



Universidad de Alcalá

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN Y FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA
LACASA PRODUCIDA POR *Streptomyces ipomoea* CECT 3341.
APROVECHAMIENTO DE SU POTENCIAL OXIDATIVO
PARA LA DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES
AMBIENTALES**

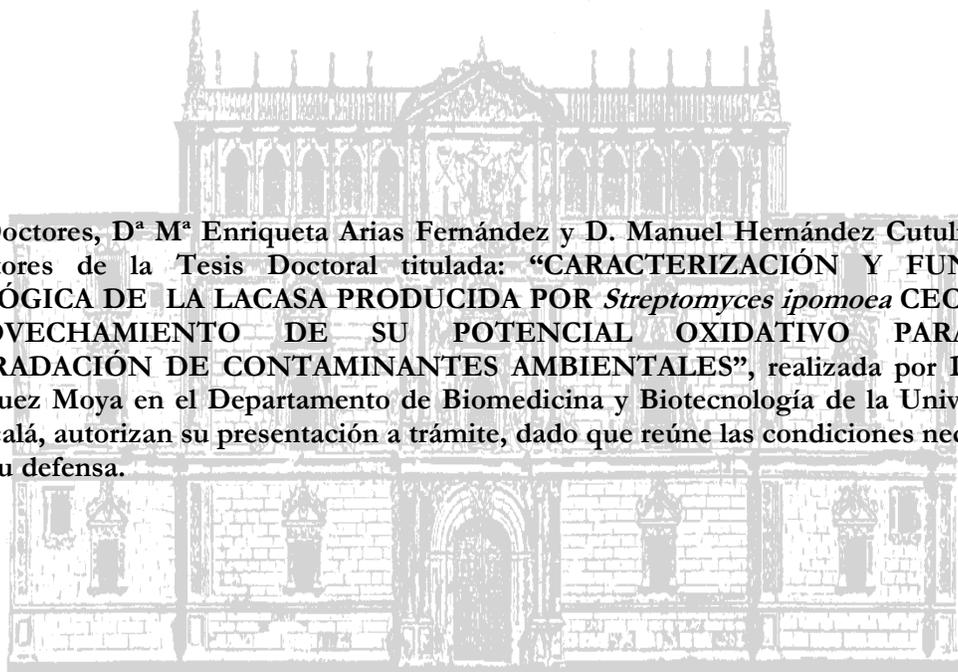
TESIS DOCTORAL

Alba Blánquez Moya

2015

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN**

(Art. 11º 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 Y FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA LACASA PRODUCIDA POR *Streptomyces ipomoea* CECT 3341. APROVECHAMIENTO DE SU POTENCIAL OXIDATIVO PARA LA DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES AMBIENTALES”, realizada por D^a Alba Blánquez Moya en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología 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 9 de Marzo de 2015.

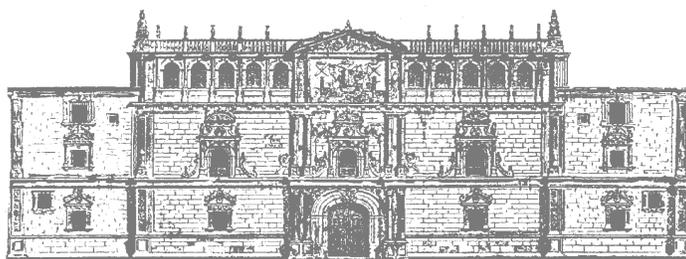


Fdo.: Dra. M^a Enriqueta Arias Fernández



Fdo.: Dr. Manuel Hernández Cutuli

Universidad de Alcalá



Departamento de Biomedicina y Biotecnología

D. Juan Soliveri de Carranza, Catedrático de Microbiología y Director del Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que **D^a. Alba Moya Blánquez**, Licenciada en Biología por la Universidad Alcalá, ha realizado en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología (unidad docente de Microbiología) 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 Y FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA LACASA PRODUCIDA POR *Streptomyces ipomoea* CECT 3341. APROVECHAMIENTO DE SU POTENCIAL OXIDATIVO PARA LA DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES AMBIENTALES”**, que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Alcalá de Henares, a 9 de marzo de 2015.



Fdo.: Dr. Juan Soliveri de Carranza

“El investigador sufre las decepciones, los largos meses pasados en una dirección equivocada, los fracasos. Pero los fracasos son también útiles porque, bien analizados, pueden conducir al éxito.”

Alexander Fleming

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador por el Ministerio de Ciencia e Innovación y de una Ayuda de Movilidad por la Universidad de Alcalá. Asimismo, el proyecto de investigación dentro del cual se ha desarrollado esta tesis ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CTQ2009-10447).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría expresar mi agradecimiento a la Dra. M^a Enriqueta Arias Fernández por toda su dedicación y trabajo para que esta tesis saliese adelante. Por sus sugerencias y consejos para mi formación como investigadora, ayudándome a desarrollar un espíritu crítico. Gracias por la oportunidad de poder formar parte del grupo de investigación.

Al Dr. Manuel Hernández Cutuli, codirector de esta tesis, por su apoyo incansable durante todo el proceso. Por su ayuda en el diseño experimental e interpretación de los resultados, alentándome a ser rigurosa y a aprender de los ensayos fallidos.

A la Dra. Juana Rodríguez Bullido, con quien tuve la oportunidad de iniciarme en el laboratorio. Gracias por abrirme las puertas al mundo de la ciencia. A la Dra. María Isabel Pérez Leblic, por su energía y entusiasmo, manteniéndonos a raya en el laboratorio, procurando que todo estuviera en orden. Al Dr. Francisco Guillén Carretero, por toda su ayuda sobre “redox cycling”, así como en diferentes dudas surgidas a lo largo de todo el proceso, ayudándome a interpretar resultados. Al Dr. Javier Mérida Ramos, por su interés mostrado durante mi aprendizaje así como su importante ayuda en la interpretación de la parte termodinámica.

Al Dr. Juan Soliveri de Carranza y al Dr. José Luis Copa Patiño, por su alegría y buen humor. Por su disposición a ayudarme siempre que lo he necesitado y hacer del laboratorio un sitio aún más alegre.

A mis anteriores compañeras de laboratorio Raquel, Adriana y Ana. A ellas les debo la mayor parte los conocimientos que he adquirido durante estos años. A Adriana la maestra en DGGE's, siempre dispuesta a enseñarme con una gran sonrisa. A Raquel, quien me introdujo en la biología molecular, maravillándome con su templanza y calma a la hora de trabajar, demostrándome que lo difícil se puede hacer sencillo. Gracias por toda la confianza que depositaste en mí desde el principio, permitiéndome hacer de tu trabajo mi aprendizaje. A Ana, con quien he podido compartir más momentos no sólo a nivel profesional sino también a nivel personal. He podido conocer a una magnífica persona e investigadora que me ha enseñado a no decaer. Tu apoyo y consejos han sido muy importantes para mí.

A mi co-doctorando Alberto, mi compañero, amigo y mucho más importante, mi memoria. Gran parte de esta tesis ha podido salir adelante gracias a su ayuda al recordarme mis experimentos, asegurándose de que no me caducaran en la estufa. Gracias por todos los momentos y risas que hemos compartido. También quiero expresar mi agradecimiento a Ángel y José Manuel, quienes se prestaron a ayudarme siempre que lo necesité. A Ann-Karolin, quien no sólo me ha demostrado su compañerismo durante todo este tiempo sino también su amistad, dispuesta a escucharme y a aconsejarme. Asimismo, quiero agradecer a todos los demás compañeros y estudiantes que han pasado por el laboratorio, aportando cada uno su granito de arena a este trabajo.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis vecinos parasitólogos, quienes me han acogido con los brazos abiertos. En especial a Irene, con quien he compartido tantas cosas. Gracias por ser mi amiga, gracias por estar siempre a mi lado, por escucharme y por dejarme formar parte de tu vida. Espero que esto no sea más que el final de una etapa que dé paso a otra en la cual seguiremos compartiendo muchos momentos. A Jorge, siempre atento y dispuesto a ayudar. Y por último, pero no menos importante, a Javier, con quien más he aprendido no sólo como estudiante sino también como persona. Gracias por tu inestimable ayuda y consejos siempre que los necesité.

Gracias a todos por considerarme una más y por todos los inolvidables momentos que pasamos juntos tanto fuera como dentro del laboratorio.

No obstante, durante los años de doctorado hay momentos duros en los que uno se estanca y no ve con claridad el camino. Es por ello que me gustaría expresar mi agradecimiento a la Dra. Ligia O. Martins del instituto ITQB de Oeiras, por renovar mi entusiasmo, por enseñarme que ser un buen investigador no reside sólo en el trabajo de laboratorio. Por abrirme los ojos y transmitirme parte de todo ese conocimiento que posee. Igualmente quiero agradecer a Sonia y Vânia, mis compañeras de laboratorio durante mi estancia en Portugal, su dedicación y ayuda para realizar mis estudios en su centro. Definitivamente repetiría sin dudar.

