.*, 2002; Johannes y Majcherczyk, 2000b).

El paso limitante en la oxidación de un fenol por las lacasas es la transferencia del primer electrón desde el sustrato al centro T1, que a su vez dependerá de las diferencias de potencial redox existentes entre el compuesto fenólico y la enzima.

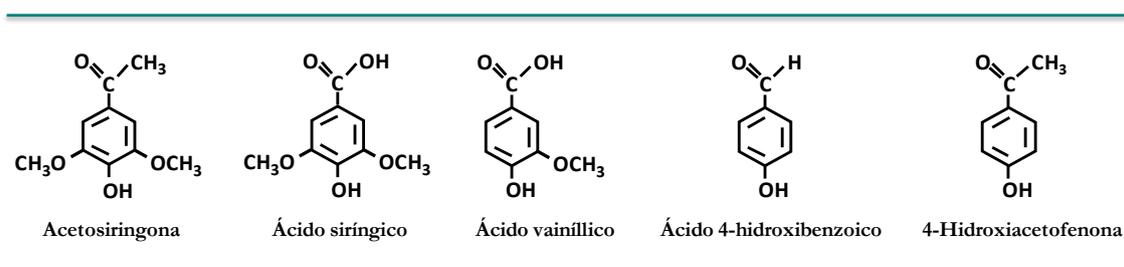


Figura 5.1. Compuestos fenólicos derivados de las unidades S, G y H de la lignina, utilizados como mediadores de oxidación.

Se ha descrito que cuanto mayor es el número de sustituyentes de tipo metoxilo en el compuesto fenólico, menor es su potencial, por lo que se favorece la actividad de la enzima (Xu, 1996a). Esto explicaría que la acetosiringona resultase el mejor mediador entre los compuestos fenólicos seleccionados con este fin. El hecho de que otros compuestos fenólicos derivados de la unidad S, como el ácido síringico, no resultaran tan efectivos, podría estar causado por otros factores como el pKa, que pueden favorecer o dificultar que el sustrato sea oxidado (Camarero *et al.*, 2005; d'Acunzo y Galli, 2003; Ragnar *et al.*, 2000). Otro de los requisitos importantes que cumple la acetosiringona para ser un buen mediador reside en el hecho de que una vez oxidado no inhiba la actividad de la enzima, a diferencia de lo que ocurre con mediadores sintéticos del tipo del HBT, cuyo radical NO[•] puede inactivar a la enzima y debido a su gran reactividad, transformarse rápidamente en compuestos inactivos (Li *et al.*, 1998). Además, los compuestos fenólicos derivados de la unidad S forman radicales más estables por el hecho de poseer dos grupos metoxilo, evitando la formación de estructuras de tipo bifenilo por condensación radicalica.

Por otro lado, los resultados obtenidos permiten concluir que la dosis del mediador es uno de los parámetros a tener a cuenta para el diseño de sistemas lacasa-mediador. En el caso del sistema lacasa-acetosiringona, concentraciones del mediador superiores a 100 μ M, dieron lugar a una rápida precipitación de la mezcla de reacción, lo que puede ser atribuido a reacciones de polimerización. Sin embargo, concentraciones del mediador de 100 μ M, resultaron ser las más adecuadas para la decoloración del colorante Crocein Orange G. Resulta interesante tener en cuenta desde el punto de vista económico, la baja concentración a la que este mediador resulta efectivo, si se compara con el caso de mediadores sintéticos como el ácido violúrico o el HBT con los que fue necesario utilizar concentraciones de 5,7 y 11 mM, respectivamente, para alcanzar una tasa de decoloración similar a la obtenida en nuestro estudio, con el colorante Remazol Brilliant Blue R (Soares *et al.*, 2001).

Una vez seleccionado el sistema lacasa-acetosiringona, se procedió al estudio de la cinética de decoloración de los ocho colorantes de tipo azo seleccionados. Este estudio reveló que el sistema fue especialmente efectivo frente a los colorantes New Coccine, Crocein Orange G, Orange II, Chromotrope 2R y Methyl Orange, alcanzándose porcentajes de decoloración cercanos al 90 % tras 4 horas de incubación. Con el resto de los colorantes, aunque el grado de decoloración no fue tan alto como en el caso anterior, se alcanzaron porcentajes de decoloración cercanos al 40 %. Las diferencias observadas en el grado de decoloración, pudieran ser atribuidas a la gran heterogeneidad que presentan estos colorantes de tipo azo en cuanto a su estructura química (ver Anexo I), lo que a su vez puede estar relacionado con su potencial redox. En general, los colorantes que contienen un grupo naftaleno hidroxilado son más fácilmente oxidados por la enzima, como es el caso de los colorantes Chromotrope 2R, Crocein Orange G, New Coccine y Orange II, hecho que ya había sido demostrado en estudios anteriores llevados a cabo por otros autores (Kandelbauer *et al.*, 2004; Almansa *et al.*, 2004). Por otro lado, sustituyentes de tipo metilo, presentes en el colorante Methyl Orange, son considerados donadores de electrones, favoreciendo así la oxidación por la enzima, mientras que el cloro o los grupos carboxilo (Acid Yellow 17) podrían estar inhibiendo la oxidación de estos compuestos (Xu, 1996a). Es decir, que las diferencias estructurales entre los colorantes, se traducen en una diferente distribución electrónica y en variaciones en la densidad de carga, que influyen en el potencial redox de estos compuestos (Ciullini *et al.*, 2008). Chivukula y Renganathan (1995) también demostraron que sólo los colorantes de tipo azo con grupos metilo o metoxilo como sustituyentes del anillo aromático podían ser oxidados de manera directa por la lacasa de *Pyricularia oryzae*. Aunque estos autores adscribieron la capacidad de degradación de estos compuestos únicamente a la lacasa no sería ilógico pensar en la posible participación de compuestos mediadores presentes en el caldo proteico, puesto que la enzima no había sido purificada para la realización de este estudio.

Dado el interés actual por la búsqueda de sistemas enzimáticos para la decoloración de colorantes textiles, la demostración de la efectividad de los mismos debe pasar por un análisis de la toxicidad de los compuestos resultantes del tratamiento enzimático. Por ello, una vez establecido el potencial de decoloración del sistema lacasa-acetosiringona, se llevó a cabo el análisis de la toxicidad de los colorantes antes y después del tratamiento. Para realizar este análisis, se seleccionaron los colorantes con los que se habían alcanzado mayores tasas de decoloración. Para ello, se utilizó el sistema Microtox® basado en la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri*. La aplicación de bacterias luminiscentes para el estudio de toxicidad de efluentes textiles ha sido ampliamente recomendada (Teichmann, 1995), habiéndose demostrado además su superior efectividad en comparación con el uso de especies de peces (Jaeger *et al.*, 1996).

El grado de toxicidad se expresó como EC₅₀, que indica la concentración de compuesto que produce una reducción del 50 % de la emisión de luz inicial. El valor de EC₅₀ obtenido para los colorantes analizados, a una concentración inicial de 50 µM, fue similar en todos los casos, con un valor comprendido entre 45 y 65. La determinación del grado de toxicidad de los mismos, tras el tratamiento con el sistema lacasa-acetosiringona, puso de manifiesto, como conclusión más importante, que un proceso de degradación de un compuesto no siempre se corresponde con la destoxificación del mismo, al igual que se había demostrado anteriormente para otros colorantes textiles (Abadulla *et al.*, 2000; Tauber *et al.*, 2005; Adedayo *et al.*, 2004; López *et al.*, 2004; Gottlieb *et al.*, 2003). En nuestro caso, el colorante que presentó una mayor velocidad de decoloración (Methyl Orange), fue por otra parte, el que tras la decoloración, sufrió un aumento más acusado en el grado de toxicidad. Este aumento de toxicidad podría ser atribuido a los productos de degradación de los colorantes y/o del mediador. En el caso del colorante Orange II, el incremento de toxicidad observado podría deberse a la formación del compuesto 1-amino-2-naftol, al que otros autores le han atribuido el incremento de toxicidad y genotoxicidad observado tras la hidrólisis de ciertos colorantes (Gottlieb *et al.*,

2003) (Figura 5.2). Estos autores sugieren que la falta de un grupo sulfonato podría incrementar la solubilidad lipídica de estos compuestos, haciendo que sean captados más fácilmente por la bacteria *V. fischeri*. No obstante, en otro estudio llevado a cabo con la lacasa de *S. ipomoea*, se produjo la destoxificación de este mismo colorante, empleando acetosiringona como mediador, por lo que podría deducirse que la eficacia de un sistema lacasa-mediador en términos de disminución de la toxicidad, depende más que del mediador empleado del mecanismo de acción de la enzima en particular.

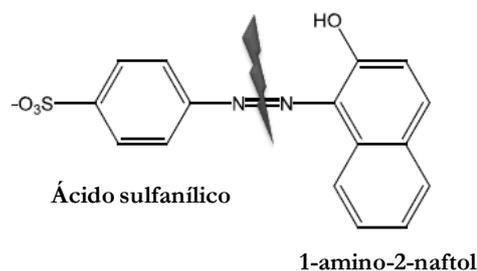


Figura 5.2. Compuestos generados durante la rotura del enlace de tipo azo en la oxidación del colorante Orange II.

Con el fin de identificar los productos de degradación, se llevó a cabo el análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia de los colorantes antes y después del tratamiento con el sistema lacasa-acetosiringona. Los perfiles cromatográficos obtenidos tras el tratamiento, pusieron de manifiesto la desaparición completa del mediador y de los colorantes, a excepción del Orange II, en cuyo caso fue detectado sólo un 1,7 % de la cantidad inicial tras el tratamiento. Este resultado pone de manifiesto, que el sistema lacasa-mediador degrada completamente estos colorantes, extremo que no se confirma con el estudio espectrofotométrico, en donde la observación de un color residual se atribuyó erróneamente a la presencia del colorante. Sin embargo, de este estudio se puede deducir que el color residual sería atribuible a la presencia de productos de degradación del colorante, que presentan un espectro de absorción con una mínima absorción en el rango del visible (ver picos cromatográficos correspondientes a L5 y L9 en la Figura 4.4, cromatogramas B y D, respectivamente), no siendo por tanto correcto

transformar el valor de absorbancia obtenido, utilizando el coeficiente de extinción molar del colorante. De este estudio se puede concluir, que para comprobar la eficacia de degradación de un colorante, es necesario realizar estudios cromatográficos que complementen los estudios espectrofotométricos. Otro resultado no menos importante, es que en todos los casos se comprobó que durante el proceso de decoloración se degradaba también el mediador. Este dato es indicativo de que no se podría reciclar el compuesto, como en principio se llegó a considerar. De hecho, en la mayor parte de la bibliografía que existe sobre este tema, no se dan datos acerca de la cuantificación del mediador tras el proceso de decoloración.

Por último, el análisis de los productos de reacción, permitió detectar la aparición de nuevos compuestos tras el tratamiento de decoloración. Probablemente, entre los compuestos generados en la reacción de decoloración del Methyl Orange y del Orange II, podrían encontrarse los responsables del aumento observado en el grado de toxicidad. Pereira *et al.* (2009) también detectaron la presencia de nuevos compuestos durante la degradación del colorante de tipo azo Sudan Orange G por la lacasa bacteriana CotA, a los que además se les atribuyó el color pardo residual observado en las reacciones de decoloración.

Una vez demostrada la presencia de este tipo de compuestos, sería de gran interés lograr la identificación de los mismos mediante técnicas analíticas, como la cromatografía de gases-masas. De esta manera, se podría por un lado, identificar los compuestos causantes del aumento de toxicidad, y por otro, elucidar las rutas de degradación de los colorantes de tipo azo por estas enzimas, tema sobre el que existe escasa información, sobre todo en el caso de las lacasas bacterianas.

5.1.3. Oxidación avanzada de colorantes textiles por *Streptomyces cyaneus*

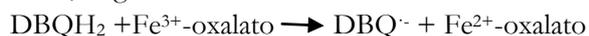
Otra de las aportaciones que validan a las lacasas como enzimas de alta capacidad oxidativa,

es la implicación de las mismas en la generación de radicales hidroxilo (Guillén *et al.*, 2000b).

La producción de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) mediante procesos de oxidación avanzada, es hoy en día una de las estrategias físico-químicas más prometedoras para la degradación de compuestos recalcitrantes, que no pueden ser eliminados mediante los tratamientos convencionales aplicados a las aguas residuales. Aunque estos procesos de oxidación avanzada resultan muy eficaces, su elevado coste es considerado un obstáculo para su aplicación en tratamientos terciarios (Robinson *et al.*, 2001). En este contexto, la posibilidad de inducir la producción de $\cdot\text{OH}$ mediante microorganismos ligninolíticos como *Streptomyces* para facilitar la degradación de contaminantes, sería un ejemplo de combinación de un proceso de oxidación avanzada con un tratamiento biológico, y podría ser considerado por tanto, como un proceso microbiano de oxidación avanzada (PMOA).

Con este objetivo se puso a punto el “redox cycling” de quinonas en el microorganismo objeto de estudio. Para ello, se procedió en primer término, a demostrar la implicación de la lacasa en este proceso, comprobando su capacidad para oxidar diferentes hidroquinonas y producir radicales $\cdot\text{OH}$ a partir de ellas. En primer lugar, se demostró que la lacasa de *S. cyaneus* es capaz de oxidar hidroquinonas derivadas de las unidades H, G y S de la lignina (benzohidroquinona [BQH₂], metoxibenzohidroquinona [MBQH₂] y 2,6-dimetoxibenzohidroquinona [DBQH₂], respectivamente) (Figura 5.3). Además, los resultados obtenidos mostraron que el mejor sustrato de la enzima fue la 2,6-dimetoxibenzohidroquinona, lo que confirma una vez más que compuestos fenólicos con sustituyentes de tipo metoxi son mejores sustratos de las lacasas (Chivukula y Renganathan, 1995), como también se comprobó con la lacasa de *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 2000b). Asimismo, se puso de manifiesto la efectividad de esta hidroquinona para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} y producir H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$.

Con el fin de incrementar los niveles de $\cdot\text{OH}$ producidos se estudió el efecto de la adición de oxalato, como quelante del Fe^{3+} , y de Mn^{2+} a las muestras, según lo descrito previamente para el hongo *P. eryngii* (Gómez-Toribio *et al.*, 2009a). Aunque se ha descrito que el complejo Fe^{3+} -EDTA es uno de los mejores catalizadores de la reacción de Haber-Weiss por su limitada capacidad de secuestrar $\cdot\text{OH}$ (Halliwell y Gutteridge, 1986), se decidió estudiar el efecto del oxalato como quelante debido a su importancia biológica, ya que se trata de un metabolito extracelular producido por los hongos ligninolíticos al que se le ha atribuido la función de quelar Fe^{3+} (Hyde y Wood, 1997; Shimada *et al.*, 1997). Se sabe asimismo, que el complejo Fe^{3+} -oxalato es capaz de oxidar las hidroquinonas, con lo que aumenta la velocidad del ciclo redox, y por tanto, se genera más radical hidroxilo:



Por otro lado, se ha descrito que la presencia de Mn^{2+} puede contribuir a aumentar los niveles de $\cdot\text{OH}$, tanto por su capacidad para reducir el anión superóxido a H_2O_2 , como por el efecto del Mn^{3+} generado para propagar la oxidación de la hidroquinona. Además, el Mn^{3+} puede oxidar al oxalato formándose el anión formiato ($\text{CO}_2^{\cdot-}$), que a su vez puede oxidar monovalentemente al O_2 , produciendo $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Gómez-Toribio *et al.*, 2009a).

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la presencia de oxalato como quelante de Fe^{3+} aumentaba la producción de radical hidroxilo, sobre todo durante las primeras horas de incubación, pero no así el Mn^{2+} , a diferencia de los resultados obtenidos con *Pleurotus eryngii* (Gómez-Toribio *et al.*, 2009a) y *Trametes versicolor* (Marco-Urrea *et al.*, 2009). Es posible que en nuestro caso el manganeso añadido incrementara de tal manera la producción de $\cdot\text{OH}$, que el oxalato pudiera ser oxidado por el mismo y el hierro libre captado por la bacteria, impidiendo la reacción de Fenton. Prueba de ello es que durante la primera hora, la cantidad de radical hidroxilo generado es similar a la producida con Fe^{3+} -oxalato sin Mn^{2+} . Por otro lado, se ha descrito que el Mn^{3+} puede oxidar las semiquinonas, de manera que se produce una

competencia con la autooxidación de las mismas (Gómez-Toribio, 2006).

Una característica importante de este proceso cíclico es, como se demuestra con la producción de $\cdot\text{OH}$ a lo largo del tiempo, que se mantiene operativo durante al menos las 8 primeras horas en las que se llevan a cabo los experimentos. Asimismo, se puede observar una producción continua y lineal del radical durante aproximadamente las 4 primeras horas de incubación.

El potencial que ofrecen los radicales libres de oxígeno producidos por mediación de microorganismos ligninolíticos en la degradación de compuestos contaminantes, no ha sido aún muy explorado. Por esta razón, se planteó comprobar la eficacia del proceso microbiano de oxidación avanzada puesto a punto en *S. cyanus*. En primer lugar, se comprobó, tomando como modelo el colorante New Coccine, que existía una relación directa entre la velocidad de decoloración del colorante y los niveles de $\cdot\text{OH}$ producidos por el microorganismo en las diferentes condiciones ensayadas. Una vez demostrada esta relación, se llevó a cabo un ensayo de decoloración de los 8 colorantes de tipo azo mediante ciclo redox de quinonas en las condiciones establecidas. Tal como muestran los resultados, los colorantes sólo fueron oxidados en condiciones de producción de $\cdot\text{OH}$. Las mayores tasas de decoloración alcanzadas fueron similares a las obtenidas con el sistema lacasa-acetosiringona; sin embargo, se observaron diferencias en cuanto al grado de degradación alcanzado en los colorantes, ya que por ejemplo en el caso del colorante Methyl Orange, que presentó la mayor velocidad de decoloración cuando se utilizó el sistema lacasa-mediador, fue sin embargo el menos degradado mediante ciclo redox de quinonas. Además, en el proceso de oxidación avanzada se observó, que para alcanzar tasas de decoloración similares a las obtenidas con el sistema lacasa-mediador, fue necesario un mayor tiempo de incubación con el microorganismo. En un estudio similar realizado con el hongo *P. eryngii*, donde se indujo la producción de radical hidroxilo bajo las condiciones de incubación optimizadas para este microorganismo (Fe^{3+} -oxalato en presencia de Mn^{2+}), se alcanzaron tasas similares de

degradación con estos mismos colorantes (Moya *et al.*, 2006).