Parte de los ensayos y experimentos llevados a cabo en este estudio han sido realizados en otros departamentos o centros ajenos a la universidad. Entre ellos, me gustaría agradecer al Dr. Francisco Mendicuti y a Thais del departamento de Química Física, al permitirme disponer de su fluorímetro además de haberme aconsejado y animado a completar mis estudios mediante la realización de nuevas técnicas. Al Dr. Pedro Letón del departamento de Química analítica, por sus consejos sobre los análisis toxicológicos y su amabilidad al dejarme utilizar su laboratorio. Al Dr. Alfredo de Bustos del departamento de Biomedicina y Biotecnología, sin su ayuda no habría sido posible la obtención del mutante utilizado en este estudio. Y a la Dra. María Jesús Martínez del CIB por permitirme completar mis experimentos de fluorescencia en su centro.

Sin embargo, durante la tesis doctoral no sólo el doctorando es quien sufre las incertidumbres y preocupaciones. Hay muchas personas a su lado que lo acompañan. Por ello, quisiera terminar estos agradecimientos expresando mi gratitud a todos los que han realizado este camino conmigo.

En primer lugar a mis padres y mi tío, preocupándose siempre por mí y por mi trabajo. Por su paciencia al escuchar mis incomprensibles disertaciones sobre mis experimentos y por sus palabras de apoyo y ánimo siempre que las he necesitado. A mis hermanos, en especial a Jana, haciéndome sentir que no estaba sola en esto y contribuyendo a mi trabajo en sus fines de semana, cediéndome su tiempo libre desinteresadamente.

A Jose, que a pesar de haberse incorporado más tarde en este viaje que emprendí, desde el principio se metió de pleno, animándome a continuar y nunca darme por vencida. Sin tí, esta etapa habría sido mucho más dura, pero con tu apoyo pude llegar a concluirla.

A mis amigos, especialmente bio-Laura e Isa (mi suministradora de papers), dos grandes amigas y compañeras de fatigas que me han acompañado durante todo el proceso.

A mi familia

A Jose

RESUMEN

Las lacasas son enzimas con actividad fenoloxidasas, pertenecientes al grupo de las oxidorreductasas multicobre caracterizadas por poseer átomos de cobre en su centro activo. Catalizan la oxidación monoeléctrica de una gran variedad de sustancias fenólicas y aminas aromáticas con el oxígeno molecular como aceptor final de electrones. Son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido descritas en hongos, plantas, insectos, bacterias e incluso en arqueas. El interés actual de estas enzimas se debe a su gran potencial para ser utilizadas con fines biotecnológicos y/o medioambientales.

En este trabajo se ha llevado a cabo en primer lugar, la producción, purificación y caracterización físico-química y cinética de la lacasa recombinante SilA de la cepa *Streptomyces ipomoea* CECT 3341. Asimismo, se ha analizado la capacidad oxidativa de la enzima en distintos sistemas lacasa-mediador y del microorganismo mediante la inducción de radicales hidroxilo a través de ciclos redox de quinonas. Por último, se ha abordado el estudio de la función biológica de SilA en el microorganismo productor.

La estimación del potencial redox de la enzima puso de manifiesto que se trata de una lacasa de potencial redox bajo, al igual que se ha descrito para otras lacasas bacterianas. SilA mostró una moderada estabilidad frente a los agentes caotrópicos ensayados (temperatura y cloruro de guanidinio), demostrándose que el estado nativo de la enzima es más estable que el desnaturalizado. El ensayo de la termoestabilidad cinética permitió determinar la vida media de la enzima que se estimó en 1,3 horas a 95 °C.

Por otro lado, los ensayos conducentes a la elucidación de la estructura tridimensional de SilA no resultaron concluyentes por la imposibilidad de cristalizar la proteína debido, probablemente, a la presencia de dominios hidrofóbicos en el exterior de su estructura, lo que causó interferencias con el procedimiento analítico utilizado. No obstante, mediante comparación de la secuencia de SilA con las secuencias de otras lacasas bacterianas publicadas en las bases de datos, se pudo obtener un modelo teórico tridimensional de la estructura de la lacasa, que permitió elucidar la presencia de dos dominios de tipo cupredoxina, al igual que se ha descrito para otras lacasas de estreptomicetos.

La capacidad oxidativa de SilA se puso de manifiesto en actuación conjunta con distintos mediadores frente a tintes textiles de tipo azo y distintos fármacos (fluoroquinolonas y Carbamazepina), obteniéndose los mejores resultados cuando se utilizaron como mediadores la acetosiringona y/o el siringato de metilo, siendo la concentración de mediador y la temperatura factores condicionantes para la eficacia del sistema. Asimismo, se ha demostrado que el micelio de *S. ipomoea* es capaz de generar radicales hidroxilo gracias a la presencia de la lacasa SilA y de actividad quinona reductasa, los cuales a su vez han resultado muy efectivos en la degradación de los tintes textiles y de los fármacos mencionados. Es importante destacar que el micelio de *S. ipomoea* permaneció viable tras 24 horas de inducción de radicales hidroxilo, lo que avala la idoneidad de este microorganismo para ser utilizado en procesos de biorremediación.

El análisis de la toxicidad de los contaminantes de partida y de los productos de degradación obtenidos por ambos sistemas oxidativos mediados por la actividad lacasa SilA puso de manifiesto que, en algún caso, la toxicidad de los productos de degradación obtenidos era superior a la de los contaminantes de partida, deduciéndose la necesidad de llevar a cabo dichos estudios utilizando distintos sistemas de análisis, para poder validar los resultados.

Por último, con objeto de elucidar la posible función biológica de la lacasa SilA, se llevó a cabo la obtención de un mutante de *S. ipomoea* no productor de actividad lacasa, mediante disrupción génica. La obtención de dicho mutante permitió conocer la implicación de dicha enzima en la tolerancia al cobre y en la solubilización de la lignina de paja de trigo, funciones que corroboran el interés biotecnológico de la misma.

SUMMARY

Laccases are enzymes with phenoloxidase activity, included into the multicopper oxidases group, characterized by the presence of four copper ions in their active site. They catalyze the monoelectronic oxidation of a wide range of phenolic compounds and aromatic amines with the oxygen as the final electron acceptor. They are enzymes widely distributed in nature and have been described in fungi, plants, insects, bacteria and even in archaea. The current interest on these enzymes is due to their great potential to be used for biotechnological and environmental purposes.

In this work, production, purification and physicochemical and kinetic characterization of the recombinant laccase SilA from the strain *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 was carried out. Additionally, the studies of the oxidative potential of the enzyme, either setting-up the laccase-mediator system and of the microorganism, through the induction of hydroxyl radicals via quinone redox cycling, have been performed. Finally, the last study dealt with the biological function of SilA in the microorganism.

The estimation of the redox potential of SilA showed that this enzyme is a low redox potential laccase, just as other bacterial laccases already described. SilA showed a moderate stability against caotropic agents (temperature and guanidinium chloride), demonstrating that the native state is more stable than the unfolded state. The kinetic thermostability assay allowed to determine the half life of the enzyme which was estimated in 1.3 hours at 95 °C.

The assays addressed to the elucidation of the tridimensional structure of SilA were not conclusive due to the impossibility to crystallize the protein due, probably, to the presence of hydrophobic domains at the surface of the structure which interfere with the analytical method. However, comparing the sequence of SilA with the sequences from other bacterial laccases published in databases, we established a theoretical three-dimensional model of the structure of SilA which allow to elucidate the presence of two cupredoxine domains as occur in other laccases from *Streptomyces*.

The oxidative potential of SilA was demonstrated together with diverse mediators against textile azo-dyes and different drugs (fluoroquinolones and Carbamazepine). The best results were obtained with acetosyringone and/or methyl syringate as mediators, being the concentration of the mediator and the temperature key factors for the efficiency of the system. Besides, the mycelium of *S. ipomoea* was able to produce hydroxyl radicals due to the presence of the SilA laccase and quinone reductase activity. These radicals were very effective in degrading the textile dyes and the drugs above mentioned. It is remarkable that the mycelium of *S. ipomoea* remained viable after 24 h of hydroxyl radicals induction, supporting the suitability of this microorganism to be applied in bioremediation processes.

The toxicity analysis of the original compounds as well as of the degradation products obtained from both oxidative systems assayed showed that, in some cases, the toxicity of the degradation products were higher than that of the original pollutants, inferring the need to perform these studies using different analytical systems in order to validate the results obtained.

Finally, with the aim to elucidate the possible biological function of the laccase SilA, the obtention of a non-laccase producer mutant of *S. ipomoea* by gene disruption was carried out. This mutant let to know the involvement of this enzyme in copper resistance and in lignin solubilisation from wheat straw, functions which corroborate the biotechnological interest of the enzyme.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A: adenina
ABTS: 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato)
 ΔG : Energía libre de Gibbs
 ΔG_{water} : Energía libre de Gibbs del disolvente
 ΔH : Entalpía
APPL: Lignina ácido-soluble
AS: acetosiringona
 ΔS : Entropía
ATP: adenosin trifosfato
BQ: benzoquinona
BTEX: benceno, etilbenceno, xileno.
C: citosina
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
CIAP: enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera
DBQ: 2,6-dimetoxibenzoquinona
DMSO: dimetilsulfóxido
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato
DO: densidad óptica
E0: potencial de reducción
EC50: concentración de una sustancia en un medio que se espera produzca un cierto efecto en el 50% de los organismos testeados de una población bajo ciertas condiciones
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
EPR: *electron paramagnetic resonance* (resonancia paramagnética electrónica)
ermE*p: promotor de eritromicina
fUnf: fracción desnaturalizada de la enzima
G: guanina
GAÉ: glucosa-asparagina-extracto de levadura
GDP: guanosina difosfato
Gnd-HCl: cloruro de guanidinio
HBT: 1-hidroxibenzotriazol
HEPES: (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico)
 $\text{HO}_2 \cdot$: radical hidropéroxilo
HPLC: *high performance liquid chromatography*
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
K: grados Kelvin
LB: caldo de lisogénesis
LBG: locus bean gum
LMS: sistema lacasa-mediador
MA: medio A
MBQ: metoxibenzoquinona
MBS: medio basal salino
MCO: oxidasa multicobre
Mes: (ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico)
MeS: Siringato de metilo
MOPS: ácido 4-morfolinepropanesulfónico
NHE: electrodo normal de hidrógeno
 $\text{O}_2 \cdot^-$: radical superóxido
 $\cdot\text{OH}$: radical hidroxilo
p/v: peso/volumen

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
PAHs: hidrocarburos policíclicos aromáticos
PBS: Tampón fosfato salino
PCB: bifenilos policlorados
PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG: Polietilenglicol
pKa: Constante de afinidad
POA: procesos de oxidación avanzada
PMOA: proceso microbiano de oxidación avanzada
PS: persulfato
psig: *pounds per square inch gauge* (libras determinadas por pulgada cuadrada)
PVA: Alcohol polivinílico
Q: quinona
Q·-: semiquinona
QH₂: hidroquinona
QR: quinona reductasa
R: constante de los gases ideales (R= 8.3144 J/(K mol))
RLO: radicales libres de oxígeno
RO·: radical alcóxido
RO₂·: radical peróxido
ROS: Especies reactivas del oxígeno (*Reactive oxygen species*)
rpm: revoluciones por minuto
SA: siringaldehído
SDS: dodecil sulfato sódico
SOC: caldo súper óptimo con represión catabólica
SM: medio soja-manitol
SSF: fermentación en estado sólido
T: timina
TAE: Tampón Tris-acetato-EDTA
TBARS: sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico
TBE: Tampón tris-borato-EDTA
TE: Tampón Tris-EDTA
TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TEMPO: 2,2',6,6'-tetrametil-piperidina-N-óxido
T_m: Temperatura de desdoblamiento
Tris: tris(hidroximetil)aminometano
U: unidades de actividad enzimática
ufc: unidades formadoras de colonias
UTP: uracilo trifosfato
UV/Vis: ultravioleta/visible
VLA: ácido violúrico
v/v: volumen/volumen
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El género <i>Streptomyces</i>. Características generales y ciclo de desarrollo	3
1.1.1. Características generales	3
1.1.2. Ciclo de desarrollo	3
1.1.3. Metabolismo secundario de <i>Streptomyces</i>	5
1.2. Enzimas oxidativas: las lacasas	6
1.2.1. Estructura y evolución de las lacasas	7
1.2.1.1. Mecanismo catalítico de las lacasas	9
1.2.2. Reactividad de las lacasas	11
1.2.3. Caracterización molecular de las lacasas	13
1.2.4. Distribución y función biológica de las lacasas	13
1.2.4.1. Lacasas de plantas	14
1.2.4.2. Lacasas de insectos	14
1.2.4.3. Lacasas de hongos	15
1.2.4.4. Lacasas de arqueas	16
1.2.4.5. Lacasas bacterianas	16
1.3. Potencial oxidativo de las lacasas: los sistemas lacasa-mediador y producción de radicales hidroxilo	17
1.3.1. Los sistemas lacasa-mediador	20
1.3.2. Especies reducidas de oxígeno y ciclos redox de quinonas	21
1.4. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas	24
1.4.1. Industria papelera	24
1.4.2. Industria textil	25
1.4.3. Biorremediación	27
1.4.4. Industria alimentaria	28
1.4.5. Síntesis química	28
1.4.6. Nanotecnología	29
2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Materiales y métodos	
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 para <i>Streptomyces</i>	37
3.1.3.2. Medios para <i>E. coli</i>	38
3.1.3.3. Medios para <i>E. coli</i> y <i>S. ipomoea</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 utilizados para la electroforesis de proteínas	39
3.1.4.3. Tampones utilizados para la electroforesis de ADN	39

3.1.4.4. Tampones utilizados para la preparación de células competentes	40
3.1.4.5. Tampones utilizados para la purificación de la lacasa recombinante	40
3.1.5. Determinaciones analíticas	40
3.1.5.1. pH	40
3.1.5.2. Cuantificación de proteínas	40
3.1.5.3. Valoración de la actividad lacasa	40
3.1.5.3.1. En medio líquido	40
3.1.5.3.2. Asociada a micelio	40
3.1.5.4. Valoración de la actividad quinona reductasa asociada a micelio	40
3.1.5.5. Valoración de la producción de radicales hidroxilo	41
3.2. Producción y purificación de la lacasa recombinante de <i>Streptomyces ipomoea</i> CECT 3341	41
3.2.1. Producción de la enzima recombinante	41
3.2.2. Obtención de la forma activa de la enzima recombinante	41
3.2.3. Purificación de la enzima recombinante por cromatografía de afinidad	42
3.2.4. Concentración y diálisis de las fracciones cromatográficas	42
3.3. Técnicas electroforéticas aplicadas a las proteínas	42
3.3.1. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	42
3.3.2. Revelado de los geles de poliacrilamida	43
3.3.2.1. Tinción de proteínas	43
3.3.2.2. Zimogramas	43
3.3.2.2.1. Ensayo de actividad lacasa	43
3.3.2.2.2. Ensayo de actividad mananasa	43
3.4. Caracterización de la lacasa recombinante SiLA	43
3.4.1. Determinación del potencial redox	43
3.4.2. Termoestabilidad cinética	44
3.4.3. Estabilidad térmica y química	44
3.5. Cristalización de SiLA	45
3.6. Optimización del sistema lacasa-mediador	45
3.6.1. Evaluación de posibles mediadores	45
3.6.1.1. Análisis de los productos de oxidación por cromatografía líquida de alta eficacia asociada a detector de diodos (HPLC-DAD)	46
3.6.2. Selección de la concentración óptima de mediador y de la temperatura de ensayo	46
3.7. Establecimiento de ciclos redox de quinonas	46
3.7.1. Determinación de las actividades quinona reductasa y lacasa asociadas al micelio de <i>S. ipomoea</i> y producción de radicales hidroxilo	46
3.7.2. Efecto de los radicales hidroxilo sobre el microorganismo	47
3.8. Evaluación del potencial degradativo del sistema lacasa-mediador	47
3.8.1. Decoloración de tintes textiles	47
3.8.2. Degradación de fármacos	47