Paralelamente a los estudios realizados en el caso del tratamiento con lacasa-acetosiringona, se llevó a cabo un análisis de toxicidad de los mismos colorantes, antes y después de aplicar el proceso de oxidación avanzada. Para ello, se comprobó previamente que la mezcla de incubación control con quinona y el complejo Fe^{3+} -oxalato no resultaba tóxica para *V. fischeri*, calculándose posteriormente el valor de EC_{50} y a partir de él, el grado de toxicidad de los productos de reacción de los colorantes antes y después de la oxidación avanzada. En todos los casos, a diferencia del sistema lacasa-acetosiringona, se produjo una disminución del grado de toxicidad, llegando incluso, en el caso de los colorantes Orange II y Methyl Orange, a obtenerse valores de EC_{50} inestimables, debido a su baja toxicidad. Es importante destacar, que fueron precisamente estos colorantes los que presentaron un aumento en su grado de toxicidad tras ser tratados con el sistema lacasa-acetosiringona. Cabe señalar que no existen estudios previos en los que se haya evaluado la toxicidad de los productos de degradación obtenidos tras un tratamiento de oxidación avanzada mediada por microorganismos. Sin embargo, se ha demostrado la capacidad de estos radicales para destoxificar colorantes textiles, cuando son producidos a través de diferentes tecnologías físico-químicas (Ledakowicz *et al.*, 2001; Selcuk, 2005). La disminución observada en el grado de toxicidad de los colorantes podría ser atribuida a la mineralización de los compuestos de partida por la acción del $\cdot\text{OH}$. Esta hipótesis ha sido demostrada por otros autores en un estudio de degradación de hidrocarburos clorados mediante la inducción de la producción de este radical en *T. versicolor* (Marco-Urrea *et al.*, 2009).

Finalmente, se llevó a cabo de igual manera que en el estudio anterior, el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia de los colorantes antes y después del tratamiento microbiano de oxidación avanzada. El análisis de los perfiles cromatográficos obtenidos tras el tratamiento, puso de manifiesto la desaparición completa o casi completa (Orange II) de los colorantes. Esto no ocurrió en el caso del Methyl

Orange, en el que fue detectado un 20 % de la cantidad inicial. Por otro lado, en todos los casos, se produjo una degradación completa de la quinona, lo que implica que sería necesario añadir de nuevo este compuesto, para que el ciclo siga funcionando. Por último, el tratamiento también dio lugar a la aparición de nuevos compuestos, que en este caso no resultaron tóxicos. Asimismo, al igual que en el caso del tratamiento con el sistema lacasa-acetosiringona, la cuantificación del colorante residual puso de manifiesto, una discordancia entre los resultados obtenidos espectrofotométricamente y mediante cuantificación por HPLC, de donde se desprende la necesidad de completar los estudios espectrofotométricos con análisis cromatográficos en este tipo de ensayos.

Concretamente en este caso, sería muy interesante la identificación de compuestos intermediarios, ya que en otros estudios de biooxidación y oxidación avanzada se han identificado hidroquinonas como intermediarios de degradación de colorantes y otros compuestos contaminantes, lo que podría conducir al establecimiento de ciclos redox paralelos que contribuirían a la degradación del compuesto de partida (Alnaizy y Akgerman, 2000; Vinodgopal y Peller, 2003; Gómez-Toribio *et al.*, 2009a).

Por último, cabe señalar que nuestro grupo de investigación está llevando a cabo nuevos experimentos que permitan validar la aplicación de los radicales hidroxilo generados por *S. cyaneus* y *P. eryngii* a la degradación de otro tipo de compuestos contaminantes como los derivados de la industria del petróleo, benceno, etilbenceno y xileno (BTEX) (Moya *et al.*, 2009), así como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) (García-Martín *et al.*, 2009).

En cuanto a las ventajas e inconvenientes que podría presentar un tratamiento de oxidación de colorantes mediante el sistema lacasa-mediador o a través de la producción de radicales hidroxilo en microorganismos ligninolíticos, cabe señalar en primer lugar, que ambos sistemas permiten alcanzar tasas de decoloración elevadas y en muchos casos, superiores a las descritas en la literatura en estudios de decoloración con otras lacasas fúngicas y bacterianas (Abadulla *et al.*,

2000; Soares *et al.*, 2001; Rodríguez Couto *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2009a; Pereira *et al.*, 2009).

El tratamiento con el sistema lacasa-acetosiringona presentó como principal inconveniente el aumento de toxicidad observado en algunos de los compuestos ensayados, pero por otro lado, las velocidades de reacción fueron muy rápidas (30 minutos). Esto podría resultar interesante en algunos casos, en los que una reducción del tiempo de incubación de las reacciones podría evitar la formación de compuestos tóxicos. Por último, el tratamiento con lacasas resultaría más ventajoso en aquellos casos en los que los compuestos recalcitrantes a degradar resultaran tóxicos para el microorganismo, imposibilitando la producción de radicales hidroxilo.

En cuanto a las ventajas de aplicar como estrategia oxidativa los radicales hidroxilo inducidos en *S. cyaneus*, cabe señalar su capacidad para disminuir, en algunos casos muy significativamente, la toxicidad de los compuestos contaminantes y la posibilidad de desarrollar un proceso secuencial de degradación gracias a la participación de compuestos intermediarios de tipo quinonas generados durante la degradación del compuesto de partida.

5.2. Caracterización molecular y físico-química de la lacasa de *S. cyaneus*

El interés biotecnológico y medioambiental suscitado por la lacasa de *S. cyaneus*, nos condujo a su posterior caracterización molecular, con objeto de poder conseguir la sobreexpresión del gen codificante de la misma y obtener de ese modo los niveles adecuados de enzima para poder ampliar el rango de aplicaciones.

Con este objetivo se llevó a cabo en primer lugar la clonación y secuenciación del gen codificante de la lacasa de *S. cyaneus*. Para la consecución de esta tarea contamos con el hecho de que parte de la secuencia del gen de la lacasa de este microorganismo había sido descifrada previamente por nuestro grupo de investigación (Arenas, 2004), por lo que el diseño de oligonucleótidos que nos permitieran obtener una sonda por PCR para poder localizar un fragmento cromosómico que contuviera el gen completo, no

revistió gran dificultad. Una vez obtenida dicha sonda, se pudo localizar mediante hibridación de Southern una señal mayoritaria, que conduciría posteriormente a la clonación del gen *scLA*.

Debido al gran tamaño de la banda obtenida (≈ 7 kb) se optó por subclonar el fragmento, lo que permitió obtener finalmente un fragmento de 2,3 kb, facilitando su secuenciación.

Una vez obtenida la secuencia completa del gen *scLA*, se llevó a cabo un análisis comparativo con las secuencias disponibles en las bases de datos. Dicho análisis reveló la alta similitud (superior al 80 %) que presenta la secuencia de *scLA* con la del gen de la fenoxacinona sintasa producida por dos especies de *Streptomyces* (*S. antibioticus* y *S. viridochromogenes*), así como con la lacasa de *S. lavendulae*. Las fenoxacinona sintasas, son enzimas implicadas en la síntesis del antibiótico actinomicina, entre otras funciones. El hecho de que se identificaran por primera vez hacia los años 60 (Katz y Weissbach, 1962), cuando las lacasas bacterianas aún no eran muy conocidas, determinó que les fuera asignado este nombre, por su participación en la síntesis de la actinomicina. Sin embargo, atendiendo a sus características físico-químicas y genéticas podrían ser incluidas en el grupo de las oxidasas multicobre (Le Roes-Hill *et al.*, 2009). En el caso de *S. antibioticus*, la fenoxacinona sintasa se ha relacionado también con la pigmentación de esporas, pues algunos estudios han demostrado que la producción de actinomicina persiste en una cepa que carece de esta actividad enzimática (Jones, 2000).

La elevada similitud que presentó *scLA* con el gen de la fenoxacinona sintasa de *S. antibioticus* (*pshA*), nos llevó a realizar una comparación más exhaustiva entre ambos genes. Así, en ambos casos, se identificó el triplete TTG (Leucina) como codón de iniciación, a diferencia del resto de genes de lacasas bacterianas descritos cuyo codón de iniciación suele ser ATG (Metionina). Por otro lado, al igual que *pshA*, *scLA* presentó corriente arriba del gen la secuencia GGGGG, que podría actuar como sitio de unión al ribosoma. Por último, se localizó en *scLA* una secuencia corriente arriba del gen (GGAACG) identificada como posible región promotora -35 en *pshA* (Strohl, 1992; Hsieh y Jones, 1995).

La búsqueda de un péptido señal en la secuencia de *scLA* dio un resultado negativo. Esto no es de extrañar si tenemos en cuenta que durante el estudio de producción de la lacasa nativa en el medio MS, la actividad lacasa se detectó a partir del octavo día de cultivo, período que corresponde a la fase de autólisis del microorganismo y, por tanto, a la liberación de su contenido intracelular al caldo de cultivo. Este rasgo la diferenciaría de la lacasa producida por *S. ipomoea* (SilA), la cual se detecta extracelularmente en los primeros días de incubación del microorganismo. En esta enzima, y al contrario de lo que ocurre en la lacasa de *S. cyanus*, se ha identificado a nivel de su secuencia un péptido señal de tipo TAT (*Twin Arginine Translocation*). Sin embargo, atendiendo al resto de lacasas bacterianas conocidas, la mayoría de ellas se localizan intracelularmente, como es el caso de las producidas por *Azospirillum lipoferum* (Diamantidis *et al.*, 2000), *Marinomonas mediterranea* (Sánchez-Amat y Solano, 1997), *Bacillus subtilis* (Martins *et al.*, 2002), γ -proteobacterium JB (Singh *et al.*, 2007), y muy probablemente, como sugieren los autores, *S. lavendulae* (Suzuki *et al.*, 2003), entre otras.

En cuanto a la búsqueda de regiones conservadas en la secuencia de SclA, como era de esperar al tratarse de una lacasa, se identificaron las secuencias típicas de unión al cobre, que presentan los 10 residuos de histidina y la cisteína encargadas de coordinar los 4 átomos de cobre en todas las oxidasas multicobre.

Además, se identificaron tres dominios conservados de tipo cupredoxina, como se ha descrito para la inmensa mayoría de las lacasas conocidas de diferentes organismos vivos.

Esta característica situaría a SclA en una familia diferente a la de la lacasa SilA, en la que se han descrito únicamente dos dominios cupredoxina, lo que justificaría su reducido número de aminoácidos (Molina-Guijarro *et al.*, 2009).

Como muestra de la existencia de familias entre las lacasas, cabe destacar el reciente trabajo de Sirim *et al.* (2011). Estos autores han creado una gran base de datos (<http://www.lcced.uni-stuttgart.de>) a partir de las secuencias genéticas y estructuras de más de 2.200 lacasas y oxidasas multicobre, lo que les ha permitido clasificarlas en 11 superfamilias y 56 familias homólogas (Tabla 5.1). Atendiendo a esta clasificación, SclA se situaría en el grupo I, el correspondiente a las bilirrubin oxidasas de bacterias, que toma su nombre del grupo de microorganismos más representado y de la posible función biológica de las enzimas comprendidas en el mismo. En este mismo grupo también estarían clasificadas las lacasas de *S. lavendulae*, *S. griseus* o las fenoxacinona sintasas de *S. antibioticus* y *S. viridochromogenes*, entre otras. Cabe destacar, que al igual que en el trabajo anterior de Hoegger *et al.* (2006), los autores se han visto obligados a eliminar del análisis las secuencias de las lacasas de dos dominios como EpoA, SLAC y SilA con el fin de aumentar la resolución del análisis filogenético, lo que revela la singularidad de este grupo de lacasas. Según este tipo de estudios, la clasificación filogenética de numerosos miembros de las oxidasas multicobre, entre las que se encuentran las lacasas, refleja en parte la función que podrían desempeñar estas enzimas en los distintos grupos de microorganismos.

Tabla 5.1. Distribución de las oxidasas multicobre en familias según la base de datos LccED (*Lacase Engineering Database*). Tomado de Sirim *et al.* (2011). Símbolos: AO: ascorbato oxidasa; MCO: oxidasa multicobre.

Superfamilia	Familias homólogas	Proteínas	Estructuras
A (Lacasas de basidiomicetos)	4	201	13
B (Lacasas de ascomicetos)	6	421	6
C (Lacasas de insectos)	8	168	0
D (MCOs pigmentos fúngicos)	4	55	0
E (Ferroxidasas fúngicas)	6	117	6
F (AOs de plantas y hongos)	6	137	8
G (Lacasas de plantas)	5	333	0
H (Proteínas CopA de bacterias)	6	383	0
I (Bilirrubin oxidasas de bacterias)	5	149	24
J (Proteínas CueO de bacterias)	5	310	11
K (Homólogos SLAC)	1	18	3

Así, poder llegar a establecer de manera correcta las relaciones que se establecen entre secuencia, estructura y función ayudaría enormemente a la mejora y utilización biotecnológica de las lacasas.

Cuando la secuencia de SclA se comparó con el resto de oxidasas multicobre conocidas del género *Streptomyces*, mediante el método del “Neighbour Joining”, pudimos comprobar de nuevo su mayor similitud con la fenoxacinona sintasa de *S. antibioticus* y con la lacasa de *S. lavendulae*. Este hecho también se corrobora al analizar las regiones más conservadas implicadas en la unión al cobre, pues cuanto mayor es el grado de homología mostrado por el árbol filogenético para las distintas oxidasas multicobre comparadas, mayor es el número de aminoácidos comunes en dichas regiones entre estas enzimas.

Una vez secuenciado el gen de la lacasa de *S. cyanus*, nos planteamos su sobreexpresión en un hospedador heterólogo que nos permitiera obtener cantidades suficientes de enzima para continuar con su caracterización. La elección del sistema pET, que utiliza *Escherichia coli* como microorganismo productor, se basó en la eficacia que este sistema ha demostrado con multitud de proteínas a lo largo de los años.

Concretamente, este sistema ha sido utilizado con resultados positivos en la sobreexpresión de las lacasas de *S. lavendulae* (Suzuki *et al.*, 2003), *S. griseus* (Endo *et al.*, 2003), *S. coelicolor* (Machczynski *et al.*, 2004), *S. ipomoea* (Molina-Guijarro *et al.*, 2009) y con una lacasa aislada de un metagenoma marino (Fang *et al.*, 2011).

Una vez obtenida la construcción pET28-SclA, se utilizó para transformar células competentes de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Los distintos análisis de la expresión revelaron que aunque se producía la inducción de la sobreexpresión del gen, la enzima se encontraba insoluble en forma de cuerpos de inclusión. La utilización de bacterias para la producción de proteínas recombinantes presenta como principales ventajas el abaratamiento de los medios de cultivo y el rápido crecimiento de las células, lo que se traduce en elevadas tasas de producción de proteínas. Sin embargo, el principal inconveniente, sobre todo en el caso de la bacteria *Escherichia coli*, es que frecuentemente las proteínas producidas son

inactivas, es decir, se encuentran en forma insoluble en los denominados cuerpos de inclusión (Vallejo y Rinas, 2004). De hecho, otras lacasas bacterianas que han sido sobreexpresadas en este sistema, también alcanzaron bajas tasas de producción, como consecuencia principalmente, de la acumulación de la proteína en forma de agregados (Suzuki *et al.*, 2003). Por esta razón, se pusieron en práctica una serie de estrategias con las que se trató de aumentar la fracción proteica soluble.

La primera estrategia que se llevó a cabo, fue el descenso de la temperatura de incubación de la cepa de 37 a 28 °C, hecho que había demostrado su eficacia en la sobreexpresión de la lacasa de *S. ipomoea* (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). En vista de que los resultados fueron negativos, se descendió entonces la temperatura hasta 16 °C, alargando el tiempo de incubación. Con esta última condición se obtuvieron los mejores niveles de enzima soluble, y por tanto esta estrategia se utilizó para llevar a cabo la producción de SclA recombinante, y proceder a continuación, a su purificación y caracterización físico-química.

Cabe destacar que aunque el descenso de la temperatura de incubación de *E. coli*, por debajo del óptimo de crecimiento de dicha bacteria, minimiza la tendencia de las proteínas a agregarse evitando la formación de los cuerpos de inclusión (Vera *et al.*, 2007), los niveles de enzima soluble obtenidos están muchas veces lejos de los requerimientos exigidos para su posible aplicación industrial. Por ello, con el fin de obtener un mejor rendimiento, tratamos de recuperar la enzima a partir de los cuerpos de inclusión según el protocolo descrito por Colombo *et al.* (2001). Además, de esta forma, se podría disponer de la proteína en gran cantidad y protegida de la degradación proteolítica. Sin embargo, los niveles de enzima recuperada mediante esta estrategia fueron de nuevo demasiado bajos. Entre los factores que podrían haber afectado a la baja eficacia de este proceso, estaría la urea utilizada como agente desnaturalizante, pues se ha descrito que en las soluciones que contienen este compuesto, se puede producir cianato que puede afectar a los grupos amino de las proteínas (Hagel *et al.*, 1971). Otra posible explicación pudiera ser la formación de agregados por parte de los

intermediarios conformacionales de la proteína durante el último paso de renaturalización mediante diálisis (Gu *et al.*, 2002). Además, el pH y otra serie de factores (temperatura, concentración de proteína, agente renaturalizante, etc.) son cruciales para que este tipo de técnicas funcionen de manera eficiente (Vallejo y Rinas, 2004), por lo que sería necesario un estudio en mayor profundidad que permitiese establecer las condiciones óptimas específicas para la solubilización de esta proteína en concreto.

Es importante señalar, no obstante, que con vistas a mejorar la eficiencia de sobreexpresión de esta lacasa que presenta interés biotecnológico, sería importante ensayar otros sistemas de expresión, pues el hecho que esta enzima tenga un elevado tamaño o que *E.coli* no pueda llevar a cabo las modificaciones post-traduccionales necesarias, quizás ha contribuido a la baja eficiencia del proceso. Por otro lado, la recuperación de la enzima a partir de los cuerpos de inclusión, ha demostrado ser un proceso costoso, tanto en términos económicos como a nivel de laboratorio, y que no siempre proporciona el rendimiento deseado. En este sentido, *S. lividans* podría ser un buen candidato como hospedador homólogo, pues ha demostrado su eficacia para la sobreexpresión de diversas proteínas, y concretamente, ha sido utilizado en la sobreexpresión de la lacasa de *S. coelicolor* (Dubé *et al.*, 2008). Estos autores sostienen haber alcanzado la mayor tasa de producción de enzima (350 mg l⁻¹) de las descritas hasta la fecha para lacasas bacterianas.

Una vez obtenida la proteína recombinante según las condiciones óptimas descritas anteriormente, se procedió a su purificación con vistas a su posterior caracterización físico-química. Del proceso de purificación cabe señalar la baja eficacia del mismo en los ensayos preliminares (datos no mostrados), pero que mejoró notablemente cuando se añadió Tween 20 a las soluciones. Este aumento puede ser atribuido a la mejora de la solubilidad de la proteína, que por otro lado, mostraba una tendencia a precipitar en el interior de la columna de afinidad. Una vez obtenida SclA purificada, se abordó su caracterización físico-química y cinética,

comparándose los resultados obtenidos con los correspondientes a la lacasa nativa, caracterizada parcialmente en esta memoria (apartado 4.1.1.1), tal como ha sido descrito previamente por Arias *et al.* (2003).

El pH óptimo de reacción de SclA frente al ABTS fue de 4,5 aproximadamente, lo que coincidió con el valor obtenido para la enzima nativa. Este valor de pH óptimo coincidió con el obtenido para la lacasa de *S. ipomoea* (SilA) (Molina-Guijarro *et al.*, 2009) y fue superior al valor medio descrito para las lacasas fúngicas (pH 3) (Baldrian, 2006). Cuando el pH óptimo de SclA se determinó frente a 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP), el óptimo de actividad se situó en un valor más ácido, de aproximadamente 3, a diferencia de lo que ocurre con SilA y otras lacasas bacterianas (Dubé *et al.*, 2008; Reiss *et al.*, 2011), que presentan un pH óptimo alcalino para sustratos de tipo fenólico. Este dato no pudo compararse con el correspondiente a la enzima nativa, por no haberse determinado en ésta el pH óptimo para otros sustratos. El hecho de que el óptimo de pH para el 2,6-DMP sea más ácido, resulta sorprendente si se compara con lo que ocurre con la mayoría de lacasas fúngicas, para las cuales se ha descrito que el valor de pH óptimo para el ABTS es inferior a 4, y está comprendido entre 4 y 7 para sustratos de tipo fenólico, ya que a medida que aumenta el pH disminuye el potencial de reducción de los compuestos de tipo fenólico. Es posible que este sustrato pudiera estar ocasionando algún tipo de inhibición sobre el centro catalítico de la enzima, lo que a su vez podría tener relación con la imposibilidad de calcular la K_m para este sustrato, como se mencionará más adelante.

En cuanto a la estabilidad al pH, la lacasa recombinante mostró, al igual que la lacasa nativa y de modo similar a lo descrito para otras lacasas bacterianas y algunas fúngicas (Muñoz *et al.*, 1997b; Ko *et al.*, 2001; Molina-Guijarro *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2003), una mayor estabilidad a valores de pH neutro y alcalino.

La temperatura óptima de reacción de esta lacasa se estimó en aproximadamente 70 °C, lo que coincide con la obtenida para la lacasa nativa. Cabe señalar que este valor es superior al descrito para otras lacasas bacterianas del género

Streptomyces (Molina-Guijarro *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2003; Endo *et al.*, 2003), pero sobre todo al correspondiente a las lacasas fúngicas, cuyos óptimos de temperatura suelen estar comprendidos entre 30 y 60 °C (Baldrian, 2006). Por otro lado, esta temperatura óptima resultó similar a la de la lacasa producida por *Bacillus pumilus*, recientemente descrita (Reiss *et al.*, 2011). Esta característica, sumada a su estabilidad a las distintas temperaturas ensayadas, convierte a SclA en buen candidato para aquellas aplicaciones biotecnológicas que se deban llevar a cabo en cortos períodos de tiempo y en presencia de elevadas temperaturas.

La determinación de la masa molecular de la enzima dio como resultado un valor aproximado de 77 kDa en su forma desnaturalizada, que fue ligeramente superior al descrito para la forma nativa. Este incremento podría ser atribuido a la región que incluye a la cola de histidinas que se incorpora a la cadena polipeptídica de la forma recombinante para facilitar su posterior purificación. Un incremento similar en la masa molecular de la lacasa recombinante respecto a su forma nativa también ha sido descrito para la lacasa SilA, anteriormente mencionada. Por otro lado, SclA, al igual que la lacasa nativa, no perdió su actividad en presencia del SDS utilizado en las electroforesis, lo que también ocurre con otras lacasas bacterianas (Diamantidis *et al.*, 2000; Molina-Guijarro *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2003).

Respecto al punto isoeléctrico, el valor correspondiente a la enzima recombinante fue de 6,3, superior al obtenido para la forma nativa (5,6). Este aumento en el valor de pI puede ser explicado en base al número de cargas positivas extra que contiene la enzima recombinante en el extremo N-terminal, principalmente debido a la cola de histidinas. Este razonamiento es lógico si tenemos en cuenta que a valores de pH alto, los aminoácidos con carga positiva de una proteína se desprotonizan, con lo cual cuanto mayor sea el número de éstos mayor será el valor de pH al que la carga neta de la proteína sea cero. Por otro lado, estos valores están próximos a los obtenidos con otras lacasas de *Streptomyces*, así como con la lacasa de *Sinorhizobium meliloti* (Rosconi *et al.*, 2005) y algunas correspondientes a hongos ligninolíticos

como es el caso de *Pleurotus ostreatus* (Palmieri *et al.*, 1997).

En lo que se refiere a las propiedades catalíticas de la enzima recombinante, cabe señalar que se encontraron diferencias significativas con la enzima nativa, cuando se utilizó ABTS como sustrato. Concretamente, el valor de la K_m fue aproximadamente unas seis veces menor. Este gran incremento observado en la afinidad de la enzima por el sustrato, podría ser debido a la presencia de la cola de histidinas, que de alguna manera pudiera influir en el mecanismo de acción de la enzima o bien en su estado conformacional, lo que a su vez podría facilitar la unión del sustrato. En la bibliografía se han descrito ejemplos de lacasas inmovilizadas en las que se produce un aumento en su K_m , debido probablemente a impedimentos estéricos o a una pérdida de flexibilidad de la enzima (Huang *et al.*, 2007). Lo cierto es que en la bibliografía no existen muchos ejemplos en los que se hayan establecido comparaciones entre las características de la enzima nativa y recombinante. Uno de estos ejemplos es la lacasa de *S. lavendulae* (Suzuki *et al.*, 2003), con la que SclA presenta un alto grado de similitud. En este caso, las características cinéticas fueron coincidentes para ambas enzimas. Sin embargo, en el caso de SilA, la lacasa recombinante de *S. ipomoea*, también se detectó un incremento en la eficacia catalítica de la forma recombinante respecto a la nativa (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). Por otro lado, también se ha descrito justo lo contrario, es decir, una disminución de la eficiencia catalítica en la forma recombinante, en las lacasas producidas por *Manduca sexta* (Dittmer *et al.*, 2009), *Pycnoporus cinnabarinus* (Sigoillot *et al.*, 2004) y *Melanocarpus albomyces* (de Wilde *et al.*, 2008), entre otras. En cuanto al valor de K_m obtenido para SclA frente a ABTS, en comparación con otras lacasas bacterianas, podríamos decir que es uno de los más bajos entre los descritos y se sitúa en valores intermedios en comparación con las lacasas fúngicas (Baldrian, 2006).

Por último, para completar el estudio de caracterización físico-química de la enzima, se evaluó la capacidad de SclA para oxidar un compuesto de naturaleza no fenólica, en presencia de un compuesto mediador. Como compuesto

modelo se escogió el colorante textil de tipo azo Methyl Orange, y como mediador, la acetosiringona. Esta elección se realizó por un lado, para tratar de demostrar que la efectividad que había mostrado este sistema con la lacasa nativa de *S. cyaneus* también era extensible al caso de la enzima recombinante, y por otro, con vistas a su posible aplicación biotecnológica. La alta tasa de decoloración alcanzada (50 %) en tan sólo media hora de incubación, reveló que efectivamente SclA puede ser aplicada en la degradación de compuestos de naturaleza no fenólica en presencia de compuestos mediadores de oxidación. Cabe señalar además, que aun habiendo utilizado una dosis enzimática unas 10 veces inferior a la empleada en el estudio de decoloración con la lacasa nativa, la tasa de decoloración alcanzada en el mismo tiempo de incubación fue tan sólo unas 1,8 veces menor.

No obstante, para poder completar la caracterización físico-química de la enzima y poder validar su capacidad degradativa sobre otros contaminantes de distinta naturaleza, será necesario disponer de un sistema de sobreexpresión más adecuado que permita obtener sin las dificultades encontradas en este trabajo, la cantidad de enzima suficiente para demostrar fehacientemente su utilidad biotecnológica.

5.3. Abordaje del estudio de la función de la lacasa en la cepa productora *S. cyaneus*

Dada la escasa información de que se dispone acerca de la función biológica que desempeñan las lacasas bacterianas en los microorganismos productores, se decidió llevar a cabo una serie de estudios con el fin de elucidar los posibles procesos biológicos en los que podría estar implicada la lacasa de *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. Para ello, en primer lugar, era necesario obtener un mutante no productor de dicha actividad enzimática. Este estudio se realizó en el Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo, con la colaboración de los Dres. José Antonio Salas y Carmen Méndez. Para lograr este fin, se contemplaron en un principio dos estrategias: interrupción génica y reemplazamiento génico. Esta última, en la que el

gen de interés quedaría reemplazado por el gen que confiere resistencia a ampicilina, se planteó como primera opción, dada la mayor estabilidad esperada para el mutante obtenido, puesto que el gen de interés sería eliminado por completo del cromosoma bacteriano por un doble sobrecruzamiento. Sin embargo, el mapa de restricción que permitió conocer la localización del gen en el fragmento *SacI/SacI* (Figura 4.36) reveló que las distancias génicas a ambos lados del gen disminuían notablemente la probabilidad de que tuviera lugar el doble sobrecruzamiento. Por esta razón, se optó por la obtención del mutante a través de la estrategia de interrupción génica, que como único inconveniente requiere la selección constante del mutante con el antibiótico frente al que presenta resistencia, que es en este caso la apramicina. Una de las primeras conclusiones que se pueden extraer a partir de la obtención de este mutante, es que la mutación de *sclA* no afectó en medida alguna a la viabilidad del microorganismo.

Una vez comprobado que la interrupción del gen se había llevado a cabo de manera efectiva, tanto a nivel bioquímico por ausencia de actividad lacasa, como a nivel molecular por presencia de la mutación en el ADN cromosómico del microorganismo, se iniciaron los experimentos con los que se trató de establecer alguna diferencia, de carácter fenotípico o bioquímico, entre ambas cepas. Los experimentos llevados a cabo se basaron en la información previa disponible acerca de la posible función biológica de otras lacasas bacterianas, así como de la propia cepa de *S. cyaneus*.

Como ya se comentó en la Introducción de esta memoria, los miembros del género *Streptomyces* se caracterizan por presentar un ciclo de vida complejo, en el que se distinguen una serie de etapas que implican diferentes grados de diferenciación celular. Una de las funciones con la que se ha relacionado a las lacasas bacterianas es precisamente con los procesos de morfogénesis y esporulación que tienen lugar durante el ciclo de vida del microorganismo. Concretamente, a esta conclusión se ha llegado en el estudio realizado con la lacasa denominada EpoA producida por *S. griseus* (Endo *et al.*, 2003). El hecho de que enzimas con actividad fenoloxidasas hubieran sido relacionadas con la síntesis de melanina y procesos

de diferenciación celular en hongos (Thurston, 1994; Bell y Wheeler, 1986), llevaron a estos autores a tratar de identificar una fenoloxidasa en *S. griseus* que pudiera jugar un papel en la morfogénesis del microorganismo. Así, se comprobó que la inserción de *epoA* en una cepa mutante para el factor A (sustancia que participa en la regulación de la morfogénesis) permitía la recuperación parcial tanto de la actividad lacasa como de la capacidad de la cepa para formar el micelio aéreo. Teniendo en cuenta esta información, y dado que una alteración en la morfogénesis del microorganismo es *a priori* fácilmente detectable, se decidió realizar una serie de observaciones de las distintas etapas del ciclo de diferenciación celular de las cepas mutante y silvestre de *S. cyaneus*, tanto al microscopio óptico como al electrónico de barrido. Como se ha comentado en el apartado de Resultados, no se apreció ninguna diferencia notable entre las distintas etapas de diferenciación celular de ambas cepas, ni de carácter fenotípico ni temporal. La utilización del microscopio electrónico de barrido nos permitió además la observación a una gran resolución (1 μm) de las esporas, lo que reveló la presencia en las mismas de ornamentos en forma de espículas en ambas cepas. Estos resultados, parecen indicar que la lacasa de *S. cyaneus* no juega un papel fundamental en los procesos de morfogénesis y esporulación del microorganismo.

Otra de las características fenotípicas que puede ser observada fácilmente y con la que se han relacionado bastantes lacasas bacterianas (ver Tabla 1.1) es la pigmentación de las esporas del microorganismo. En el caso de *Bacillus subtilis*, se había comprobado que los mutantes que carecen del gen de la lacasa *cotA* perdían notablemente la pigmentación de color pardo característico de las esporas, lo que a su vez se relacionó con la protección que ofrecían las mismas al microorganismo frente a la radiación ultravioleta y el peróxido de hidrógeno. Es importante resaltar que en este estudio la presencia en el medio de MnCl_2 enmascaraba las diferencias en pigmentación (Hullo *et al.*, 2001). Otras especies en las que también se ha relacionado la actividad lacasa con procesos de pigmentación son *S. galbus*

(Kuznetsov *et al.*, 1984) y *A. lipoferum* (Diamantidis *et al.*, 2000).

Resulta importante señalar que en el caso de la enzima fenoxacinona sintasa producida por *S. antibioticus*, que como ya se ha comentado anteriormente, es la enzima con la que SclA presentó una gran homología, también ha sido relacionada con la síntesis de pigmentos. Esta enzima que se relacionó en un principio con la formación del cromóforo del antibiótico actinomicina, ha sido solamente aislada de *S. antibioticus* y no de otras especies productoras de este antibiótico. Este hecho desencadenó la controversia sobre si esta enzima era fundamental para la síntesis o no del antibiótico, revelándose que en una cepa que carecía del gen *psbA* persistía la síntesis de actinomicina (Jones, 2000). Este autor sugiere que aún no habiendo observado diferencias significativas entre las cepas mutante y silvestre para *psbA*, la enzima podría estar implicada en la pigmentación de las esporas, al igual que CotA, con la que presenta una gran semejanza.

En el caso de la lacasa de *S. cyaneus*, el estudio de pigmentación se realizó en distintos medios de cultivo, comparando la coloración adquirida por las colonias aisladas de ambas cepas. La observación de las colonias puso de manifiesto que, al menos aparentemente, ambas cepas presentaban las mismas características en cuanto a color y morfología de las colonias. Sin embargo, nos parece interesante resaltar, aunque no se haya introducido este comentario en el apartado de Resultados, que en algunas ocasiones en las que se hicieron resiembras periódicas de los microorganismos en agar Bennet, se pudo observar una diferencia de intensidad en la pigmentación verdosa de las esporas, presentando las correspondientes al mutante un color verde más claro. Por ello, creemos que puede ser interesante realizar nuevos ensayos de pigmentación en otros medios y condiciones de cultivo, con el fin de poder descartar o implicar definitivamente a la lacasa de *S. cyaneus* en procesos de pigmentación de las esporas.

En nuestro interés por tratar de dilucidar la función biológica de la lacasa SclA en el microorganismo productor, continuamos el

estudio para conocer la posible implicación de la misma en la resistencia al cobre. El cobre es un elemento traza fundamental tanto para procariotas como para eucariotas y sus funciones biológicas están relacionadas con sus propiedades como metal de transición (Soliöz y Stoyanov, 2003). A pesar de ser esencial para una gran variedad de enzimas fisiológicamente importantes, el cobre puede resultar tóxico, principalmente por la participación de los iones de cobre libres en la generación de especies reactivas de oxígeno que pueden dañar a las células, causándoles por ejemplo un daño de tipo peroxidativo en los lípidos de membrana (Mattie y Freedman, 2001). La participación de oxidasas multicobre tipo lacasas de procariotas en la resistencia al cobre, se ha descrito para las proteínas PcoA y CutO producidas por *E. coli* (Huffman *et al.*, 2002) y *Rhodobacter capsulatus* (Wiethaus *et al.*, 2006), respectivamente, así como para la proteína CopA producida por *Pseudomonas syringae* (Cha y Cooksey, 1991) y *Xanthomonas campestris* (Lee *et al.*, 1994) y las proteínas CuoA, CuoB y CuoC (Sánchez-Sutil *et al.*, 2007), producidas por *Myxococcus xanthus*, entre otras.

De manera general, todos estos autores demostraron que las cepas mutantes para los genes que codifican alguna de estas proteínas, mostraban una mayor sensibilidad a elevadas concentraciones de cobre, en comparación con la cepa salvaje.