3.8.3. Análisis de los controles y de los productos de oxidación por cromatografía líquida de alta eficacia asociada a detector de diodos (HPLC-DAD)	48
3.9. Evaluación del potencial degradativo de los radicales ·OH	48
3.9.1. Optimización de la producción de radicales hidroxilo mediante ciclos redox de quinonas	48
3.9.2. Ensayos de degradación de tintes textiles y fármacos	49
3.10. Análisis de toxicidad	49
3.11. Técnicas de Biología Molecular aplicadas	50
3.11.1. Plásmidos y oligonucleótidos	50
3.11.2. Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	50
3.11.3. Manipulación de las muestras de ADN	50
3.11.3.1. Extracción de ADN cromosómico de <i>Streptomyces</i>	50
3.11.3.2. Amplificaciones de ADN mediante PCR	51
3.11.3.3. Electroforesis de los fragmentos de ADN	51
3.11.3.4. Digestión enzimática de las muestras de ADN	52
3.11.3.5. Ligación de los fragmentos de ADN	52
3.11.3.6. Desfosforilación de extremos 5' de ADN	52
3.11.4. Transformación de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico	52
3.11.4.1. Transformación por choque térmico	52
3.11.4.2. Transformación por electroporación	52
3.11.5. Conjugación intergenérica	52
3.12. Estrategias para el estudio de la función de la lacasa SilA.	53
3.12.1. Obtención de un mutante no productor de lacasa de <i>S. ipomoea</i>	53
3.12.1.1. Ensayo para la comprobación del mutante <i>S. ipomoea</i> (SilA ⁻)	54
3.12.1.1.1. Ensayo a nivel molecular	54
3.12.1.1.2. Ensayo a nivel bioquímico	54
3.12.2. Implicación en procesos de morfogénesis, esporulación y pigmentación de las esporas	54
3.12.2.1. Microscopía óptica	54
3.12.2.2. Microscopía electrónica de barrido	54
3.12.3. Implicación en procesos de resistencia al cobre	55
3.12.3.1. Cultivos no inducidos	55
3.12.3.2. Cultivos inducidos	55
3.12.4. Implicación en la degradación del polímero de lignina	56
3.12.4.1. Sustrato y condiciones de fermentación en estado sólido	56
3.12.4.2. Obtención de lignina mediante extracción alcalina de la paja de trigo	56
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1. Producción y purificación de la lacasa recombinante SilA	59
4.2. Determinación del potencial redox y de la estabilidad térmica, química y termocinética de SilA	59
4.2.1. Potencial redox	59
4.2.2. Estabilidad termodinámica y química	61

4.2.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad lacasa a largo plazo (estabilidad termocinética)	62
4.3. Ensayos conducentes a la cristalización de SilA	63
4.4. Optimización del sistema lacasa-mediador	65
4.4.1. Evaluación de distintos compuestos naturales como mediadores	65
4.4.2. Efecto de la concentración del mediador y de la temperatura de reacción sobre la capacidad oxidativa del sistema lacasa-mediador	67
4.5. Establecimiento de ciclos redox de quinonas en <i>Streptomyces ipomoea</i>	68
4.5.1. Viabilidad de <i>Streptomyces ipomoea</i> a los radicales hidroxilo	69
4.6. Evaluación del potencial degradativo del sistema SilA-mediador y de los radicales $\cdot\text{OH}$ sobre distintos contaminantes de diferente naturaleza	70
4.6.1. Decoloración y/o degradación de tintes textiles	70
4.6.1.1. Ensayos <i>in vitro</i> con el lacasa-mediador	70
4.6.1.2. Ensayos <i>in vivo</i> con los radicales $\cdot\text{OH}$	73
4.6.2. Degradación de fármacos	73
4.6.2.1. Ensayos <i>in vitro</i> con el lacasa-mediador	74
4.6.2.2. Ensayos <i>in vivo</i> con los radicales $\cdot\text{OH}$	78
4.7. Análisis de la toxicidad de los contaminantes antes y después del tratamiento oxidativo	79
4.7.1. Análisis de la toxicidad de los tintes textiles tras el tratamiento con el sistema lacasa-mediador	80
4.7.2. Análisis de la toxicidad de los fármacos tras el tratamiento con el sistema lacasa-mediador	81
4.7.3. Análisis de la toxicidad de los tintes textiles tras el tratamiento con radicales $\cdot\text{OH}$	82
4.7.4. Análisis de la toxicidad de los fármacos tras el tratamiento con radicales $\cdot\text{OH}$	83
4.8. Aproximaciones al estudio de la función de la lacasa en la cepa productora	84
4.8.1. Obtención de un mutante no productor de lacasa de <i>S. ipomoea</i>	84
4.8.1.1. Comprobación de la obtención del mutante no productor de lacasa	85
4.8.1.1.1. Ensayo a nivel molecular	85
4.8.1.1.2. Ensayo a nivel bioquímico	85
4.8.2. Estudio del papel de SilA en la morfogénesis y pigmentación de las esporas de <i>S. ipomoea</i>	86
4.8.2.1. Observaciones al microscopio óptico	86
4.8.2.2. Observaciones al microscopio electrónico	87
4.8.2.3. Pigmentación de las esporas	87
4.8.3. Implicación de SilA en la resistencia al cobre	88
4.8.3.1. Crecimiento en cultivos no inducidos	88
4.8.3.2. Crecimiento en cultivos inducidos	89
4.8.4. Implicación de SilA en la degradación de lignina	89

1. CONCLUSIONES	91
2. BIBLIOGRAFÍA	95
3. ANEXOS	127

Introducción

1.1 El género *Streptomyces*: Características generales y ciclo de desarrollo

1.1.1. Características generales

El género *Streptomyces* (del griego “*streptos*”=torcido y “*myces*”=hongo), pertenece a la clase Actinobacteria, orden *Actinomycetales* y está constituido por bacterias filamentosas grampositivas, fundamentalmente aerobias, aunque también se ha descrito su crecimiento en determinadas condiciones anaerobias (van Keulen *et al.*, 2003). Estos microorganismos presentan un crecimiento ramificado que da lugar a un entramado de hifas denominado micelio (Goodfellow y Williams, 1983). El género *Streptomyces*, del cual se han identificado más de 600 especies, se caracteriza por un alto 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).

Poseen un cromosoma lineal con un tamaño aproximado de 8 Mb (Kieser *et al.*, 1992) y su replicación en la especie *Streptomyces coelicolor*, cuyo genoma fue el que primero se ha secuenciado (www.sanger.ac.uk), tiene lugar de manera bidireccional a partir de un único origen de replicación (*oriC*), finalizando con ayuda de proteínas terminales que se unen a los extremos 5' del cromosoma (Lin *et al.*, 1993). En los extremos del cromosoma, presenta secuencias cortas repetidas e invertidas (TIRs), capaces de formar estructuras secundarias. Dentro del genoma de varios estreptomicetos se halla una región central o “core” altamente conservada en la que se encuentran la mayoría de los genes esenciales implicados en el desarrollo del ciclo celular, así como en la replicación del ADN, transcripción, traducción y metabolismo primario. A su vez, el “core” está flanqueado por dos brazos, el izquierdo de 1,5 Mb y el derecho de 2,3 Mb, que codifican genes no esenciales del metabolismo secundario y enzimas hidrolíticas (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003). Durante los últimos años se han secuenciado los genomas completos de una veintena de especies de estreptomicetos. Tal

como ya se ha comentado, el primer genoma secuenciado fue el de *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002) y poco tiempo después se completó la secuencia de *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003), agente productor de las avermectinas, un grupo de agentes antiparasitarios. Posteriormente, se han secuenciado los genomas de *S. scabies* por el instituto Sanger en 2007 y un año después el de *S. griseus* IFO 13350 (Ohnishi *et al.*, 2008). Algunas de las últimas secuencias obtenidas han sido las de *S. exfoliatus* (Martínez *et al.*, 2014) y la de *S. olindensis*, productor del antitumoral Cosmomicina D (Rojas *et al.*, 2014).

Los estreptomicetos son bacterias saprófitas que se encuentran fundamentalmente en el suelo, donde aportan el característico olor a tierra húmeda gracias a la producción de un compuesto sesquiterpenoide denominado geosmina (Gerber y Lechevalier, 1965). Sin embargo, también se han descubierto especies de estreptomicetos aisladas de lagos (Ray *et al.*, 2014), sedimentos marinos (Yan *et al.*, 2014) o en simbiosis con plantas, invertebrados marinos o insectos (Seipke *et al.*, 2012).

El ciclo de vida y la producción de metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas están estrechamente relacionados. Al ser microorganismos que habitan en suelos, la competencia con otros organismos de este mismo hábitat es constante, por lo que se hace necesaria una regulación muy controlada de la expresión de sus genes. Así, se ha visto que *Streptomyces* responde a los distintos cambios del medio a través de los sistemas de dos componentes (TCSs) encargados de la biosíntesis de diferentes metabolitos secundarios (Rodríguez *et al.*, 2013).