Con el objetivo de comprobar si SclA podría estar implicada en la resistencia a este metal, se llevaron a cabo cultivos tanto de la cepa mutante como silvestre en presencia de distintas concentraciones de sulfato de cobre. Para llevar a cabo el estudio de tolerancia, se optó por realizar también cultivos inducidos previamente, dado que en *Myxococcus xanthus*, microorganismo que presenta un ciclo de diferenciación celular complejo al igual que *S. cyaneus*, se ha descrito que la incubación previa con cobre hace aún más notables las diferencias observadas en el crecimiento entre la cepa silvestre y la que tiene mutados los genes implicados en la resistencia a dicho metal. El rango de concentraciones seleccionado para este estudio se basó en los datos descritos en la bibliografía en estudios similares. Para la estimación del crecimiento se estimó el

peso seco del microorganismo en las diferentes condiciones de cultivo, dado el tipo de crecimiento que presenta este microorganismo en medio líquido. Los resultados obtenidos permiten concluir que la lacasa de *S. cyaneus* no parece estar implicada en la resistencia al cobre, dado que las cepas silvestre y mutante no mostraron diferencias en su crecimiento en las distintas condiciones ensayadas.

Como última aproximación a la función biológica que podría desempeñar la lacasa de *S. cyaneus*, nos centramos en el papel de la enzima en la degradación de la lignina. La participación de las lacasas en la degradación de este polímero natural se ha demostrado de manera clara en el caso de los hongos, principalmente los denominados de podredumbre blanca (Eggert *et al.*, 1997), principales responsables de la transformación y mineralización de la lignina en la naturaleza. Sin embargo, no está aún claramente definida la implicación de las lacasas bacterianas en la degradación de este polímero. No obstante, se ha demostrado la importancia de los actinomicetos en la degradación de la lignocelulosa merced al amplio arsenal enzimático que presentan estos microorganismos (Antai y Crawford, 1981; McCarthy y Ball, 1991). En lo que se refiere a la capacidad ligninolítica de la cepa *S. cyaneus*, utilizada en este trabajo, se ha demostrado en estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, la capacidad de este microorganismo para degradar residuos lignocelulósicos de diferente naturaleza en condiciones de fermentación en estado sólido (SSF). El primero de estos estudios demostró la capacidad de la cepa para solubilizar y mineralizar lignocelulosa ¹³C de paja de trigo tras 21 días de incubación, detectándose durante el crecimiento del microorganismo la producción de actividades enzimáticas de tipo peroxidasa y lacasa, cuyos niveles más elevados se correlacionaban con las mayores tasas de mineralización (Berrocal *et al.*, 1997). Análisis microscópicos posteriores del sustrato fermentado, revelaron una extensa degradación de las células del parénquima y del tejido vascular, así como la separación de las capas S1 y S2 de la pared secundaria de células del tejido de sostén, debido a la degradación parcial de la lignina, en la que se sugirió que podía estar

implicada la actividad lacasa detectada en esas condiciones (Berrocal *et al.*, 2000).

La ausencia de datos fehacientes que permitan atribuir a las lacasas bacterianas un papel preponderante en la degradación de la lignina y el poder contar con un mutante de *S. cyaneus* carente de dicha actividad, nos condujo a realizar una serie de ensayos para tratar de demostrar la hipótesis de partida.

En primer lugar, se optó por llevar a cabo un proceso de fermentación en estado sólido con las cepas silvestre y mutante sobre paja de trigo, lo que permitió, en cierta medida, reproducir la transformación microbiológica que tiene lugar sobre un sustrato en su estado natural (Tengerdy, 1985). Por otro lado, este proceso ofrece una serie de ventajas respecto a los cultivos sumergidos, como es la mayor producción y más efectiva acción directa de las enzimas sobre el sustrato lignocelulósico (Ramachandra *et al.*, 1987; Vares *et al.*, 1995; Hofrichter *et al.*, 1999).

En el caso de los ensayos realizados en SSF, la estimación del peso seco de la álcali-lignina obtenida a partir de la paja de trigo control y fermentada con las cepas silvestre y mutante, puso de manifiesto, que la solubilización de la lignina era superior en los sustratos fermentados por ambas cepas, que en el control (hasta un 300 % tras 7 días de incubación y hasta un 500 % tras 14 días), siendo inapreciables las diferencias entre ambas cepas. Estos resultados nos permiten concluir que la lacasa de *S. cyaneus* no parece desempeñar un papel relevante en la solubilización de la lignina por este microorganismo.

A continuación, y con objeto de determinar si la presencia de la lacasa en *S. cyaneus* podría de alguna forma contribuir a modificar la estructura de la lignina, así como el grado de oxidación de las unidades fenólicas constituyentes de la misma, se llevó a cabo el análisis de las distintas álcali-ligninas obtenidas mediante la técnica de pirólisis asociada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (Py-GC-MS). Esta técnica ha demostrado su utilidad en el análisis de muestras que contienen distintos tipos de moléculas (polisacáridos, compuestos fenólicos, ácidos grasos, proteínas) debido a que a cada producto resultante de la degradación térmica se le puede atribuir un origen determinado, y en el caso de la

lignina, los productos de pirólisis de esta molécula son compuestos diagnósticos característicos (Martín *et al.*, 1979). Además, los grupos unidos a los anillos aromáticos de las diferentes unidades de lignina, no son degradados por esta técnica, lo que permite reconocer el origen de cada unidad de lignina (H, G o S) (Ralph y Hatfield, 1991).

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que existe una apreciable alteración en la relación H:G:S de la álcali-lignina obtenida tanto con la cepa silvestre como con la mutante, respecto al control, tras 7 y 14 días de incubación. Estos datos ponen de manifiesto que ambas cepas son capaces de alterar el componente aromático de la lignina de la paja de trigo. Este mismo comportamiento ha sido también observado con otros sustratos lignocelulósicos fermentados con distintas cepas de *Streptomyces* (Hernández-Coronado *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2005). Por otro lado, es de destacar la mayor proporción de unidades *p*-hidroxifenilo (H) que se observa en la álcali-lignina procedente del sustrato fermentado por ambas cepas, respecto del control, siendo más evidente en el caso de la cepa mutante. Este resultado puede ser atribuido al hecho de que las unidades H de la lignina están formando estructuras más condensadas al tener libres las posiciones 3 y 5 del anillo aromático, pudiendo establecer enlaces C-C con unidades adyacentes, lo que las hace menos susceptibles a la degradación microbiana (Fidalgo *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 2001).

Otro de los parámetros que nos permite determinar el análisis de estas muestras mediante Py-GC-MS, es el grado de oxidación de la lignina, ya que los compuestos diagnósticos derivados de las unidades de lignina, aparecen con distinto grado de oxidación (aldehído, cetona y ácido), independientemente del tipo de unidad aromática de que se trate. De este modo, se puede establecer un ratio a partir del cociente entre la suma de los compuestos de tipo aldehído y cetona y los compuestos de tipo ácido, que es indicativo del grado de oxidación de la lignina. De manera que cuanto menor es el valor de este ratio, mayor es el grado de oxidación de esta molécula.

Del análisis de este parámetro se puede deducir que la álcali-lignina obtenida de la paja de trigo fermentada con la cepa silvestre tras 7 días de

incubación, presenta un grado de oxidación mayor que el correspondiente a la álcali-lignina control y a la obtenida con la cepa mutante, lo que podría ser indicativo del efecto oxidativo producido por la lacasa. Este aumento en el grado de oxidación de la cepa productora de lacasa no es tan evidente tras 14 días de incubación.

Como conclusión a este estudio se puede deducir en primer término que la lacasa de *S. cyanus* no está directamente implicada en la degradación de la lignina, ya que el comportamiento de la cepa mutante carente de la enzima sobre un sustrato lignocelulósico resultó muy similar. Sería necesario tratar de conocer si otro tipo de enzimas oxidativas o la producción de

radicales a partir de metabolitos generados durante el crecimiento del microorganismo pudieran ser los causantes del efecto oxidativo observado en la molécula de lignina.

No obstante, resulta difícil tratar de atribuir el efecto oxidativo observado a una única enzima, si se tiene en cuenta la complejidad del proceso degradativo de la lignina en la naturaleza, en el que se ha descrito la participación de una serie de enzimas y radicales, sin que hasta el momento se haya podido determinar con exactitud en experimentos realizados “in vitro” la función específica desempeñada por cada uno de los componentes del sistema degradativo.

6. Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La lacasa de *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 no es capaz de degradar por sí misma colorantes textiles de tipo azo, a no ser en presencia de un compuesto mediador de oxidación, siendo la acetosiringona el más efectivo de los ensayados.
2. Se ha demostrado que dicha enzima es capaz de generar radicales hidroxilo a partir de la oxidación de hidroquinonas, lo que implica el descubrimiento en *Streptomyces* de una nueva estrategia oxidativa de potencial aplicación para la degradación de contaminantes de diferente naturaleza.
3. La inducción de un ciclo redox de quinonas en *S. cyaneus*, que se ha considerado como un proceso microbiano de oxidación avanzada (PMOA), permitió la decoloración y destoxificación de una serie de colorantes textiles de tipo azo, lo que prueba la eficacia de este proceso.
4. La degradación de colorantes textiles mediante un sistema lacasa-mediador no siempre se acompaña de la destoxificación de los mismos, siendo necesario por tanto, realizar ensayos de toxicidad de los productos de degradación para comprobar la eficacia real del sistema seleccionado.
5. El análisis de la secuencia de la lacasa SclA, reveló la presencia de motivos característicos de las oxidasas multicobre, entre los que cabe destacar las cuatro regiones de unión de los átomos de cobre y tres dominios de tipo cupredoxina, al igual que ocurre en la mayoría de las lacasas bacterianas descritas. Este análisis reveló asimismo la ausencia de un péptido señal en la secuencia, lo que corrobora el carácter intracelular de esta proteína.
6. La sobreexpresión de la lacasa recombinante en *Escherichia coli* mediante el sistema pET, permitió obtener bajos niveles de la proteína en forma soluble, debido a la acumulación de la misma en forma de cuerpos de inclusión. El descenso de la temperatura de cultivo por debajo del óptimo de crecimiento del microorganismo productor resultó ser la estrategia más idónea para incrementar el rendimiento de la enzima en forma soluble.
7. La caracterización físico-química de la enzima recombinante puso de manifiesto su gran estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura, así como un aumento de afinidad por el sustrato ABTS, respecto a la enzima nativa. Estas características junto con la comprobación del mantenimiento de su capacidad oxidativa en presencia de mediadores, avalan la utilidad biotecnológica de dicha enzima.
8. La obtención de un mutante no productor de lacasa mediante disrupción génica permitió abordar el estudio de su función biológica, no pudiendo atribuirse hasta el momento de forma concluyente ninguna de las funciones analizadas a la enzima producida.

7. Bibliografía

A

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A. y Gubitz, G.M.** 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3357-3362.
- Adams, L.F. y Ghiorse, W.C.** 1987. Characterization of extracellular Mn²⁺-oxidizing activity and isolation of an Mn²⁺-oxidizing protein from *Leptothrix discophora* SS-1. *J. Bacteriol.* **169**: 1279-1285.
- Adedayo, O., Javadpour, S., Taylor, C., Anderson, W.A. y Moo-Young, M.** 2004. Decolourization and detoxification of methyl red by aerobic bacteria from a wastewater treatment plant. *World J. Microb. Biot.* **20**: 545-550.
- Adler, E.** 1977. Lignin chemistry - Past, present and future. *Wood Sci. Technol.* **11**: 169-218.
- Alexandre, G., Bally, R., Taylor, B.L. y Zhulin, I.B.** 1999. Loss of cytochrome c oxidase activity and acquisition of resistance to quinone analogs in a laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* **181**: 6730-6738.
- Alexandre, G. y Zhulin, I.B.** 2000. Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol.* **18**: 41-42.
- Almansa, E., Kandelbauer, A., Pereira, L., Cavaco-Paulo, A. y Gubitz, G.M.** 2004. Influence of structure on dye degradation with laccase mediator systems. *Biocatal. Biotransform.* **22**: 315-324.
- Alnaizy, R. y Akgerman, A.** 2000. Advanced oxidation of phenolic compounds. *Adv. Environ. Res.* **4**: 233-244.
- Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D. y Hadar, Y.** 1998. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEBS Lett.* **438**: 195-200.
- Andersen, S.O., Peter, M.G. y Roepstorff, P.** 1996. Cuticular sclerotization in insects. *Comp. Biochem. Phys. B.* **113**: 689-705.
- Antonopoulos, V.T., Hernández, M., Arias, M.E., Mavrakos, E. y Ball, A.S.** 2001. The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 92-97.
- Antai, S.P. y Crawford, D.L.** 1981. Degradation of softwood, hardwood and grass lignocellulose by two *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 378-380.
- Aracri, E., Colom, J.F. y Vidal, T.** 2009. Application of laccase-natural mediator systems to sisal pulp: An effective approach to biobleaching or functionalizing pulp fibres? *Bioresource Technol.* **100**: 5911-5916.
- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W., Kanost, M.R. y Kramer, K.J.** 2005. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**: 11337-11342.
- Aranda, E., Marco-Urrea, E., Caminal, G., Arias, M.E., García-Romera, I. y Guillén, F.** 2010. Advanced oxidation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) by *Trametes versicolor*. *J. Hazard. Mater.* doi:10.1016/j.jhazmat.2010.04.114.
- Arenas, M.** 2004. Caracterización de la actividad lacasa producida por *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 y su aplicación en la industria papelera. *Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá de Henares.*
- Arias, M.E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball, A.S. y Hernández, M.** 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1953-1958.
- Arias, M.E., Polvillo, O., Rodríguez, J., Hernández, M., Molina, J.M., González-Pérez, J.A. y González-Vila, F.J.** 2005. Effect of different *Streptomyces* strains on pine wood as seen by Py-GC/MS - Implications for mechanical pulping. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **74**: 138-144.
- Askwith, C., Eide, D., Vanho, A., Bernard, P.S., Li, L.T., Daviskaplan, S., Sipe, D.M. y Kaplan, J.** 1994. The Fet3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**: 403-410.

- Augustine, A.J., Kragh, M.E., Sarangi, R., Fujii, S., Liboiron, B.D., Stoj, C.S., Kosman, D.J., Hodgson, K.O., Hedman, B. y Solomon, E.I. 2008. Spectroscopic studies of perturbed T1 Cu sites in the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and *Rhus vernicifera* laccase: allosteric coupling between the T1 and trinuclear Cu sites. *Biochemistry* **47**: 2036-2045.
- Augustine, A.J., Quintanar, L., Stoj, C.S., Kosman, D.J. y Solomon, E.I. 2007. Spectroscopic and kinetic studies of perturbed trinuclear copper clusters: the role of protons in reductive cleavage of the O-O bond in the multicopper oxidase Fet3p. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 13118-13126.
- ## B
- Backa, S., Gierer, J., Reitberger, T. y Nilsson, T. 1993. Hydroxyl radical activity associated with the growth of white-rot fungi. *Holzforschung* **47**: 181-187.
- Bains, J., Capalash, N. y Sharma, P. 2003. Laccase from a non-melanogenic, alkalotolerant gamma-proteobacterium JB isolated from industrial wastewater drained soil. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1155-1159.
- Baiocco, P., Barreca, A.M., Fabbrini, M., Galli, C. y Gentili, P. 2003. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems. *Org. Biomol. Chem.* **1**: 191-197.
- Bajpai, P., Anand, A. y Bajpai, P.K. 2006. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* **12**: 349-378.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 215-242.
- Bao, W., Omalley, D.M., Whetten, R. y Sederoff, R.R. 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* **260**: 672-674.
- Bar-Nun, N. y Mayer, A.M. 1990. Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **29**: 787-791.
- Barr, D.P., Shah, M.M., Grover, T.A. y Aust, S.D. 1992. Production of hydroxyl radical by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**: 480-485.
- Bauer, C.G., Kuhn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P.J., Bruce, N.C., Makower, A.A., Lowe, C.R. y Scheller, F.W. 1999. New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresen. J. Anal. Chem.* **364**: 179-183.
- Bautista, P., Mohedano, A.F., Casas, J.A., Zazo, J.A. y Rodríguez, J.J. 2008. An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83**: 1323-1338.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. y Hoondal, G.S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 326-338.
- Bell, A.A. y Wheeler, M.H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**: 411-451.
- Beloqui, A., Pita, M., Polaina, J., Martínez-Arias, A., Golyshina, O.V., Zumarraga, M., Yakimov, M.M., García-Arellano, H., Alcalde, M., Fernandez, V.M., Elborough, K., Andreu, J.M., Ballesteros, A., Plou, F.J., Timmis, K.N., Ferrer, M. y Golyshin, P.N. 2006. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *J. Biol. Chem.* **281**: 22933-22942.
- Beneyton, T., El Harrak, A., Griffiths, A.D., Hellwig, P. y Taly, V. 2011. Immobilization of CotA, an extremophilic laccase from *Bacillus subtilis*, on glassy carbon electrodes for biofuel cell applications. *Electrochem. Commun.* **13**: 24-27.
- Bennett, P.M., Grinsted, J. y Richmond, M.H. 1977. Transposition of *Tna* does not generate deletions. *Mol. Gen. Genet.* **154**: 205-211.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream,

- M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. y Hopwood, D.A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- Bento, I., Martins, L.O., Gato, L.G., Armenia, C.M. y Lindley, P.F. 2005. Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Trans.* 3507-3513.
- Berrio, J., Plou, F.J., Ballesteros, A., Martinez, A.T. y Martinez, M.J. 2007. Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit C: stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters. *Biocatal. Biotransform.* **25**: 130-134.
- Berrocal, M., Ball, A.S., Huerta, S., Barrasa, J.M., Hernández, M., Pérez-Leblic, M.I. y Arias, M.E. 2000. Biological upgrading of wheat straw through solid-state fermentation with *Streptomyces cyaneus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 764-771.
- Berrocal, M.M., Rodríguez, J., Ball, A.S., Pérez-Leblic, M.I. y Arias, M.E. 1997. Solubilisation and mineralisation of [¹⁴C]lignocellulose from wheat straw by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 during growth in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 379-384.
- Berrocal, M.M., Rodríguez, J., Hernández, M., Pérez, M.I., Roncero, M.B., Vidal, T., Ball, A.S. y Arias, M.E. 2004. The analysis of handsheets from wheat straw following solid substrate fermentation by *Streptomyces cyaneus* and soda cooking treatment. *Bioresource Technol.* **94**: 27-31.
- Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis 1. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 293-300.
- Bertrand, G. 1896. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **123**: 463-465.
- Bertrand, G. 1894. Sur le latex de l'arbre à laque. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **118**: 1215-1218.
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C. y Mougín, C. 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry USA* **41**: 7325-7333.
- Betts, W.B., Dart, R.K., Ball, A.S. y Pedlar, S.L. 1991. Biosynthesis and structure of lignocellulose. En "*Biodegradation: natural and synthetic materials*" (Betts, W.B. ed.), Springer-Verlag, London, pp. 139-155.
- Bibb, M.J., Findlay, P.R. y Johnson, M.W. 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* **30**: 157-166.
- Binz, T. y Canevascini, G. 1997. Purification and partial characterization of the extracellular laccase from *Ophiostoma novo-ulmi*. *Curr. Microbiol.* **35**: 278-281.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bourbonnais, R. y Paice, M.G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* **267**: 99-102.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Britton, H.T.S. 1952. Hydrogen Ions. *Chapman & Hall*, London.
- Brock, B.J., Rieble, S. y Gold, M.H. 1995. Purification and characterization of a 1,4-benzoquinone reductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3076-3081.
- Brosillon, S., Djelal, H., Merienne, N. y Amrane, A. 2008. Innovative integrated process for the treatment of azo dyes: coupling of photocatalysis and biological treatment. *Desalination* **222**: 331-339.
- Brouwers, G.J., de Vrind, J.P., Corstjens, P.L., Cornelis, P., Baysse, C. y de Vrind-de Jong E.W. 1999. *cumA*, a gene encoding a

multicopper oxidase, is involved in Mn²⁺ oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1762-1768.

Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C. y Arnold, F.H. 2003. Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 987-995.

Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P. y Ross, A.B. 1988. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$ / $\cdot\text{O}$) in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **17**: 513-886.

C

Cadena, E.M. 2008. Estudio del refinado de pastas de papel utilizando métodos biotecnológicos (enzimas). *Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Cataluña.*

Calabrese, B.S., Pickard, M., Vazquez-Duhalt, R. y Heller, A. 2002. Electroreduction of O₂ to water at 0.6 V (SHE) at pH 7 on the 'wired' *Pleurotus ostreatus* laccase cathode. *Biosens Bioelectron* **17**: 1071-1074.

Call, H.P. y Mücke, I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (Lignozym®-process). *J. Biotechnol.* **53**: 163-202.

Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Río, J.C., Gutiérrez, A., Gras, J.M., Monje, R., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme Microb. Technol.* **35**: 113-120.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, A.T., Romero, J., Gutierrez, A. y del Río, J.C. 2007. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme Microb. Technol.* **40**: 1264-1271.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1775-1784.

Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A. y Gubitz, G.M. 2001.

Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J. Biotechnol.* **89**: 131-139.

Cañas, A.I., Alcalde, M., Plou, F., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Camarero, S. 2007. Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environ. Sci. Technol.* **41**: 2964-2971.

Cañas, A.I. y Camarero, S. 2010. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol. Adv.* **28**: 694-705.

Caparros-Ruiz, D., Fornale, S., Civardi, L., Puigdomenech, P. y Rigau, J. 2006. Isolation and characterisation of a family of laccases in maize. *Plant Sci.* **171**: 217-225.

Centenera, F. 1997. Transformación de residuos lignocelulósicos por actinomicetos. *Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá de Henares.*

Cha, J.S. y Cooksey, D.A. 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**: 8915-8919.

Challis, G.L. y Hopwood, D.A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100 Suppl 2**: 14555-14561.

Chamarro, E., Marco, A. y Esplugas, S. 2001. Use of Fenton reagent to improve organic chemical biodegradability. *Water Res.* **35**: 1047-1051.

Champness, W. 2000. Actinomycete development, antibiotic production, and phylogeny: questions and challenges. En "*Prokaryotic development*" (Brun, Y. y Shimkets, L.J. eds), ASM Press, Washington DC, pp. 11-32.

Chandra, R.P. y Ragauskas, A.J. 2002. Evaluating laccase-facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. *Enzyme Microb. Technol.* **30**: 855-861.

Chater, K.F. 1984. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. En "*Microbial development*" (Shapiro, L. y Losick, R.

- eds), Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Chater, K.F.** 2000. Developmental decisions during sporulation in the aerial mycelium in *Streptomyces*. En "*Prokaryotic development*" (Brun, Y. y Shimkets, L.J. eds), ASM Press, Washington DC, pp. 33-48.
- Chater, K.F.** 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 685-713.
- Chen, K.C., Wu, J.Y., Liou, D.J. y Hwang, S.C.J.** 2003. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *J. Biotechnol.* **101**: 57-68.
- Chen, S.C., Ge, W. y Buswell, J.A.** 2004. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**: 171-176.
- Chen, T., Barton, S.C., Binyamin, G., Gao, Z., Zhang, Y., Kim, H.H. y Heller, A.** 2001. A miniature biofuel cell. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 8630-8631.
- Chiron, S., Fernández-Alba, A., Rodríguez, A. y García-Calvo, E.** 2000. Pesticide chemical oxidation: state-of-the-art. *Water Res.* **34**: 366-377.
- Chivukula, M. y Renganathan, V.** 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4374-4377.
- Christenson, A., Dimcheva, N., Ferapontova, E.E., Gorton, L., Ruzgas, T., Stoica, L., Shleev, S., Yaropolov, A.L., Haltrich, D., Thorneley, R.N.F. y Aust, S.D.** 2004. Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes. *Electroanal.* **16**: 1074-1092.
- Ciullini, I., Tili, S., Scozzafava, A. y Briganti, F.** 2008. Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes. *Bioresource Technol.* **99**: 7003-7010.
- Claus, H.** 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **179**: 145-150.
- Claus, H., Faber, G. y König, H.** 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 672-678.
- Claus, H. y Filip, Z.** 1997. The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiol. Res.* **152**: 209-216.
- Collins, P.J. y Dobson, A.D.W.** 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3444-3450.
- Colombo, V., Fernández de Heredia, M. y Malpartida, F.** 2001. A polyketide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces antibioticus* includes a LysR-type transcriptional regulator. *Microbiology* **147**: 3083-3092.
- Couto, S.R. y Sanromán, M.A.** 2007. The effect of violuric acid on the decolourization of recalcitrant dyes by laccase from *Trametes hirsuta*. *Dyes Pigments* **74**: 123-126.
- Crawford, D.L.** 1978. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 1041-1045.
- ## D
- d'Acunzo, F. y Galli, C.** 2003. First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. *Eur. J. Biochem.* **270**: 3634-3640.
- d'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V. y Sermanni, G.G.** 2000. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J. Biotechnol.* **77**: 265-273.
- D'Souza, T.M., Boominathan, K. y Reddy, C.A.** 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3739-3744.
- de Vries, O.M.H., Kooistra, W.H.C.F. y Wessels, J.G.H.** 1986. Formation of an extracellular laccase by a *Schizophyllum commune* dikaryon. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2817-2826.
- de Wilde, C., Uzan, E., Zhou, Z.Y., Kruus, K., Andberg, M., Buchert, J., Record, E., Asther, M. y Lomascolo, A.** 2008. Transgenic rice as a novel production system for

- Melanocarpus* and *Pycnoporus* laccases. *Transgenic Res.* **17**: 515-527.
- Dean, J.F.D. y Eriksson, K.E.L.** 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* **48**: 21-33.
- Deckert, G., Warren, P.V., Gaasterland, T., Young, W.G., Lenox, A.L., Graham, D.E., Overbeek, R., Snead, M.A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R.A., Short, J.M., Olsen, G.J. y Swanson, R.V.** 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**: 353-358.
- Deobald, L.A. y Crawford, D.L.** 1987. Activities of cellulase and other extracellular enzymes during lignin solubilization by *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 158-163.
- Di Fusco, M., Tortolini, C., Deriu, D. y Mazzei, F.** 2010. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta* **81**: 235-240.
- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P. y Bally, R.** 2000. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil. Biol. Biochem.* **32**: 919-927.
- Dispirito, A.A., Taaffe, L.R., Lipscomb, J.D. y Hooper, A.B.** 1985. A blue copper oxidase from *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* **827**: 320-326.
- Dittmer, N.T., Gorman, M.J. y Kanost, M.R.** 2009. Characterization of endogenous and recombinant forms of laccase-2, a multicopper oxidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**: 596-606.
- Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu, Y.C., Gorman, M.J., Kramer, K.J. y Kanost, M.R.** 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**: 29-41.
- Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J. y van Lier, J.B.** 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour. Technol.* **98**: 2369-2385.
- Driks, A.** 2004. The *Bacillus* spore coat. *Phytopathology* **94**: 1249-1251.
- Dubé, E., Shareck, F., Hurtubise, Y., Daneault, C. y Beauregard, M.** 2008. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**: 597-603.
- Durán, N. y Esposito, E.** 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B-Environ.* **28**: 83-99.
- Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P. y Kumar, A.** 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **68**: 117-128.
- ## E
- Edens, W.A., Goins, T.Q., Dooley, D. y Henson, J.M.** 1999. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3071-3074.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. y Eriksson, K.-E.L.** 1996a. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* **391**: 144-148.
- Eggert, C., Temp, U. y Eriksson, K.E.L.** 1997. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Lett.* **407**: 89-92.
- Eggert, C., Temp, U. y Eriksson, K.E.L.** 1996b. Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase and manganese peroxidase - Role of laccase in lignin biodegradation. En "Enzymes for pulp and paper processing" (Jeffries, T.W. y Viikari, L. eds), American Chemical Society, Washington, DC, pp. 130-150.
- Endo, K., Hayashi, Y., Hibi, T., Hosono, K., Beppu, T. y Ueda, K.** 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J Biochem (Tokyo)* **133**: 671-677.

- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O. y Carrondo, M.A. 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* **278**: 19416-19425.
- Esplugas, S., Bila, D.M., Krause, L.G.T. y Dezotti, M. 2007. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *J. Hazard. Mater.* **149**: 631-642.
- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F. y Veness, R.G. 1994. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 235-240.
- ## F
- Fabbrini, M., Galli, C. y Gentili, P. 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **16**: 231-240.
- Fang, Z., Li, T.L., Wang, Q.A., Zhang, X.C., Peng, H., Fang, W., Hong, Y.Z., Ge, H.H. y Xiao, Y.H. 2011. A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**: 1103-1110.
- Faraco, V., Giardina, P. y Sannia, G. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* **149**: 2155-2162.
- Faure, D., Bouillant, M.L. y Bally, R. 1995. Comparative study of substrates and inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1144-1146.
- Felby, C., Pedersen, L.S. y Nielsen, B.R. 1997. Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases. *Holzforschung* **51**: 281-286.
- Ferraroni, M., Myasoedova, N.M., Schmatchenko, V., Leontievsky, A.A., Golovleva, L.A., Scozzafava, A. y Briganti, F. 2007. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. *BMC Struct. Biol.* **7**. doi:10.1186/1472-6807-7-60.
- Ferry, Y. y Leech, D. 2005. Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode. *Electroanal.* **17**: 113-119.
- Fidalgo, M.L., Terrón, M.C., González, A.E., Martínez, A.T., González-Vila, F.J. y Galletti, G.C. 1993. Comparative studies of fractions from alkaline extraction of wheat straw through chemical degradation, analytical pyrolysis and spectroscopic techniques. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 1621-1626.
- Fillat, U. y Roncero, M.B. 2010. Optimization of laccase-mediator system in producing biobleached flax pulp. *Bioresource Technol.* **101**: 181-187.
- Fitz-Gibbon, S.T., Ladner, H., Kim, U.J., Stetter, K.O., Simon, M.I. y Miller, J.H. 2002. Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**: 984-989.
- Fjaervik, E. y Zotchev, S.B. 2005. Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 436-443.
- Flärdh, K. y Buttner, M.J. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 36-49.
- Flett, F., Mersinias, V. y Smith, C.P. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**: 223-229.
- Francis, C.A., Co, E.M. y Tebo, B.M. 2001. Enzymatic manganese(II) oxidation by a marine alpha-proteobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4024-4029.
- Francis, C.A. y Tebo, B.M. 2001. cumA multicopper oxidase genes from diverse Mn(II)-oxidizing and non-Mn(II)-oxidizing *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4272-4278.
- Fukuda, T., Uchida, H., Takashima, Y., Uwajima, T., Kawabata, T. y Suzuki, M. 2001. Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**: 704-706.

G

- Gaitán, I.J., Medina, S.C., González, J.C., Rodríguez, A., Espejo, A.J., Osma, J.F., Sarria, V., Meciga-Díaz, C.J. y Sánchez, O.F.** 2011. Evaluation of toxicity and degradation of a chlorophenol mixture by the laccase produced by *Trametes pubescens*. *Bioresource Technol.* **102**: 3632-3635.
- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C.K., Strauss, J. y Haltrich, D.** 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* **148**: 2159-2169.
- Galli, C. y Gentili, P.** 2004. Chemical messengers: mediated oxidations with the enzyme laccase. *J. Phys. Org. Chem.* **17**: 973-977.
- García, B.L., Ball, A.S., Rodríguez, J., Pérez-Leblic, M.I., Arias, E. y Copa-Patiño, J.L.** 1998. Production and characterization of ferulic acid esterase activity in crude extracts by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 213-218.
- García, O., Camarero, S., Colom, J.F., Martínez, A.T., Martínez, M.J., Monje, R. y Vidal, T.** 2003. Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* **57**: 513-519.
- García-Martín, A.B., Moya, R., Hernández, M., Arias, M.E. y Guillén, F.** 2009. Oxidación avanzada de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH) por *Pleurotus eryngii*. *XXII Congr. Nac. Microbiol., Almería, Septiembre* p. 335.
- Gardiol, A.E., Hernández, R.J., Reinhammar, B. y Harte, B.R.** 1996. Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 347-352.
- Gerber, N.N. y Lechevalier, H.A.** 1965. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **13**: 935-938.
- Ghindilis, A.L., Gavrilova, V.P. y Yaropolov, A.I.** 1992. Laccase-based biosensor for determination of polyphenols: determination of catechols in tea. *Biosens Bioelectron* **7**: 127-131.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. y Sanna, G.** 2010. Laccases: a never-ending story. *Cell Mol. Life Sci.* **67**: 369-385.
- Gierer, J. y Opara, A.E.** 1973. Studies on the enzymatic degradation of lignin. The action of peroxidase and laccase on monomeric and dimeric model compounds. *Acta Chem. Scand.* **27**: 2909-2922.
- Giovannelli, G.** 1989. Enzymic treatment of malt polyphenols for beer stabilization. *Industria delle Bevande* **18**: 497-502.
- Giovannelli, G. y Ravasini, G.** 1993. Apple juice stabilization by combined enzyme-membrane filtration process. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **26**: 1-7.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M.-L. y Bally, R.** 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**: 205-210.
- Glaze, W.H., Kang, J.W. y Chapin, D.H.** 1987. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone Sci. Eng.* **9**: 335-352.
- Gogate, P.R. y Pandit, A.B.** 2004a. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Adv. Environ. Res.* **8**: 501-551.
- Gogate, P.R. y Pandit, A.B.** 2004b. A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. *Adv. Environ. Res.* **8**: 553-597.
- Gold, M.H., Youngs, H.L. y Gelpke, M.D.** 2000. Manganese peroxidase. *Met. Ions Biol. Syst.* **37**: 559-586.
- Gómez-Toribio, V.** 2006. Mecanismos de producción extracelular de especies reactivas de oxígeno por el hongo ligninolítico *Pleurotus eryngii*. *Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.*
- Gómez-Toribio, V., García-Martín, A.B., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Guillén, F.** 2009a. Enhancing the production of hydroxyl

- radicals by *Pleurotus eryngii* via quinone redox cycling for pollutant removal. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3954-3962.
- Gómez-Toribio, V., García-Martín, A.B., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Guillén, F.** 2009b. Induction of Extracellular Hydroxyl Radical Production by White-Rot Fungi through Quinone Redox Cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3944-3953.
- González, O., Esplugas, M., Sans, C. y Esplugas, S.** 2008. Combination of photo-Fenton and biological SBBR processes for sulfamethoxazole remediation. *Water Sci. Technol.* **58**: 1707-1713.
- Goodfellow, M. y Williams, S.T.** 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**: 189-216.
- Goszczynski, S., Paszczynski, A., Pastigrigsby, M.B., Crawford, R.L. y Crawford, D.L.** 1994. New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *J. Bacteriol.* **176**: 1339-1347.
- Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A. y Forsythe, S.** 2003. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *J. Biotechnol.* **101**: 49-56.
- Gray, H.B., Malmstrom, B.G. y Williams, R.J.** 2000. Copper coordination in blue proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**: 551-559.
- Grimm, A., Madduri, K., Ali, A. y Hutchinson, C.R.** 1994. Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC-29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene* **151**: 1-10.
- Gu, Z.Y., Weidenhaupt, M., Ivanova, N., Pavlov, M., Xu, B.Z., Su, Z.G. y Janson, J.C.** 2002. Chromatographic methods for the isolation of and refolding of proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Express. Purif.* **25**: 174-179.
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M.J. y Martínez, A.T.** 2000a. Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **383**: 142-147.
- Guillén, F., Martínez, M.J., Muñoz, C. y Martínez, A.T.** 1997. Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch. Biochem. Biophys.* **339**: 190-199.
- Guillén, F., Muñoz, C., Gómez-Toribio, V., Martínez, A.T. y Martínez, M.J.** 2000b. Oxygen activation during the oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 170-175.
- Gutierrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., del Rio, J.C. y Martínez, A.T.** 2007. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environ. Sci. Technol.* **41**: 4124-4129.

H

- Haars, A. y Hüttermann, A.** 1980. Function of laccase in the white-rot fungus *Fomes annosus*. *Arch. Microbiol.* **125**: 233-237.
- Hadzhiyska, H., Calafell, M., Gibert, J.M., Daga, J.M. y Tzanov, T.** 2006. Laccase-assisted dyeing of cotton. *Biotechnol. Lett.* **28**: 755-759.
- Hagel, P., Gerding, J.J.T., Fiegggen, W. y Bloemend, H.** 1971. Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochim. Biophys. Acta* **243**: 366-373.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C.** 1981. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS Lett.* **128**: 347-352.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C.** 1999. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press Inc.*, New York.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C.** 1986. Oxygen free radicals and iron in relation of biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**: 501-514.
- Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A. y Ryan, Z.C.** 2002. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **30**: 445-453.

- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hao, J.J., Song, F.Q., Huang, F., Yang, C.L., Zhang, Z.J., Zheng, Y. y Tian, X.J.** 2007. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 233-240.
- Hao, O.J., Kim, H. y Chang, P.C.** 2000. Decolorization of wastewater. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **30**: 449-505.
- Harazono, K. y Nakamura, K.** 2005. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. *Chemosphere* **59**: 63-68.
- Harris, Z.L., Davis-Kaplan, S.R., Gitlin, J.D. y Kaplan, J.** 2004. A fungal multicopper oxidase restores iron homeostasis in aceruloplasminemia. *Blood* **103**: 4672-4673.
- Harvey, P.J., Schoemaker, H.E. y Palmer, J.M.** 1986. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* **195**: 242-246.
- Hattori, M., Tsuchihara, K., Noda, H., Konishi, H., Tamura, Y., Shinoda, T., Nakamura, M. y Hasegawa, T.** 2010. Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**: 331-338.
- Hernández, M., Hernández-Coronado, M.J., Montiel, M.D., Rodríguez, J. y Arias, M.E.** 2001. Analysis of alkali-lignin in a paper mill effluent decolourised with two *Streptomyces* strains by gas chromatography-mass spectrometry after cupric oxide degradation. *J. Chromatogr. A* **919**: 389-394.
- Hernández, M., Hernández-Coronado, M.J., Pérez, M.I., Revilla, E., Villar, J.C., Ball, A.S., Viikari, L. y Arias, M.E.** 2005. Biomechanical pulping of spruce wood chips with *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 and handsheet characterization. *Holzforschung* **59**: 173-177.
- Hernández, M., Moya, R., Molina-Guijarro, J.M., Guillén, F. y Arias, M.E.** 2011. Exploring the biotechnological applications of a halotolerant pH-versatile laccase produced by *Streptomyces ipomoea* CECT 3341. En "Microorganisms in Industry and Environment. From Scientific and Industrial Research to Consumer Products" (Mendez-Vilas, A. ed.), World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, pp. 550-554.
- Hernández, M., Rodríguez, J., Pérez, M.I., Ball, A.S. y Arias, M.E.** 1997. C-13 NMR cross polarization and magic angle spinning (CPMAS) and gas chromatography mass spectrometry analysis of the products from a soda pulp mill effluent decolourised by two *Streptomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 272-278.
- Hernández, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Copa, J.L., Pérez, M.I. y Arias, M.E.** 1994. Paper mill effluent decolorization by fifty *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3909-3913.
- Hernández-Coronado, M.J.** 1999. Potencial ligninolítico de distintas cepas de *Streptomyces* y su aplicación en la producción de pasta de papel. *Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá de Henares.*
- Hernández-Coronado, M.J., Hernández, M., Centenera, F., Pérez-Leblic, M.I., Ball, A.S. y Arias, M.E.** 1997. Chemical characterization and spectroscopic analysis of the solubilization products from wheat straw produced by *Streptomyces* strains grown in solid-state fermentation. *Microbiology* **143**: 1359-1367.
- Hernández-Coronado, M.J., Hernández, M., Rodríguez, J. y Arias, M.E.** 1998. Gas chromatography-mass spectrometry as a suitable alternative technique to evaluate the ability of *Streptomyces* to degrade lignin from lignocellulosic residues. *Rapid Commun. Mass Sp.* **1**: 1-5.
- Hernández-Romero, D., Solano, F. y Sánchez-Amat, A.** 2005. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6808-6815.
- Higuchi, T.** 1980. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. En "Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and potential applications. Vol I" (Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. eds), CRC Press, Boca Raton, pp. 1-9.

- Higuchi, T.** 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* **24**: 23-63.
- Higuchi, T.** 1997. Biochemistry and Molecular Biology of Wood. *Springer Verlag*, London.
- Higuchi, T. y Ito, Y.** 1958. Dehydrogenation products of coniferyl alcohol formed by the action of mushroom phenol oxidase, *Rhus*-laccase and radish peroxidase. *J Biochem (Tokyo)* **45**: 575-579.
- Hirai, H., Kondo, R. y Sakai, K.** 1995. Characterization of reducing abilities of white-rot fungi using tetrazolium salts. *Mokuzai Gakkaishi* **41**: 917-924.
- Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A. y Oliver, S.G.** 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 272-277.
- Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Thacker, J.R. y Kues, U.** 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J.* **273**: 2308-2326.
- Höfer, C. y Schlosser, D.** 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Lett.* **451**: 186-190.
- Hofrichter, M., Vares, T., Kalsi, M., Galkin, S., Scheibner, K., Fritsche, W. y Hatakka, A.** 1999. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1864-1870.
- Hoopes, J.T. y Dean, J.F.D.** 2004. Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 27-33.
- Hsieh, C.J. y Jones, G.H.** 1995. Nucleotide sequence, transcriptional analysis, and glucose regulation of the phenoxazinone synthase gene (phsA) from *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* **177**: 5740-5747.
- Hu, M.R., Chao, Y.P., Zhang, G.Q., Xue, Z.Q. y Qian, S.J.** 2009a. Laccase-mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 45-51.
- Hu, M.R., Chao, Y.P., Zhang, G.Q., Xue, Z.Q. y Qian, S.J.** 2009b. Laccase-mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 45-51.
- Huang, J., Liu, C., Xiao, H.Y., Wang, J.T., Jiang, D.S. y Gu, E.** 2007. Zinc tetraaminophthalocyanine-Fe₃O₄ nanoparticle composite for laccase immobilization. *Int. J. Nanomed.* **2**: 775-784.
- Huffman, D.L., Huyett, J., Outten, F.W., Doan, P.E., Finney, L.A., Hoffman, B.M. y O'Halloran, T.V.** 2002. Spectroscopy of Cu(II)-PcoC and the multicopper oxidase function of PcoA, two essential components of *Escherichia coli* pco copper resistance operon. *Biochemistry* **41**: 10046-10055.
- Hullo, M.F., Moszer, I., Danchin, A. y Martin-Verstraete, I.** 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.* **183**: 5426-5430.
- Hyde, S.M. y Wood, P.M.** 1997. A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*: Fe(III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe(II) oxidation at a distance from the hyphae. *Microbiology* **143**: 259-266.
- ## I
- Iamarino, G., Rao, M.A. y Gianfreda, L.** 2009. Dephenolization and detoxification of olive-mill wastewater (OMW) by purified biotic and abiotic oxidative catalysts. *Chemosphere* **74**: 216-223.
- Ibarra, D., Romero, J., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Camarero, S.** 2006. Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalyptus pulp by laccase-mediator. *Enzyme Microb. Technol.* **39**: 1319-1327.
- Iimura, Y., Hartikainen, P. y Tatsumi, K.** 1996. Dechlorination of tetrachloroguaiacol by laccase of white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 434-439.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki,**

Y., Hattori, M. y Omura, S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**: 526-531.

Ikehata, K., Naghashkar, N.J. y Ei-Din, M.G. 2006. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review. *Ozone-Sci. Eng.* **28**: 353-414.

Ishitara, T. y Miyazali, M. 1972. Oxidation of milled wood lignins by fungal laccase. *Mokuzai Gakkaishi* **18**: 415-419.

Isono, Y. y Hoshino, M. 1989. Laccase-like activity of nucleoside oxidase in the presence of nucleosides. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2197-2203.

Ivanov, I., Vidakovic-Koch, T. y Sundmacher, K. 2010. Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling. *Energies* **3**: 803-846.

J

Jaeger, I., Gartsler, S. y Willmund, R. 1996. Testing effluents of the textile refining industry with biological methods. *Acta Hydroch. Hydrob.* **24**: 22-30.

Jarosz-Wilkolazka, A., Ruzgas, T. y Gorton, L. 2005. Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure. *Talanta* **66**: 1219-1224.

Johannes, C. y Majcherczyk, A. 2000a. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J. Biotechnol.* **78**: 193-199.

Johannes, C. y Majcherczyk, A. 2000b. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 524-528.

Jones, G.H. 2000. Actinomycin production persists in a strain of *Streptomyces antibioticus* lacking phenoxazinone synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1322-1327.

K

Kandelbauer, A., Maute, O., Kessler, R.W., Erlacher, A. y Gubitz, G.M. 2004. Study of dye decolorization in an immobilized laccase

enzyme-reactor using online spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.* **87**: 552-563.

Kang, K.H., Dec, J., Park, H. y Bollag, J.M. 2002. Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid. *Water Res.* **36**: 4907-4915.

Katz, E. y Weissbach, H. 1962. Biosynthesis of actinomycin chromophore; enzymatic conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin. *J. Biol. Chem.* **237**: 882-886.

Kawase, T., Yokokawa, S., Saito, A., Fujii, T., Nikaidou, N., Miyashita, K. y Watanabe, T. 2006. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 988-998.

Kellner, H., Luis, P., Zimdars, B., Kiesel, B. y Busco, F. 2008. Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland Cambisol soil samples. *Soil Biol. Biochem.* **40**: 638-648.

Kieser, H.M., Kieser, T. y Hopwood, D.A. 1992. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J. Bacteriol.* **174**: 5496-5507.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. y Hopwood, D.A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. *The John Innes Foundation*, Norwich.

Kim, C., Lorenz, W.W., Hoopes, J.T. y Dean, J.F. 2001. Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* *yacK* gene. *J. Bacteriol.* **183**: 4866-4875.

Kinashi, H., Shimaji, M. y Sakai, A. 1987. Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature* **328**: 454-456.

Kirk, T.K. y Farrell, R.L. 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 465-505.

Kirk, T.K., Harkin, J.M. y Cowling, E.B. 1968. Degradation of the lignin model compound syringylglycol-beta-guaiacyl ether by *Polyporus*

- versicolor* and *Stereum frustulatum*. *Biochim. Biophys. Acta* **165**: 145-163.
- Ko, E.M., Leem, Y.E. y Choi, H.T.** 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 98-102.
- Komori, H. y Higuchi, Y.** 2010. Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins. *BioMol. Concepts* **1**: 31-40.
- Komori, H., Miyazaki, K. y Higuchi, Y.** 2009. X-ray structure of a two-domain type laccase: a missing link in the evolution of multi-copper proteins. *FEBS Lett.* **583**: 1189-1195.
- Konishi, K.Y., Miyazaki, K. y Higuchi, T.** 1974. Decomposition of lignin in *Coriolus versicolor* vs. formation of carboxyl groups in the lignin treated with fungal laccase. *Mokuzai Gakkaishi* **20**: 26-30.
- Konstantinou, I.K. y Albanis, T.A.** 2004. TiO₂-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations - A review. *Appl. Catal. B-Environ.* **49**: 1-14.
- Koschorreck, K., Richter, S.M., Ene, A.B., Roduner, E., Schmid, R.D. y Urlacher, V.B.** 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**: 217-224.
- Kosman, D.J.** 2010. Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**: 15-28.
- Kuan, I.C. y Tien, M.** 1993. Stimulation of Mn-peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1242-1246.
- Kulys, J. y Vidziunaite, R.** 2003. Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination. *Biosens. Bioelectron.* **18**: 319-325.
- Kunamneni, A., Plou, F.J., Ballesteros, A. y Alcalde, M.** 2008. Laccases and their applications: a patent review. *Recent Pat Biotechnol* **2**: 10-24.
- Kuznetsov, V.D., Filippova, S.N. y Rybakova, A.M.** 1984. Nature of the brown pigment and the composition of the phenol oxidases of *Streptomyces galbus*. *Mikrobiologia* **53**: 251-256.
- ## L
- Labat, E., Morel, M.H. y Rouau, X.** 2000. Effects of laccase and ferulic acid on wheat flour doughs. *Cereal Chem.* **77**: 823-828.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- Lahtinen, M., Kruus, K., Boer, H., Kemell, M., Andberg, M., Viikari, L. y Sipila, J.** 2009. The effect of lignin model compound structure on the rate of oxidation catalyzed by two different fungal laccases. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **57**: 204-210.
- Lapierre, C.** 1993. Application of new methods for the investigation of lignin structure. En "Forage Cell Wall Structure and Digestibility" ASA-CSSA-SSSA, Madison, pp. 133-166.
- Larrondo, L.F., Salas, L., Melo, F., Vicuña, R. y Cullen, D.** 2003. A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6257-6263.
- Law, D.J. y Timberlake, W.E.** 1980. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **144**: 509-517.
- Lawton, T.J., Sayavedra-Soto, L.A., Arp, D.J. y Rosenzweig, A.C.** 2009. Crystal structure of a two-domain multicopper oxidase. Implications for the evolution of multicopper blue proteins. *J. Biol. Chem.* **284**: 10174-10180.
- Le Roes-Hill, M., Goodwin, C. y Burton, S.** 2009. Phenoxazinone synthase: what's in a name? *Trends Biotechnol.* **27**: 248-258.
- Ledakowicz, S., Solecka, M. y Zylla, R.** 2001. Biodegradation, decolourisation and detoxification of textile wastewater enhanced by advanced oxidation processes. *J. Biotechnol.* **89**: 175-184.
- Lee, K.H., Wi, S.G., Singh, A.P. y Kim, Y.S.** 2004. Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the

- brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *J. Wood Sci.* **50**: 281-284.
- Lee, Y.A., Hendson, M., Panopoulos, N.J. y Schroth, M.N.** 1994. Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. *J. Bacteriol.* **176**: 173-188.
- Leech, D. y Daigle, F.** 1998. Optimisation of a reagentless laccase electrode for the detection of the inhibitor azide. *Analyst* **123**: 1971-1974.
- Legrini, O., Oliveros, E. y Braun, A.M.** 1993. Photochemical processes for water-treatment. *Chem. Rev.* **93**: 671-698.
- Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N. y Golovleva, L.** 1997a. 'Yellow' laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. *FEBS Lett.* **413**: 446-448.
- Leontievsky, A.A., Myasoedova, N.M., Baskunov, B.P., Golovleva, L.A., Bucke, C. y Evans, C.S.** 2001. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 85-91.
- Leontievsky, A.A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J.K., Pozdnyakova, N.N., Myasoedova, N.M., Kalkkinen, N., Golovleva, L.A., Cammack, R., Thurston, C.F. y Hatakka, A.** 1997b. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**: 9-14.
- Li, H., Webb, S.P., Ivanic, J. y Jensen, J.H.** 2004. Determinants of the relative reduction potentials of type-1 copper sites in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 8010-8019.
- Li, K., Helm, R.F. y Eriksson, K.-E.L.** 1998. Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/1-hydroxybenzotriazole redox system. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **27**: 239-243.
- Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A. y Chen, C.W.** 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* **10**: 923-933.
- Littoz, F. y McClements, D.J.** 2008. Bio-mimetic approach to improving emulsion stability: cross-linking adsorbed beet pectin layers using laccase. *Food Hydrocolloid.* **22**: 1203-1211.
- Litvintseva, A.P. y Henson, J.M.** 2002. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1305-1311.
- Liu, L., Tewari, R.P. y Williamson, P.R.** 1999. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect. Immun.* **67**: 6034-6039.
- Locci, R., Baldacci, E. y Baldan, B.P.** 1969. Genus *Streptoverticillium* - A Taxonomic Study. *Giorn. Microbiol.* **17**: 1-60.
- López, C., Valade, A.G., Combourieu, B., Mielgo, M., Bouchon, B. y Lema, J.M.** 2004. Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ H-1 nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-trap mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **335**: 135-149.
- López, C.L.** 1995. Caracterización del complejo xilanolítico producido por *Streptomyces chattanoogensis* UAH 23. Aplicación en el blanqueo de pasta de papel. *Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá de Henares.*
- López, C.L., Rodríguez, J., Soliveri, J., Copapatino, J.L., Pérez-Leblic, M.I. y Arias, M.E.** 1995. The effects of culture media on the production of xylan-degrading enzymes by *Streptomyces chattanoogensis* UAH 23. *J. Basic Microbiol.* **43**: 405-412.
- López, M.J., Guisado, G., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F. y Moreno, J.** 2006. Decolorization of industrial dyes by ligninolytic microorganisms isolated from composting environment. *Enzyme Microb. Technol.* **40**: 42-45.
- Lorenzo, M., Moldes, D., Couto, S.R. y Sanroman, M.A.** 2005. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere* **60**: 1124-1128.
- Lu, L., Zhao, M., Li, D.B., Zhao, L.Y., Du, M.H., Wang, T.N., Li, T.L. y Pan, J.B.** 2011.