1.1.2. Ciclo de desarrollo

El género *Streptomyces* posee un ciclo de desarrollo complejo que implica una compleja diferenciación morfológica y fisiológica. La diferenciación morfológica de estos microorganismos (Figura 1.1) comienza con la germinación de una espora monogenómica que cuando las condiciones ambientales son favorables, da lugar a un tubo germinativo que crece y se ramifica profusamente, formando una

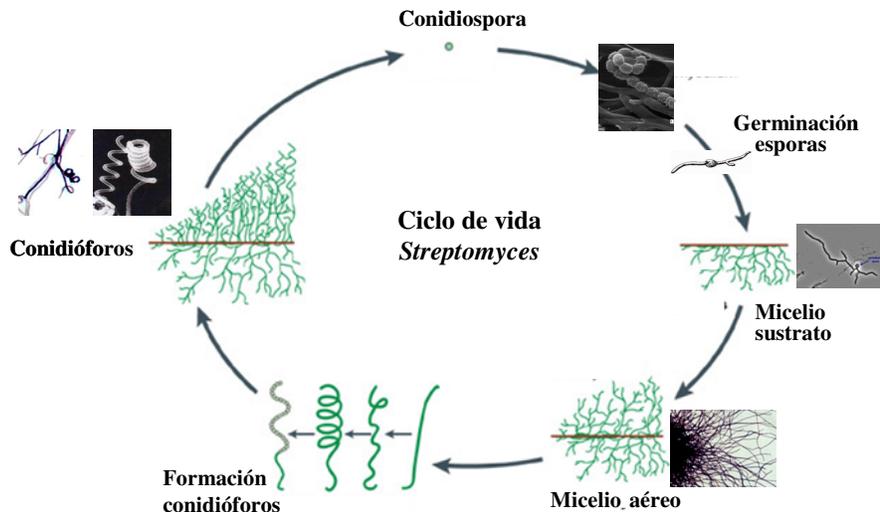


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Streptomyces*, donde se muestran las distintas etapas de diferenciación celular del microorganismo.

amplia red de hifas vegetativas multigenómicas denominada micelio sustrato (Champness, 2000). El micelio sustrato invade y coloniza el medio en que se desarrolla, secretando numerosas enzimas hidrolíticas que facilitan la descomposición de restos orgánicos principalmente vegetales, para la obtención de nutrientes (Chater *et al.*, 2010). Cuando los nutrientes del medio se agotan, el crecimiento vegetativo se detiene y comienzan a originarse hifas menos ramificadas que forman el micelio aéreo, el cual se eleva sobre el micelio sustrato para facilitar la dispersión. Este desarrollo se lleva a cabo, principalmente, a expensas de los nutrientes provenientes de la lisis del micelio sustrato (Méndez *et al.*, 1985), escapando de un ambiente húmedo o acuoso para crecer en el aire. 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 es morfológica, estructural y fisiológicamente diferente del micelio sustrato y se considera una adaptación al ambiente terrestre, por lo que otras actinobacterias típicamente acuáticas no presentan este comportamiento (Locci y Sharples, 1983). Este proceso está regulado por el péptido SapB y las proteínas denominadas “chaplins” (Bibb *et al.*, 2012; Talbot, 2003) que

disminuyen la tensión superficial del agua. Como consecuencia, sus hifas quedan cubiertas por una capa blanquecina altamente hidrofóbica. En la formación de estas capas hidrofóbicas participan unas proteínas llamadas “rodmins” que son producidas por las hifas (van Keulen *et al.*, 2003) (Figura 1.2). A continuación, las hifas del micelio aéreo sufren un proceso de alargamiento y tabicación múltiple transformándose en largas hileras de esporas hidrofóbicas unigenómicas llamadas conidiosporas, que tras sufrir un proceso de maduración se dispersan para colonizar nuevos nichos e iniciar el ciclo biológico de nuevo. Se ha descrito que las esporas poseen compuestos para la iniciación del metabolismo activo, ya que se ha comprobado que cuando se sumergen en agua destilada se activa la proteosíntesis y la transición de la fase de dormancia al metabolismo activo (Strakova *et al.*, 2013). Estos autores sugieren que la primera fase del programa de desarrollo es independiente de las condiciones de cultivo y postulan que está predeterminado genéticamente o por las condiciones existentes durante la esporulación. Sin embargo, a partir de estudios realizados mediante tinción de viabilidad con marcadores bioquímicos de crecimiento, diferenciación y muerte celular junto con técnicas de microscopía confocal (Manteca *et al.*, 2005) se ha descrito un nuevo modelo de ciclo de desarrollo de *Streptomyces* más detallado.

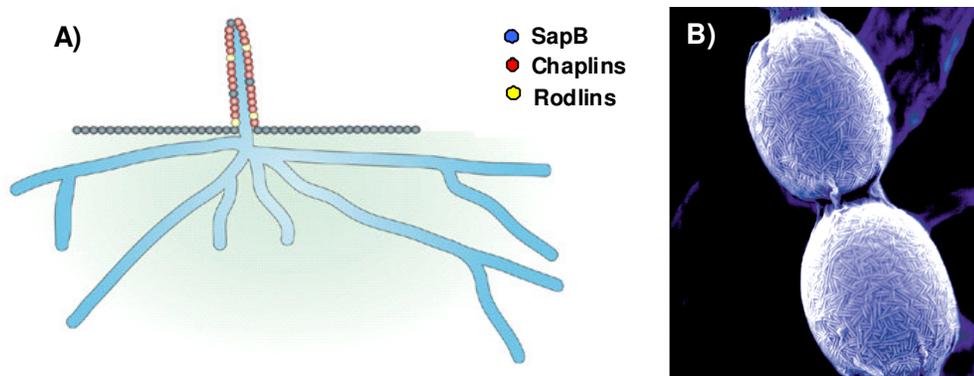


Figura 1.2. A) Disposición de las proteínas surfactantes “sapB”, “chaplins” y “rodmins” alrededor de las hifas del micelio aéreo. B) Fotografía al microscopio electrónico de barrido con falso color de la ultraestructura de la superficie de las esporas de *S. coelicolor* resultado de la interacción de las proteínas “chaplins” y “rodmins” (Tomado de la Sociedad Americana de Microbiología®).

Este modelo describe y diferencia dos tipos de micelio sustrato, un micelio primario, que se desarrolla tras la germinación de la espora dando hifas formadas por segmentos vivos y muertos debido a un proceso temprano de muerte celular programada, y un micelio secundario, formado a partir de los segmentos viables del micelio primario (Manteca *et al.*, 2007; Chater *et al.*, 2010). Este micelio secundario que podría ser considerado como el micelio sustrato de los anteriores ciclos biológicos descritos, comenzaría a sintetizar la cubierta proteica hidrofóbica, desarrollándose así el micelio aéreo que culminaría con la esporulación. En resumen, el nuevo modelo descrito diferencia entre dos fases, una vegetativa, correspondiente al micelio primario, y otra reproductora, constituida por el micelio secundario temprano (micelio sustrato) y tardío (micelio aéreo).

1.1.3. Metabolismo secundario de *Streptomyces*

La capacidad del género *Streptomyces* para colonizar diferentes hábitats está basada en su versatilidad metabólica, que les permite utilizar una gran diversidad de fuentes de carbono y nitrógeno para su crecimiento. Aunque su pH de crecimiento óptimo se encuentra entre 6,5 y 8, han sido aislados miembros del género capaces de crecer tanto en medios ácidos (Williams y Flowers, 1978; De Risi *et al.*, 1997) como en medios con pH 9 o superiores (Chaphalkar y Dey, 1998). Ya hemos comentado anteriormente que su presencia en el suelo se ve favorecida por su crecimiento

micelial y su capacidad para formar conidiosporas, las cuales constituyen un sistema de dispersión y una forma de resistencia que favorece la supervivencia durante largos periodos de escasez de agua y nutrientes (Ensign, 1978).

Es conocido el papel que juegan los estreptomicetos en los ciclos biogeoquímicos de degradación, merced a la producción de un gran arsenal de enzimas extracelulares que le permiten degradar polímeros insolubles de material orgánico presentes en el suelo (Mccarthy y Williams, 1992), lo cual hace que sean considerados candidatos muy idóneos para propósitos de biorremediación. Por otro lado, su gran capacidad productora de metabolitos secundarios supone la culminación de su complejo ciclo de desarrollo y ha conducido a considerar al género *Streptomyces* uno de los microorganismos de mayor interés biotecnológico. De hecho, es la principal fuente natural de metabolitos secundarios bioactivos entre los que cabe señalar: antibióticos, agentes antitumorales, inmunosupresores, antivíricos, antifúngicos, insecticidas, sideróforos, antiparasitarios, inhibidores de enzimas, pigmentos, inmunomoduladores, estimuladores del crecimiento de plantas, herbicidas y muchos otros (Kieser *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2003; Hopwood, 2007). Entre esta gran diversidad de biomoléculas podríamos destacar algunas con capacidad antifúngica como la Anfotericina B producida por *S. nodosus* (Fjaervik y Zotchev, 2005), antihelmínticos como las avermectinas producidas por *S. avermitilis* (Yoon *et al.*, 2004),

antitumorales como las bleomicinas o la Holomicina (Grimm *et al.*, 1994; Webster *et al.*, 2000), inmunosupresores como el Tacrolimus (Wallemacq y Reding, 1993) y herbicidas como la Fosfofinotricina (Schwartz *et al.*, 2005). Sin embargo, la propiedad más importante de *Streptomyces* es su capacidad para producir antibióticos, estimándose que más de las dos terceras partes de los antibióticos de origen natural utilizados en clínica son producidos por actinobacterias y de ellos, casi el 80 % se deben exclusivamente a *Streptomyces* (Grimm *et al.*, 1994; Challis y Hopwood, 2003; Berdy, 2005). Se estima que hasta el momento sólo se ha descubierto un pequeña parte del potencial de estas bacterias, estimándose que el género *Streptomyces* es capaz de producir más de 100.000 compuestos con actividad antimicrobiana de los cuales sólo se conoce un 3 % (Watve *et al.*, 2001). Es importante en este contexto hacer referencia al estudio recientemente realizado por Pérez *et al.*, (2011) en el que se puso de manifiesto que dos microorganismos comunes del suelo, como *Streptomyces* y *Myxococcus* pueden interactuar cuando se cultivan juntos estimulando la producción de antibióticos en el estreptomyceto, lo cual podría validar la hipótesis de que las interacciones inespecíficas podrían ser las responsables en su hábitat natural de muchas de las rutas presentes en los genomas de *Streptomyces* que permanecen silenciadas en las condiciones de laboratorio.