- Mediator-based decolorization of recalcitrant dyes with laccase from *Bacillus amyloliquefaciens* LS01. *Environmental Biotechnology and Materials Engineering, Pts 1-3* **183-185**: 768-772.
- Lucas-Elio, P., Solano, F. y Sánchez-Amat, A.** 2002. Regulation of polyphenol oxidase activities and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*: identification of *ppoS*, a gene encoding a sensor histidine kinase. *Microbiology* **148**: 2457-2466.
- Lyashenko, A.V., Zhukhlistova, N.E., Gabdoulkhakov, A.G., Zhukova, Y.N., Voelter, W., Zaitsev, V.N., Bento, I., Stepanova, E.V., Kachalova, G.S., Koroleva, O.V., Cherkashyn, E.A., Tishkov, V.I., Lamzin, V.S., Schirwitz, K., Morgunova, E.Y., Betzel, C., Lindley, P.F. y Mikhailov, A.M.** 2006. Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima*. *Acta Crystallogr. F.* **62**: 954-957.
- ## M
- Maalej-Kammoun, M., Zouari-Mechichi, H., Belbahri, L., Woodward, S. y Mechichi, T.** 2009. Malachite green decolorization and detoxification by the laccase from a newly isolated strain of *Trametes* sp. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **63**: 600-606.
- Machczynski, M.C., Vijgenboom, E., Samyn, B. y Canters, G.W.** 2004. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Sci.* **13**: 2388-2397.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J.** 2004. La diversidad procariota: *Bacteria*. En "Brock. Biología de los microorganismos" Pearson Educación, S.A., Madrid, pp. 414-418.
- Madzak, C., Otterbein, L., Chamkha, M., Moukha, S., Asther, M., Gaillardin, C. y Beckerich, J.M.** 2005. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* **5**: 635-646.
- Mai, C., Majcherczyk, A. y Huttermann, A.** 2000. Chemo-enzymatic synthesis and characterization of graft copolymers from lignin and acrylic compounds. *Enzyme Microb. Technol.* **27**: 167-175.
- Mansur, M., Suárez, T., Fernández-Larrea, J.B., Brizuela, M.A. y González, A.E.** 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2637-2646.
- Marco, A., Esplugas, S. y Saum, G.** 1997. How and why to combine chemical and biological processes for wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* **35**: 321-327.
- Marco-Urrea, E., Aranda, E., Caminal, G. y Guillén, F.** 2009. Induction of hydroxyl radical production in *Trametes versicolor* to degrade recalcitrant chlorinated hydrocarbons. *Bioresource Technol.* **100**: 5757-5762.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Blánquez, P., Vicent, T. y Caminal, G.** 2010a. Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. *Bioresource Technol.* **101**: 2159-2166.
- Marco-Urrea, E., Perez-Trujillo, M., Cruz-Morato, C., Caminal, G. y Vicent, T.** 2010b. White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR. *Chemosphere* **78**: 474-481.
- Marco-Urrea, E., Radjenovic, J., Caminal, G., Petrovic, M., Vicent, T. y Barceló, D.** 2010c. Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibric acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Water Res.* **44**: 521-532.
- Marques de Souza, C.G. y Peralta, R.M.** 2003. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *J. Basic Microbiol.* **43**: 278-286.
- Martín, F., Sainz-Jiménez, C. y González-Vila, F.J.** 1979. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of lignin. *Holzforschung.* **33**: 210-212.
- Martínez, A.T.** 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* **30**: 425-444.
- Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F. y Martínez, A.T.** 1996. Purification and catalytic properties of two manganese-

- peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* **237**: 424-432.
- Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H. y Henriques, A.O.** 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase which occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* **277**: 18849-18859.
- Martirani, L., Giardina, P., Marzullo, L. y Sanna, G.** 1996. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* **30**: 1914-1918.
- Maruyama, T., Komatsu, C., Michizoe, J., Sakai, S. y Goto, M.** 2007. Laccase-mediated degradation and reduction of toxicity of the postharvest fungicide imazalil. *Process Biochem.* **42**: 459-461.
- Mason, M.G., Wilson, M.T., Ball, A. y Nicholls, P.** 2002. Oxygen reduction by cellobiose oxidoreductase: the role of the haem group. *FEBS Lett.* **518**: 29-32.
- Mate, D., García-Ruiz, E., Camarero, S. y Alcalde, M.** 2011. Directed evolution of fungal laccases. *Current Genomics* **12**: 113-122.
- Matera, I., Gullotto, A., Tilli, S., Ferraroni, M., Scozzafava, A. y Briganti, F.** 2008. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate. *Inorg. Chim. Acta* **361**: 4129-4137.
- Mattie, M.D. y Freedman, J.H.** 2001. Protective effects of aspirin and vitamin E (alpha-tocopherol) against copper- and cadmium-induced toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **285**: 921-925.
- Mayer, A.M. y Staples, R.C.** 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551-565.
- Mazodier, P., Petter, R. y Thompson, C.** 1989. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* **171**: 3583-3585.
- McCarthy, A.J. y Ball, A.S.** 1991. Actinomycete enzymes and activities involved in straw saccharification. En "*Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*" (Betts, W.B. ed.) Springer-Verlag, London, pp. 185-199.
- McCarthy, A.J. y Williams, S.T.** 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene* **115**: 189-192.
- McDonough, T.J.** 1995. Recent advances in bleached chemical pulp manufacturing technology. Part I: extended delignification, oxygen delignification, enzyme application, and ECF and TCF bleaching. *Tappi J.* **78**: 55-62.
- Messerschmidt, A.** 1997. Copper metalloenzymes. En "*Comprehensive biological catalysis*" (Sinnott, M. ed.), Accademic Press, London, pp. 401-426.
- Messerschmidt, A. y Huber, A.** 1990. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.* **187**: 341-352.
- Mikolasch, A., Niedermeyer, T.H., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer, F., Gesell, M., Hessel, S., Julich, W.D. y Lindequist, U.** 2006. Novel penicillins synthesized by biotransformation using laccase from *Trametes species*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **54**: 632-638.
- Min, K.-L., Kim, Y.-H., Kim, Y.W., Jung, H.S. y Hah, Y.C.** 2001. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **392**: 279-286.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M. y Durán, N.** 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Tech.* **13**: 205-216.
- Miyazaki, K.** 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* **9**: 415-425.
- Moldes, D., Diaz, M., Tzanov, T. y Vidal, T.** 2008. Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresource Technol.* **99**: 7959-7965.
- Molina, J.M., Guillén, F., Rodríguez, J., Hernández, M., Pérez, M.I. y Arias, M.E.** 2005. Characterization of a new laccase produced by *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 and its reactivity with pulps in the presence of

- mediators. *Proc. COST E-23 Conference on "Biotechnology for pulp and paper manufacture: from tailor-made biocatalysts to mill application"* Bayona, April 26-29: 107-108.
- Molina-Guijarro, J.M., Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Guillén, F., Moya, R., Hernández, M. y Arias, M.E.** 2009. Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. *Int. Microbiol.* **12**: 13-21.
- Monterreali, M.R., la Seta, L., Vastarella, W. y Pilloton, R.** 2010. A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **64**: 189-194.
- Montiel, M.D., Hernández, M., Rodríguez, J. y Arias, M.E.** 2002. Evaluation of an endo- β -mannanase produced by *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 for the biobleaching of pine kraft pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 67-72.
- Montiel, M.D., Rodríguez, J., Pérez-Leblic, M.I., Hernández, M., Arias, M.E. y Copa-Patiño, J.L.** 1999. Screening of mannanases in actinomycetes and their potential application in the biobleaching of pine kraft pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 240-245.
- Morpurgo, L., Desideri, A. y Rotilio, G.** 1982. Heterogeneity of the Type 3 copper in Japanese-lacquer-tree (*Rhus vernicifera*) laccase. *Biochem. J.* **207**: 625-627.
- Moya, R., García-Martín, A.B., Pérez-Leblic, M.I., Troyano, N., Arias, M.E. y Guillén, F.** 2006. Oxidación avanzada de colorantes textiles por microorganismos ligninolíticos. *Abs. I Reunión del Grupo Especializado de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana* p. 74.
- Moya, R., Hernandez, M., Rodríguez, J., Guillén, F. y Arias, M.E.** 2009. Extracellular production of hydroxyl radical by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 via quinone redox cycling: a new strategy for BTEX degradation. *Abs. III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. BioMicroWorld 2009* p. 685.
- Moya, R., Hernández, M., García-Martín, A.B., Ball, A.S., Arias, M.E.** 2010. Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Bioresource Technol.* **101**: 2224-2229.
- Mulder, M., Pureveen, J.B.M., Boon, J.J. y Martínez, A.T.** 1991. An analytical pyrolysis mass spectrometry study of *Eucryphia cordifolia* wood decayed by white rot and brown rot fungi. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* **19**: 175-191.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J.** 1997a. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2166-2174.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J.** 1997b. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Curr. Microbiol.* **34**: 1-5.
- Murugesan, K., Chang, Y.Y., Kim, Y.M., Jong-Rok, J., Kim, E.J. y Chang, Y.S.** 2010. Enhanced transformation of triclosan by laccase in the presence of redox mediators. *Water Res.* **44**: 298-308.
- Murugesan, K., Kim, Y.M., Jeon, J.R. y Chang, Y.S.** 2009. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*. *J. Hazard. Mater.* **168**: 523-529.
- Mustafa, R., Muniglia, L., Rovel, B. y Girardin, M.** 2005. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Res. Int.* **38**: 995-1000.

N

- Nadarajah, N., Van Hamme, J., Pannu, J., Singh, A. y Ward, O.** 2002. Enhanced transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons using a combined Fenton's reagent, microbial treatment and surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 540-544.
- Nakamura, K. y Go, N.** 2005. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **62**: 2050-2066.
- Nakamura, K., Kawabata, T., Yura, K. y Go, N.** 2003. Novel types of two-domain multicopper oxidases: possible missing links in the evolution. *FEBS Lett.* **553**: 239-244.

- Nicotra, S., Cramarossa, M.R., Mucci, A., Pagnoni, U.M., Riva, S. y Forti, L. 2004. Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron* **60**: 595-600.
- Niladevi, K.N., Sheejadevi, P.S. y Prema, P. 2008. Strategies for enhancing laccase yield from *Streptomyces psammotiscus* and its role in mediator-based decolorization of azo dyes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **151**: 9-19.
- Nimz, H. 1974. Beech lignin - Proposal of a constitutional scheme. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **13**: 313-321.
- Nitta, K., Kataoka, K. y Sakurai, T. 2002. Primary structure of a Japanese lacquer tree laccase as a prototype enzyme of multicopper oxidases. *J. Inorg. Biochem.* **91**: 125-131.
- Norsker, M., Jensen, M. y Adler-Nissen, J. 2000. Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. *Food Hydrocolloid.* **14**: 237-243.
- O**
- Ohga, S. y Royse, D.J. 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. *FEMS Microbiol. Lett.* **201**: 111-115.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. y Horinouchi, S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **190**: 4050-4060.
- Okazaki, M., Sugita, T., Shimizu, M., Ohode, Y., Iwamoto, K., deVrinddeJong, E.W., deVrind, J.P.M. y Corstjens, P.L.A.M. 1997. Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4793-4799.
- Oshima, R., Yamauchi, Y., Watanabe, C. y Kumanotani, J. 1985. Enzymic oxidative coupling of urushiol in sap of the lac tree, *Rhus vernicifera*. *J. Org. Chem.* **50**: 2613-2621.
- Osma, J.F., Toca-Herrera, J.L. y Rodríguez-Couto, S. 2010. Uses of laccases in the food industry. *Enzyme Res.* **2010**: 918761.
- P**
- Palmer, A.E., Lee, S.K. y Solomon, E.I. 2001. Decay of the peroxide intermediate in laccase: Reductive cleavage of the O-O bond. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 6591-6599.
- Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G. y Giardina, P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **33**: 220-230.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. y Sannia, G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 920-924.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. y Sannia, G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* **272**: 31301-31307.
- Parajuli, N., Basnet, D.B., Lee, H.C., Sohng, J.K. y Liou, K. 2004. Genome analyses of *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 for the identification and comparison of cytochrome P450 complement with other *Streptomyces*. *Arch. Biochem. Biophys.* **425**: 233-241.
- Pedersen, H., Holder, S., Sutherlin, D.P., Schwitter, U., King, D.S. y Schultz, P.G. 1998. A method for directed evolution and functional cloning of enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 10523-10528.
- Peisach, J. y Levine, W.G. 1965. A comparison of the enzymic activities of pig ceruloplasmin and *Rhus vernicifera* laccase. *J. Biol. Chem.* **240**: 2284-2289.
- Pera-Titus, M., García-Molina, V., Baños, M.A., Giménez, J. y Esplugas, S. 2004. Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Appl. Catal. B: Environ.* **47**: 219-256.
- Pereira, L., Coelho, A.V., Viegas, C.A., dos Santos, M.M.C., Robalo, M.P., Martins, L.O. 2009. Enzymatic biotransformation of the

- azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase. *J. Biotechnol.* **139**: 68–77.
- Pick, E. y Keisari, Y.** 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* **38**: 161-170.
- Pignatello, J.J., Oliveros, E. y MacKay, A.** 2006. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **36**: 1-84.
- Piontek, K., Antorini, M. y Choinowski, T.** 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* **277**: 37663-37669.
- Pointing, S.B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 20-33.
- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L. y Debeaujon, I.** 2005. *Transparent testa10* encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell* **17**: 2966-2980.
- Pozdnyakova, N.N., Rodakiewicz-Nowak, J. y Turkovskaya, O.V.** 2004. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **30**: 19-24.
- Q**
- Quintanar, L., Yoon, J.J., Aznar, C.P., Palmer, A.E., Andersson, K.K., Britt, R.D. y Solomon, E.I.** 2005. Spectroscopic and electronic structure studies of the trinuclear Cu cluster active site of the multicopper oxidase laccase: nature of its coordination unsaturation. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 13832-13845.
- R**
- Ragnar, M., Lindgren, C.T. y Nilvebrant, N.O.** 2000. pK_a values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. *J. Wood Chem. Technol.* **20**: 277-305.
- Ralph, J. y Hatfield, R.D.** 1991. Pyrolysis GC-MS characterization of forage materials. *J. Agric. Food Chem.* **39**: 1426-1437.
- Ramachandra, M., Crawford, D.L. y Pometto, A.L.** 1987. Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp.: a comparative study of wild-type and genetically manipulated strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2754-2760.
- Ranocha, P., Chabannes, M., Chamayou, S., Danoun, S., Jauneau, A., Boudet, A.M. y Goffner, D.** 2002. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol.* **129**: 145-155.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A.M. y Goffner, D.** 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - a divergent gene family - in poplar. *Eur. J. Biochem.* **259**: 485-495.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. y Deshpande, V.V.** 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 597-635.
- Reeve, D.W., Weishar, K.M. y Li, L.** 1995. Process modifications to decrease organochlorine formation during chlorine dioxide delignification. *J. Pulp Paper Sci.* **21**: 197-202.
- Regalado, V., Perestelo, F., Rodríguez, A., Carnicero, A., Sosa, F.J., de la Fuente, G. y Falcón, M.A.** 1999. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 388-390.
- Reinhammar, B. y Malmström, B.G.** 1981. "Blue" copper-containing oxidases. En "*Copper proteins*" (Spiro, T.G. ed.), Wiley, New York, pp. 109-149.
- Reinhammar, B.R.** 1972. Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin. *Biochim. Biophys. Acta* **275**: 245-259.
- Reiss, R., Ihssen, J. y Thony-Meyer, L.** 2011. *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnol.* **11**: 9-19.

- Richardson, A. y McDougall, G.J.** 1997. A laccase-type polyphenol oxidase from lignifying xylem of tobacco. *Phytochemistry* **44**: 229-235.
- Rintala, J.A. y Puhakka, J.A.** 1994. Anaerobic treatment in pulp and paper-mill waste management: a review. *Bioresource Technol.* **47**: 1-18.
- Rob, A., Hernández, M., Ball, A.S., Tuncer, M., Arias, M.E. y Wilson, M.T.** 1997. Production and partial characterization of extracellular peroxidases produced by *Streptomyces avermitilis* UAH30. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **62**: 159-174.
- Roberts, S.A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J.T., Tollin, G., Rensing, C. y Montfort, W.R.** 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**: 2766-2771.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. y Nigam, P.** 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technol.* **77**: 247-255.
- Rodríguez Couto, S.** 2007. Decolouration of industrial azo dyes by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *J. Hazard. Mater.* **148**: 768-770.
- Rodríguez Couto, S., Sanromán, M.A. y Gubitz, G.M.** 2005. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere* **58**: 417-422.
- Rodríguez Couto, S. y Toca Herrera, J.L.** 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.* **24**: 500-513.
- Rodríguez Couto, S. y Toca-Herrera, J.L.** 2006. Laccases in the textile industry. *Biotechnol. Mol. Biol.* **1**: 117-122.
- Rosconi, F., Fraguas, L.F., Martínez-Drets, G. y Castro-Sowinski, S.** 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme Microb. Technol.* **36**: 800-807.
- Roy, J.J., Abraham, T.E., Abhijith, K.S., Kumar, P.V.S. y Thakur, M.S.** 2005. Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. *Biosens Bioelectron* **21**: 206-211.
- Ruijsenaars, H.J. y Hartmans, S.** 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 177-182.
- ## S
- Sakakibara, A.** 1991. Chemistry of Lignin. En "Wood and Cellulosic Chemistry" (Hon, D.N.S. y Shiraiishi, N. eds), Marcel Dekker, New York, pp. 113-175.
- Sambrook, J. y Russell, D.W.** 2001. Molecular cloning. *CSHL Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez, L. y Braña, A.F.** 1996. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* **142**: 1209-1220.
- Sánchez-Amat, A., Lucas-Elio, P., Fernández, E., García-Borrón, J.C. y Solano, F.** 2001. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *BBA Protein Struct. Mol. Enzym.* **1547**: 104-116.
- Sánchez-Amat, A. y 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**: 787-792.
- Sánchez-Sutil, M.C., Gómez-Santos, N., Moraleda-Muñoz, A., Martins, L.O., Pérez, J. y Muñoz-Dorado, J.** 2007. Differential expression of the three multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **189**: 4887-4898.
- Sato, Y., Bao, W.L., Sederoff, R. y Whetten, R.** 2001. Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J. Plant Res.* **114**: 147-155.
- Schoemaker, H.E.** 1990. On the chemistry of lignin degradation. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **109**: 255-272.
- Schoemaker, H.E., Harvey, P.J., Bowen, R.M. y Palmer, J.M.** 1985. On the mechanism of