Por otro lado, y dado que el hábitat más importante del género *Streptomyces* es el suelo, este microorganismo produce para poder subsistir en ambientes muy diversos, una gran variedad de enzimas capaces de degradar restos vegetales, compuestos orgánicos de los considerados recalcitrantes e incluso pequeños organismos que le sirven de sustento. Entre estas enzimas cabe señalar un importante grupo de enzimas hidrolíticas, entre las que se destacan: xilanasas (López 1995; Antonopoulos *et al.*, 2001), proteasas (Rao *et al.*, 1998), mananasas (Montiel *et al.*, 2002), quitinasas (Kawase *et al.*, 2006), celulasas (Deobald y Crawford, 1987) y amilasas (Yin *et al.*, 1997), entre otras. Algunas de estas enzimas como xilanasas, celulasas, proteasas y amilasas tienen una importante aplicación en la industria

alimentaria, especialmente en el sector dedicado a la alimentación animal, así como en las industrias de panificación y de producción de pastas de celulosa y papel. No obstante, hay que tener en cuenta que los niveles de producción de enzimas por las cepas silvestres son escasos para su explotación industrial, requiriéndose por tanto, la aplicación de técnicas moleculares y la búsqueda de las condiciones del medio de cultivo más adecuadas para optimizar su producción. Cabe asimismo mencionar la importancia que está adquiriendo en los últimos años la explotación del carácter oxidativo de algunas enzimas producidas por microorganismos ligninolíticos, como es el caso de las peroxidasas y las lacasas, cuyo potencial en procesos de biorremediación es indudable. Como son precisamente las lacasas el objetivo más importante de estudio de esta Tesis doctoral, dedicaremos a este grupo de enzimas una especial atención en capítulos posteriores.

1.2. Enzimas oxidativas: las lacasas

Las lacasas (benzenodiol:dioxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2) son miembros de la familia de las enzimas oxidorreductasas multicobre (MCOs) que se caracterizan por poseer átomos de cobre en su centro activo (Reinhammar y Malmström, 1981). Son enzimas con actividad fenoloxidasas capaces de actuar sobre gran variedad de sustancias fenólicas y aminas aromáticas, utilizando el oxígeno molecular como aceptor final de electrones con la consiguiente reducción a dos moléculas de agua (Solomon *et al.*, 1996; Thurston, 1994) a través de un mecanismo de transferencia de cuatro electrones del sustrato correspondiente y sin la formación de intermediarios tóxicos. Además de la lacasa, el grupo de las oxidasas multicobre engloba a otras enzimas, como la ascorbato oxidasa, la ceruloplasmina (Messerschmidt y Huber, 1990; Messerschmidt *et al.*, 2001) la fenoxacinona sintasa, la enzima CueO, la proteína Fet3 de *Saccharomyces cerevisiae* (Askwith *et al.*, 1994), la bilirrubina oxidasa o la hefaestina (Vulpe *et al.*, 1999). Las MCOs están implicadas en diversas reacciones del metabolismo celular como la fosforilación oxidativa, el catabolismo de nutrientes y

compuestos tóxicos, la fotosíntesis o la homeostasis de iones metálicos (Kosman, 2010).

1.2.1. Estructura y evolución de las lacasas

Las lacasas son glicoproteínas diméricas o tetraméricas con 4 átomos de cobre por monómero, necesarios para la actividad catalítica de la enzima. Estos átomos de cobre se agrupan en tres sitios de óxido-reducción, denominados centros de cobre de tipo T1, T2 y T3, que se diferencian en función de sus propiedades espectroscópicas y paramagnéticas (Solomon *et al.*, 1996).

. Centro de Cobre Tipo 1 (T1)

También denominado cobre azul, presenta una intensa absorción electrónica a 600 nm lo que confiere el color azul característico a estas lacasas en estado oxidado. Este átomo de cobre es igualmente detectable por Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) y el máximo de absorción que presenta es debido a la unión covalente del átomo de cobre con el azufre de una cisteína que lo coordina. Numerosos estudios han determinado los potenciales del centro de cobre T1 de distintas lacasas mediante estudios potenciométricos. Así, se han clasificado las lacasas en tres grupos: de bajo potencial redox con valores inferiores a 470 mV, entre las que se encuentran las lacasas de plantas y bacterias, de medio potencial redox (entre 470 y 710 mV), entre las que se encuentran lacasas producidas por ascomicetos y basidiomicetos, y de alto potencial redox, la mayoría de las cuales son producidas por basidiomicetos, con valores superiores a 710 mV, frente al electrodo normal de hidrógeno (NHE) (Klonowska *et al.*, 2002; Shleev *et al.*, 2004).

. Centro de Cobre tipo 2 (T2)

Este átomo de cobre presenta una ligera absorción en la región del visible aunque también puede ser detectado por EPR. Este centro de cobre está coordinado con dos histidinas y una molécula de agua y muestra afinidad por aniones como F^- , N^- y CN^- , que actúan como inhibidores de la enzima.

. Centro de Cobre tipo 3 (T3)

Se trata de un centro binuclear formado por dos átomos de cobre acoplados anti-ferromagnéticamente. Cada átomo está coordinado por tres histidinas y un puente hidroxilo. Presenta un máximo de absorción a 330 nm. El centro de cobre T2 se encuentra estratégicamente localizado cerca del centro de cobre tipo 3, formando un centro trinuclear T2/T3 donde tiene lugar la reducción molecular del oxígeno a agua (Solomon *et al.*, 1992; Thurston, 1994; Yaropolov *et al.*, 1994). Gracias a numerosos estudios estructurales se ha podido identificar los canales de entrada de oxígeno (próximo al centro T3) y de salida del agua (cercano al centro T2) (Figura 1.3). Estudios realizados en lacasas de bajo potencial redox como *Rhus vernicifera* (Reinhammar, 1972) o *Trametes hirsuta* (Shleev *et al.*, 2005) han determinado valores de potencial redox para el centro T2 de unos 400 mV. Asimismo, para lacasas de bajo y alto potencial redox, los valores de potencial de oxidorreducción del par de cobres de sus centros T3 se estimaron en 480 y 780 mV, respectivamente (Reinhammar, 1972).

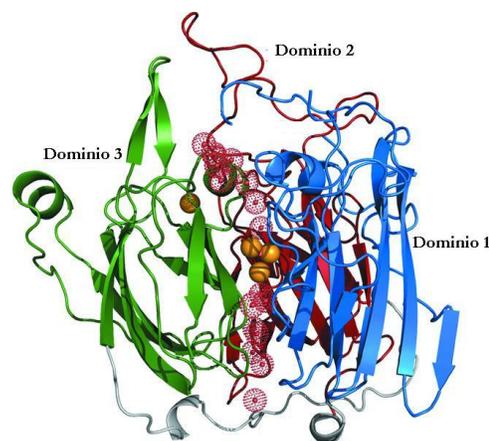


Figura 1.3. Estructura tridimensional de la lacasa CotA de *Bacillus subtilis*, en la que los centros del cobre se representan como esferas amarillas. El recorrido del oxígeno desde la parte superior hasta su reducción a agua y salida por la parte inferior de la molécula se muestra como esferas rojas (tomado de Bento *et al.*, 2005).

Se han descrito otras lacasas atípicas carentes del cobre 1 (Cu1) y denominadas lacasas amarillas o lacasas blancas (Giardina *et al.*, 2010). Algunos autores han sugerido que las lacasas amarillas son el resultado de la unión de compuestos aromáticos de la degradación de la

lignina a las lacasas azules durante el crecimiento fúngico. La consecuencia es una reducción de los cobres T1 y T2 del centro activo y por tanto, la desaparición del color azul típico (Leontievsky *et al.*, 1997a). Varias lacasas amarillas han sido aisladas de ascomicetos y basidiomicetos, como es el caso de las de *Panus tigrinus* (Leontievsky *et al.*, 1997a), *Phlebia radiata* o *Pleurotus ostreatus*. Las lacasas de estos dos últimos microorganismos han mostrado su capacidad incluso para oxidar compuestos aromáticos no fenólicos en ausencia de mediadores (Leontievsky *et al.*, 1997b; Pozdnyakova *et al.*, 2006). Las lacasas blancas poseen un átomo de cobre en lugar de los 4 de las lacasas azules, dos átomos de zinc y uno de hierro por cada molécula proteica. Han sido purificadas de microorganismos como *Pleurotus ostreatus* (Palmieri *et al.*, 1997), *Pycnoporus sanguineus* (Litthauer *et al.*, 2007) o *Trametes hirsuta* (Haibo *et al.*, 2009).