- enzymatic lignin breakdown. *FEBS Lett.* **183**: 7-12.
- Schwartz, D., Grammel, N., Heinzelmann, E., Keller, U. y Wohlleben, W.** 2005. Phosphinothricin tripeptide synthetases in *Streptomyces viridochromogenes* Tu494. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 4598-4607.
- Sei, K., Takeda, T., Soda, S.O., Fujita, M. y Ike, M.** 2008. Removal characteristics of endocrine-disrupting chemicals by laccase from white-rot fungi. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* **43**: 53-60.
- Selcuk, H.** 2005. Decolorization and detoxification of textile wastewater by ozonation and coagulation processes. *Dyes Pigments* **64**: 217-222.
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A. y Autio, K.** 2006. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science* **43**: 152-159.
- Selvam, K., Swaminathan, K., Rasappan, K., Rajendran, R., Michael, A. y Pattabi, S.** 2005. Deinking of waste papers by white rot fungi *Fomes lividus*, *Thelephora* sp. and *Trametes versicolor*. *Nat. Environ. Pollut. Technol.* **4**: 399-404.
- Semenov, A.N., Lomonosova, I.V., Berezin, V.I. y Titov, M.I.** 1993. Peroxidase and laccase as catalysts for removal of the phenylhydrazide protecting group under mild conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 1137-1141.
- Servili, M., DeStefano, G., Piacquadio, P. y Sciancalepore, V.** 2000. A novel method for removing phenols from grape must. *Am. J. Enol. Viticult.* **51**: 357-361.
- Setti, L., Giuliani, S., Spinozzi, G. y Pifferi, P.G.** 1999. Laccase catalyzed-oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme Microb. Technol.* **25**: 285-289.
- Sezgintürk, M.K., Odaci, D., Pazarlioglu, N., Pilloton, R., Dinckaya, E., Telefoncu, A. y Timur, S.** 2010. Construction and comparison of *Trametes versicolor* laccase biosensors capable of detecting xenobiotics. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology* **38**: 192-199.
- Sharma, K.K. y Kuhad, R.C.** 2009. An evidence of laccases in archaea. *Indian J. Microbiol.* **49**: 142-150.
- Sharma, P., Goel, R. y Capalash, N.** 2007. Bacterial laccases. *World J. Microb. Biot.* **23**: 823-832.
- Shimada, M., Akamtsu, Y., Tokimatsu, T., Mii, K. y Hattori, T.** 1997. Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. *J. Biotechnol.* **53**: 103-113.
- Shin, W., Sundaram, U.M., Cole, J.L., Zhang, H.H., Hedman, B., Hodgson, K.O. y Solomon, E.I.** 1996. Chemical and spectroscopic definition of the peroxide-level intermediate in the multicopper oxidases: Relevance to the catalytic mechanism of dioxygen reduction to water. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 3202-3215.
- Shleev, S.V., Christenson, A., Serezhenkov, V., Burbaev, D., Yaropolov, A., Gorton, L. y Ruzgas, T.** 2005. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. *Biochem. J.* **385**: 745-754.
- Shleev, S.V., Khan, I.G., Morozova, O.V., Mazhugo, Y.M., Khalunina, A.S. y Yaropolov, A.I.** 2004. Phenylpyrazolones, novel oxidoreductase redox mediators for degradation of xenobiotics. *Appl. Biochem. Microbiol.* **40**: 140-145.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J., Sigoillot, J.C., Asther, M., Colom, J.F. y Martínez, A.T.** 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J. Biotechnol.* **115**: 333-343.
- Sigoillot, C., Record, E., Belle, V., Robert, J.L., Levasseur, A., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J., Fournel, A., Sigoillot, J.C. y Asther, M.** 2004. Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 346-352.
- Singh, G., Capalash, N., Goel, R. y Sharma, P.** 2007. A pH-stable laccase from alkali-tolerant gamma-proteobacterium JB: Purification,

- characterization and indigo carmine degradation. *Enzyme Microb. Technol.* **41**: 794-799.
- Sirim, D., Wagner, F., Wang, L., Schmid, R.D. y Pleiss, J.** 2011. The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. *Database.* (Oxford) **2011**: doi:10.1093/database/bar006.
- Sitthisak, S., Howieson, K., Amezola, C. y Jayaswal, R.K.** 2005. Characterization of a multicopper oxidase gene from *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5650-5653.
- Sixta, H.** 2006. Introduction. En "Handbook of pulp" (Sixta, H. ed.), Wiley-VCH, Viena, pp. 3-19.
- Skálová, T., Dohnálek, J., Ostergaard, L.H., Osteryaard, P.R., Kolenko, P., Duková, J., Stepánková, A. y Hasek, J.** 2009. The Structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases. *J. Mol. Biol.* **385**: 1165-1178.
- Skálová, T., Dusková, J., Hasek, J., Stepánková, A., Koval, T., Ostergaard, L.H. y Dohnálek, J.** 2011. Structure of laccase from *Streptomyces coelicolor* after soaking with potassium hexacyanoferrate and at an improved resolution of 2.3 angstrom. *Acta Crystallogr.* **67**: 27-32.
- Soares, G.M.B., de Amorim, M.T.P. y Costa-Ferreira, M.** 2001. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *J. Biotechnol.* **89**: 123-129.
- Soden, D.M. y Dobson, A.D.W.** 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* **147**: 1755-1763.
- Solioz, M. y Stoyanov, J.V.** 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 183-195.
- Solomon, E.I., Augustine, A.J. y Yoon, J.** 2008. O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases. *Dalton Trans.* 3921-3932.
- Solomon, E.I., Chen, P., Metz, M., Lee, S.K. y Palmer, A.E.** 2001. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**: 4570-4590.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M. y Machonkin, T.E.** 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**: 2563-2605.
- Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Srebotnik, E. y Hammel, K.E.** 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *J. Biotechnol.* **81**: 179-188.
- Sterjiades, R., Dean, J.F.D. y Eriksson, K.E.L.** 1992. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiol.* **99**: 1162-1168.
- Strohl, W.R.** 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* **20**: 961-974.
- Strong, P.J. y Burgess, J.E.** 2008. Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters: A review. *Bioremediation Journal* **12**: 70-87.
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K. y Inamori, Y.** 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 2167-2175.

T

- Tadesse, M.A., d'Annibale, A., Galli, C., Gentili, P. y Sergi, F.** 2008. An assessment of the relative contributions of redox and steric issues to laccase specificity towards putative substrates. *Org. Biomol. Chem.* **6**: 868-878.
- Takahashi, H. y Hashimoto, Y.** 2001. Formaldehyde-mediated modification of natural deoxyguanosine with amines: one-pot cyclization as a molecular model for genotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**: 729-731.
- Takami, H., Takaki, Y. y Uchiyama, I.** 2002. Genome sequence of *Oceanobacillus ibeyensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments. *Nucleic Acids Res.* **30**: 3927-3935.

- Talbot, N.J.** 2003. Aerial morphogenesis: enter the chaplins. *Curr. Biol.* **13**: R696-R698.
- Tanaka, H., Itakura, S. y Enoki, A.** 1999. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung* **53**: 21-28.
- Tanaka, T., Tonosaki, T., Nose, M., Tomidokoro, N., Kadomura, N., Fujii, T. y Taniguchi, M.** 2001. Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemicals with laccase from *Trametes* sp in a rotating reactor. *J. Biosci. Bioeng.* **92**: 312-316.
- Tauber, M.M., Guebitz, G.M. y Rehorek, A.** 2005. Degradation of azo dyes by laccase and ultrasound treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2600-2607.
- Teichmann, R.** 1995. Toxicity determination with the luminescent bacteria test—applications examples in textiles. *Melliand Textilberichte.* **76**: 1106-1108.
- Tengerdy, R.P.** 1985. Solid substrate fermentation. *Trends Biotechnol.* **3**: 96-99.
- Thomas, B.R., Yonekura, M., Morgan, T.D., Czaplá, T.H., Hopkins, T.L. y Kramer, K.J.** 1989. A trypsin-solubilized laccase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **19**: 611-622.
- Thompson, C.J., Fink, D. y Nguyen, L.D.** 2002. Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol.* **3**: reviews1020.1–reviews1020.4.
- Thurston, C.F.** 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26.
- Tzanov, T., Basto, C., Guebitz, G.M. y Cavaco-Paulo, A.** 2003. Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton. *Macromol. Mater. Eng.* **288**: 807-810.
- U**
- Uthandi, S., Saad, B., Humbard, M.A. y Maupin-Furlow, J.A.** 2010. LccA, an archaeal laccase secreted as a highly stable glycoprotein into the extracellular medium by *Haloferax volcanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 733-743.
- Uyama, H. y Kobayashi, S.** 2002. Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **785**: 1-11.
- V**
- Valdez, E. y Obaya, M.C.** 1985. Estudio del tratamiento anaeróbico de los residuales de la industria alcoholera. *Revista ICIDCA* **19**: 7-10.
- Vallejo, L.F. y Rinas, U.** 2004. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb. Cell Fact.* **3**: 11-23.
- van der Zee, F.P.** 2002. Anaerobic azo dye reduction. *Tesis Doctoral, Universidad de Wageningen.*
- Van Waasbergen, L.G., Hildebrand, M. y Tebo, B.M.** 1996. Identification and characterization of a gene cluster involved in manganese oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *J. Bacteriol.* **178**: 3517-3530.
- Vares, T., Kalsi, M. y Hatakka, A.** 1995. Lignin peroxidase, manganese peroxidase and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. *Environ. Microbiol.* **61**: 3515-3520.
- Vera, A., González-Montalbán, N., Arís, A. y Villaverde, A.** 2007. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* **96**: 1101-1106.
- Vinodgopal, K. y Peller, J.** 2003. Hydroxyl radical-mediated advanced oxidation processes for textile dyes: a comparison of the radiolytic and sonolytic degradation of the monoazo dye Acid Orange 7. *Res. Chem. Intermed.* **29**: 307-316.
- Viterbo, A., Staples, R.C., Yagen, B. y Mayer, A.M.** 1994. Selective mode of action of cucurbitacin in the inhibition of laccase formation in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **35**: 1137-1142.
- Vulpe, C.D., Kuo, Y.M., Murphy, T.L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J. y Anderson, G.J.** 1999.

Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat. Genet.* **21**: 195-199.

W

Wallemacq, P.E. y Reding, R. 1993. FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. *Clin. Chem.* **39**: 2219-2228.

Wang, G.D., Li, Q.J., Luo, B. y Chen, X.Y. 2004. *Ex planta* phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase. *Nat. Biotechnol.* **22**: 893-897.

Wang, H.X. y Ng, T.B. 2004. A novel laccase with fair thermostability from the edible wild mushroom (*Albatrella dispansus*). *Biochem. Bioph. Res. Co.* **319**: 381-385.

Wang, X.J., Yan, Y.J., Zhang, B., An, J., Wang, J.J., Tian, J., Jiang, L., Chen, Y.H., Huang, S.X., Yin, M., Zhang, J., Gao, A.L., Liu, C.X., Zhu, Z.X. y Xiang, W.S. 2010. Genome sequence of the Milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchengensis*. *J. Bacteriol.* **192**: doi:10.1128/JB.00596-10.

Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. y Bhole, B.D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* **176**: 386-390.

Wei, D.S., Houtman, C.J., Kapich, A.N., Hunt, C.G., Cullen, D. y Hammel, K.E. 2010. Laccase and its role in production of extracellular reactive oxygen species during wood decay by the brown rot basidiomycete *Postia placenta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 2091-2097.

Werner, W., Rey, H.G. y Wielinger, H. 1970. Über die eigenschaften eines neuen chromogens für die blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-methode. *Fresen. J. Anal. Chem.* **252**: 224-228.

Wesenberg, D., Kyriakides, I. y Agathos, S.N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* **22**: 161-187.

Widsten, P. y Kandelbauer, A. 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme Microb. Technol.* **42**: 293-307.

Wiethaus, J., Wildner, G.F. y Masepohl, B. 2006. The multicopper oxidase CutO confers copper tolerance to *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **256**: 67-74.

Williamson, P.R. 1997. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front. Biosci.* **2**: E99-107.

Wong, Y.X. y Yu, J. 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* **33**: 3512-3520.

Worrall, J.J., Chet, I. y Hüttermann, A. 1986. Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* spp. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2527-2533.

Wright, F. y Bibb, M.J. 1992. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**: 55-65.

X

Xiao, Y.Z., Hong, Y.Z., Li, J.F., Hang, J., Tong, P.G., Fang, W. y Zhou, C.Z. 2006. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 493-501.

Xu, F. 1996b. Catalysis of novel enzymatic iodide oxidation by fungal laccase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **59**: 221-230.

Xu, F. 2005. Applications of oxidoreductases: recent progress. *Industrial Biotechnology* **1**: 38-50.

Xu, F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biol. Chem.* **272**: 924-928.

Xu, F. 1996a. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* **35**: 7608-7614.

Xu, F., Berka, R.M., Wahleithner, J.A., Nelson, B.A., Shuster, J.R., Brown, S.H., Palmer, A.E. y Solomon, E.I. 1998. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on

redox potential, activity and pH profile. *Biochem. J.* **334**: 63-70.

Xu, F., Palmer, A.E., Yaver, D.S., Berka, R.M., Gambetta, G.A., Brown, S.H. y Solomon, E.I. 1999. Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase - Axial perturbations of the T1 copper. *J. Biol. Chem.* **274**: 12372-12375.

Y

Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. y Varfolomeyev, S.D. 1994. Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **49**: 257-280.

Yatsu, J. y Asano, T. 2009. Cuticle laccase of the silkworm, *Bombyx mori*: purification, gene identification and presence of its inactive precursor in the cuticle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**: 254-262.

Yin, X.H., Gagnat, J., Gerbaud, C., Guerineau, M. y Virolle, M.J. 1997. Cloning and characterization of a new alpha-amylase gene from *Streptomyces lividans* TK24. *Gene* **197**: 37-45.

Yoon, Y.J., Kim, E.S., Hwang, Y.S. y Choi, C.Y. 2004. Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 626-634.

Yoshida, H. 1883. Chemistry of lacquer (urishi) part 1. *J. Chem. Soc. (Tokyo)* **43**: 472-486.

Z

Zhang, J.B., Liu, X.P., Xu, Z.Q., Chen, H. y Yang, Y.X. 2008. Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **61**: 351-356.

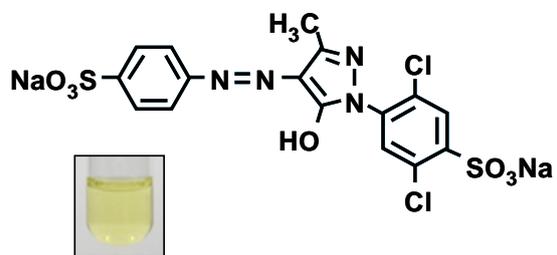
Zhang, X., Eigendorf, G., Stebbing, D.W., Mansfield, S.D. y Saddler, J.N. 2002. Degradation of trilinolein by laccase enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **405**: 44-54.

Zhu, X.D., Gibbons, J., García-Rivera, J., Casadevall, A. y Williamson, P.R. 2001. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect. Immun.* **69**: 5589-5596.

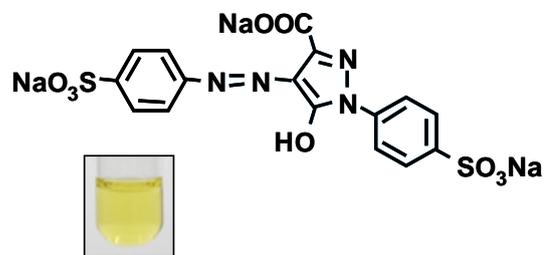
Anexo I

ANEXO I: Estructuras químicas de los colorantes de tipo azo

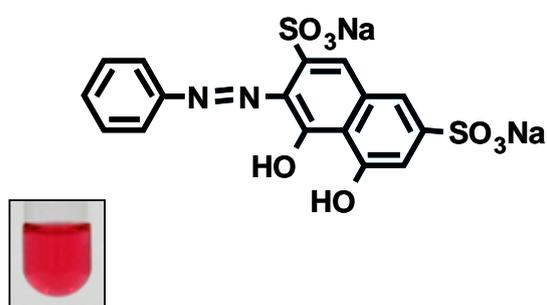
Acid Yellow 17



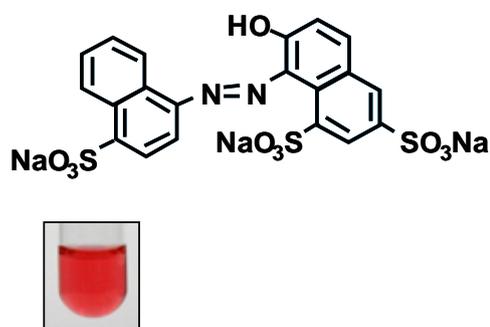
Tartrazine



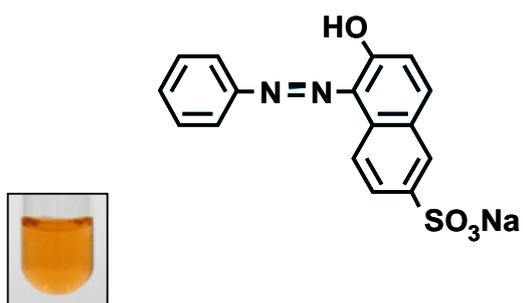
Chromotrope 2R



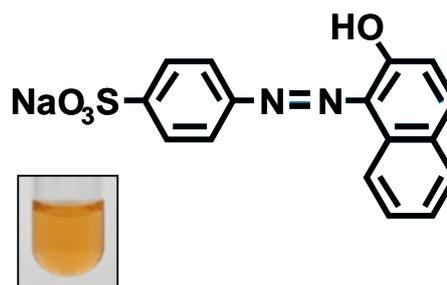
New Coccine



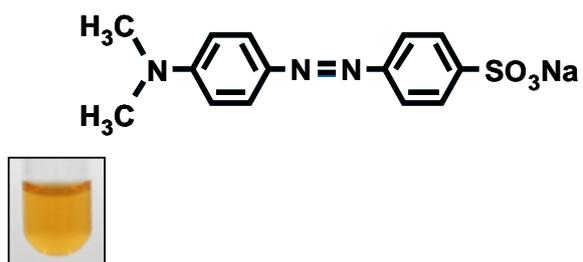
Crocein Orange G



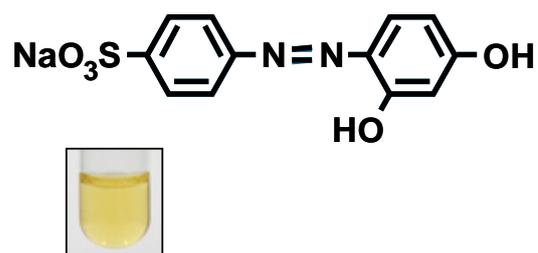
Orange II



Methyl Orange



Tropaeolin O



Anexo II

“No hay nadie menos afortunado que el hombre a quien la adversidad olvida, pues no tiene oportunidad de ponerse a prueba.”

Séneca