Las oxidasas multicobre y la mayoría de las lacasas, comparten una organización general basada en tres dominios de tipo cupredoxina. Estos dominios presentan un alto grado de homología entre ellos y con la familia de proteínas monoméricas de tipo cupredoxina como la azurina o plastocianina, sugiriendo la existencia de un gen ancestral común. (Nakamura y Go, 2005). Cada uno de estos dominios presenta una arquitectura tipo barril- β con topología tipo clave griega y se encuentran estabilizados por varios puentes disulfuro. El dominio 3 posee una cavidad hidrofóbica con carga negativa donde se encuentra localizado el centro T1. En sus proximidades se une el sustrato reductor que podría estabilizar el radical catiónico que se produce tras su oxidación. El centro trinuclear T2/T3 se encuentra embebido entre los dominios 1 y 3, a 13 Å de distancia del sitio T1, y el dominio 2 contiene residuos implicados en la unión del sustrato.

En los últimos años se han descrito enzimas con actividad lacasa como la denominada SLAC de *Streptomyces coelicolor* (Figura 1.4) (Skálová *et al.*, 2009), la oxidasa multicobre de *Nitrosomonas europaea* (Lawton *et al.*, 2009), la lacasa Ssl1 de *S. svicens* (Gunne y Urlacher, 2012) o más recientemente la lacasa de *S. violaceusniger* (Lu *et*

al., 2014), que presentan sólo dos dominios de tipo cupredoxina.



Figura 1.4. Estructura tridimensional de la lacasa de *S. coelicolor*. Los dominios cupredoxina aparecen agrupados en forma de tres dímeros, los centros del cobre se representan como esferas naranjas (tomado de Skálová *et al.*, 2009).

El origen de las oxidasas multicobre y las proteínas monoméricas de tipo cupredoxina ha sido tema de debate durante varios años. El proceso evolutivo seguido por estas familias de enzimas del cobre parece haberse iniciado con la duplicación de un dominio cupredoxina inicial, dando lugar a una proteína de dos dominios (Figura 1.5). Algunos estudios sugieren dos posibles caminos para llegar a constituirse esta enzima de dos dominios: dos duplicaciones más dando lugar a una proteína de seis dominios como la ceruloplasmina, o la adición de un tercer dominio cupredoxina constituyendo las proteínas de tres dominios, como la ascorbato oxidasa o la lacasa (Ryden y Hunt, 1993). Por otro lado, se ha postulado que el origen de la ceruloplasmina podría derivar de la duplicación de una proteína tipo lacasa de tres dominios. O al contrario, que la aparición de las lacasas podría derivar de la pérdida de tres dominios de una proteína de tipo ceruloplasmina (Murphy *et al.*, 1997). La teoría más reciente plantea una serie de etapas intermedias que sufrirían las proteínas de dos dominios, que tras duplicaciones y ganancia o pérdida de centros del cobre, darían lugar a proteínas del cobre como la nitrito reductasa y a las distintas oxidasas multicobre conocidas (Nakamura *et al.*, 2003). Nakamura y Go (2005) hacen distinción entre tres tipos de oxidasas

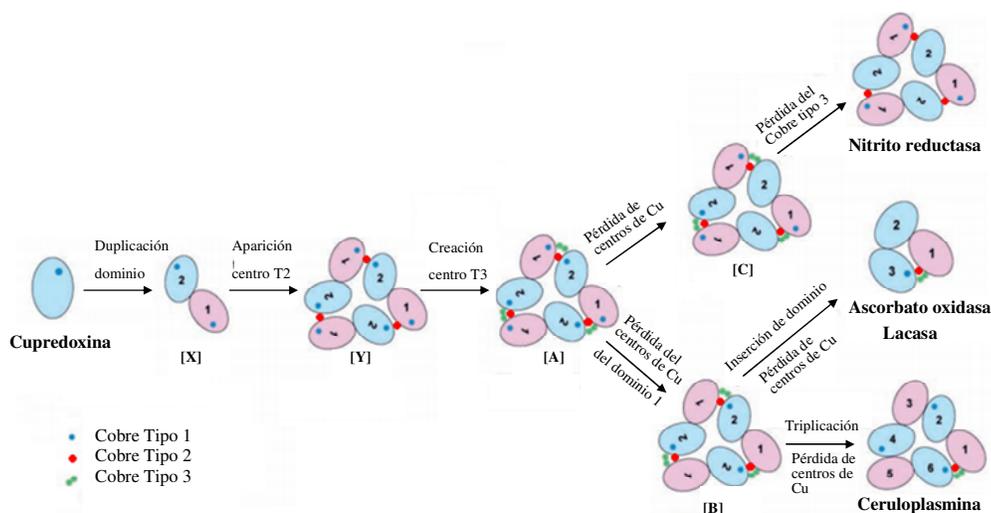


Figura 1.5. Representación esquemática del proceso evolutivo y organización en dominios de las oxidasas multicobre. Los óvalos representan los dominios cupredoxina que conforman las proteínas; el color azul o rosa hace distinción entre las dos grandes clases de dominios tipo cupredoxina descubiertos en las oxidasas multicobre (Murphy *et al.*, 1997). Los círculos azules, rojos y verdes representan los centros del cobre tipo 1, 2 y 3 respectivamente. Entre corchetes se indican las proteínas hipotéticas de los pasos evolutivos intermedios, tres de ellos [X], [Y] y [A] poseen centros del cobre en ambos dominios, [B] y [C] disponen de un único centro del cobre en el dominio 1 y 2, respectivamente. [A], [B] y [C] poseen centros interdominios trinucleares mientras que los de [Y] son mononucleares. Figura tomada y modificada de Nakamura y Go (2005).

multicobre de dos dominios en función de la localización del cobre T1: A, B y C. El tipo A sería la proteína más antigua y ancestro común de los tipos B y C. Posee un cobre T1 en cada uno de los dominios. El tipo B contiene un único cobre T1 en el dominio 2. Sería un ancestro común de las proteínas de tres dominios como las lacasas y la ascorbato oxidasa y de las de seis dominios como la ceruloplasmina. El tipo C, al igual que el tipo B, posee un único cobre T1 pero en el dominio 1. Este último tipo de oxidasas se correspondería con el ancestro de las dos enzimas nitrito reductasa triméricas de dominios (Nakamura y Go, 2005; Skálová *et al.*, 2011). Este planteamiento se vió reforzado gracias a la identificación de distintas oxidasas multicobre de dos dominios, las cuales no podrían formar los centros interdominio T2/T3 en su forma monomérica, pero sí formando homotrímeros.

1.2.1.1. Mecanismo catalítico de las lacasas.

En la reacción catalizada por las lacasas, los distintos centros del cobre de la enzima conducen los electrones desde un sustrato reductor al oxígeno molecular, sin la producción de intermediarios tóxicos como el

radical superóxido o el peróxido de hidrógeno (Palmer *et al.*, 2001). Esto se consigue mediante cuatro oxidaciones monoeléctricas del sustrato catalizadas por el cobre T1.

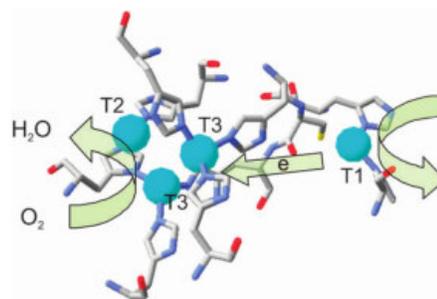


Figura 1.6. Representación esquemática de la reducción de oxígeno por acción catalítica de la lacasa (tomado de Sosna *et al.*, 2010).

Los electrones son posteriormente transferidos al centro trinuclear, mediante una ruta formada por los aminoácidos His-Cys-His (Ivnitski y Atanassov, 2007) a lo largo de los 12 Å que separan el centro T1 del átomo de cobre T3 (Matera *et al.*, 2008). Tras recibir cuatro electrones procedentes del sustrato, junto con dos protones del medio, la enzima queda completamente reducida. En este estado la enzima reacciona con el oxígeno mediante dos

pasos secuenciales de transferencia de dos electrones, teniendo lugar la reducción del oxígeno molecular y la liberación de agua como se muestra en la Figura 1.6.

A continuación se detallan aspectos fundamentales de cómo tiene lugar la oxidación de los sustratos por las lacasas. En primer término, se produce la unión del sustrato reductor al cobre T1, siendo por tanto el cobre T1 el primer aceptor de electrones procedentes del sustrato. El cobre del centro T1 está coordinado por dos nitrógenos procedentes de dos histidinas (His395 y 458), un azufre aportado por una cisteína (Cys453) y un cuarto ligando no coordinante variable en las lacasas, que puede ser metionina en lacasas bacterianas como CotA, o leucina o fenilalanina en lacasas fúngicas (Claus, 2004). El anillo de la histidina 458 (His458) está altamente conservado en todas las oxidasas multicobre, lo que sugiere que sea la entrada de electrones durante su transferencia al sitio T1 (Figura 1.7) (Giardina *et al.*, 2010).

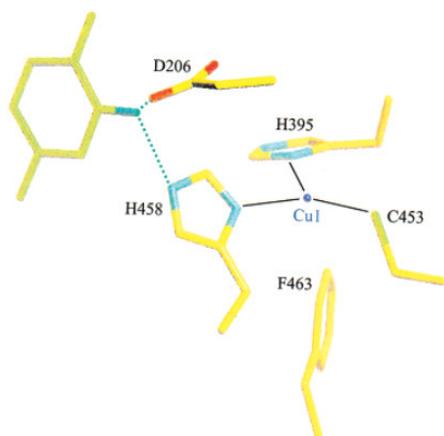


Figura 1.7. Coordinación del cobre del sitio T1 por las dos histidinas 395 y 458 y la cisteína 453. Se muestra también las cadenas laterales de los aminoácidos no coordinantes fenilalanina 463 y aspártico 206 (tomado de Bertrand *et al.*, 2002).

La reducción del cobre del centro T1 es un paso crucial y limitante en la capacidad catalítica de la enzima. La diferencia entre el potencial del sitio T1 y el de los sustratos reducidos determina la tasa de transferencia de electrones. La posición del cuarto ligando axial variable del sitio T1 ha sido tema de estudio durante los últimos años debido a su gran influencia en el

potencial de oxido-reducción de la enzima. La presencia de una fenilalanina o leucina como ligando axial en las lacasas fúngicas, contribuye, en cierto modo, al elevado potencial de las mismas. De hecho, algunos estudios han demostrado el aumento del potencial redox de una lacasa bacteriana al reemplazar la metionina del cuarto ligando axial por leucina o fenilalanina (Durão *et al.*, 2006).

Otros autores sugieren que la modulación del potencial de reducción del cobre T1 es función de la reducción de la densidad electrónica alrededor del mismo, merced a variaciones en la distancia entre el sitio T1 y una de las histidinas que lo coordinan (Piontek *et al.*, 2002). Sin embargo, las diferencias observadas experimentalmente en el potencial del Cu del centro T1 no justifican las diferencias de potencial entre las lacasas existentes. Otros factores, como la formación de puentes de hidrógeno, la accesibilidad del sustrato, la anisotropía dieléctrica alrededor del sitio o distintas interacciones electrostáticas entre la proteína e iones metálicos, deben influir posiblemente en el potencial redox (Xu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004; Giardina *et al.*, 2010).

La función del cobre del centro T1 como aceptor primario de electrones se ve favorecida al ocupar una depresión situada a 7 Å por debajo de la superficie de la enzima. En esta cavidad pueden acoplarse una gran variedad de sustratos (Giardina *et al.*, 2010) y gracias a ello y al elevado potencial redox del sitio T1 es ahí donde tiene lugar la oxidación de los mismos. Estudios recientes han demostrado la relevancia de los residuos de histidina y aspártico para la interacción del grupo amino de un sustrato con la enzima. Este residuo aspártico (Asp206) está muy conservado entre las lacasas fúngicas pertenecientes al grupo de los Basidiomicetos y se le relaciona con la dependencia de la actividad lacasa en función del pH (Xu, 1997; Xu *et al.*, 1998).

No obstante, el elemento clave en la reducción del oxígeno molecular es el complejo trinuclear formado por los centros del cobre T2 y T3. Este centro está coordinado por ocho histidinas dispuestas en un patrón muy conservado de cuatro motivos H-X-H (Messerschmidt y

Huber, 1990). En uno de estos motivos el grupo X es la cisteína que coordina el cobre T1 y las dos histidinas laterales participan en la unión de los átomos de cobre del centro T3 (Figura 1.8). En la enzima reducida, tras captar los cuatro electrones del sustrato, no hay conexión entre el cobre T2 y los dos cobres del centro T3. En este estado, la enzima reacciona con el oxígeno suministrándole dos electrones de los cuatro localizados en el centro T1 y dando lugar al intermediario peróxido que será el encargado de coordinar los cobres de los centros T2 y T3. En un segundo paso, con la transferencia del siguiente par de electrones, el peróxido intermedio se reduce dando lugar al intermediario nativo con dos conformaciones posibles, oxo o hidroxilo, que es rápidamente reducido debido a la presencia del sustrato en la reacción catalítica.

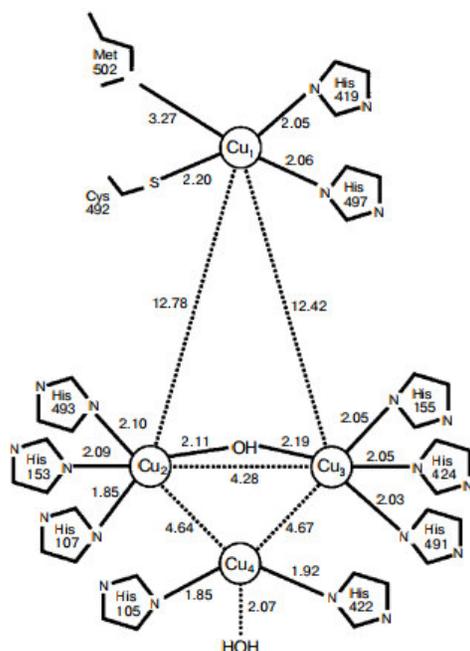


Figura 1.8. Representación esquemática de los centros del cobre, los aminoácidos coordinantes y las distancias interatómicas (Å) de la lacasa de *Bacillus subtilis* (tomado de Enguita *et al.*, 2003).

Ante la ausencia de sustrato, el intermediario nativo pasaría lentamente al estado de reposo oxidado donde los átomos de oxígeno se encuentran en forma de hidroxilo unidos al cobre T2. Este estado de reposo puede revertirse y ser completamente reducido por el sustrato (Solomon *et al.*, 2001). Este mecanismo ha sido elucidado durante los últimos años

mediante el empleo de enzimas con el cobre del centro T1 intercambiado por otro ión que resulta inactivo para la reacción como es el mercurio (T1Hg). Así, se ha podido detectar el intermediario peróxido (Shin *et al.*, 1996) y se ha descubierto que el complejo trinuclear juega un papel esencial, siendo la unidad estructural mínima requerida para la reducción del O₂. Según parece, las cargas aniónicas que rodean el agrupamiento trinuclear en la forma reducida de la enzima, contribuyen a la estabilización de la alta carga positiva facilitando la reactividad con el oxígeno (Quintanar *et al.*, 2005).

Los estudios llevados a cabo con la lacasa CotA de *B. subtilis* han conducido a la formulación de una nueva hipótesis sobre el mecanismo de reducción del oxígeno (Bento *et al.*, 2005) cuya posible representación esquemática se muestra en la Figura 1.9. En un primer paso, el O₂ se desplazaría hacia el complejo trinuclear a través de un canal bien definido. A continuación, se formaría el peróxido intermedio al recibir dos electrones cedidos del Cu1 a través de una de las histidinas y posteriormente su transmisión de esos electrones a través de la cisteína hacia las histidinas que coordinan Cu2 y Cu3. La adquisición de otro par de electrones genera la rotura del peróxido en dos grupos hidroxilo, uno de los cuales permanece como puente entre los cobres del sitio T3 y otro migra hacia el sitio T2 (Messerschmidt, 1992; Bento *et al.*, 2005) provocando un movimiento rotacional del Cu4 sobre una de sus histidinas y permitiendo así que pueda unir el hidroxilo y desplazarlo después hacia la parte exterior del canal de salida donde se adicionará un protón para dar lugar a la primera de las dos moléculas de agua resultantes.

1.2.2. Reactividad de las lacasas

Los fenoles son los sustratos típicos de las lacasas debido a su potencial redox, que es lo suficientemente bajo como para permitir la extracción de electrones por el cobre del centro T1. Los centros activos de las oxidasas multicobre son cavidades extensas tanto en superficie como en volumen y próximas al cobre T1, lo que facilita el acceso de diversidad de moléculas (Enguita *et al.*, 2003). La baja

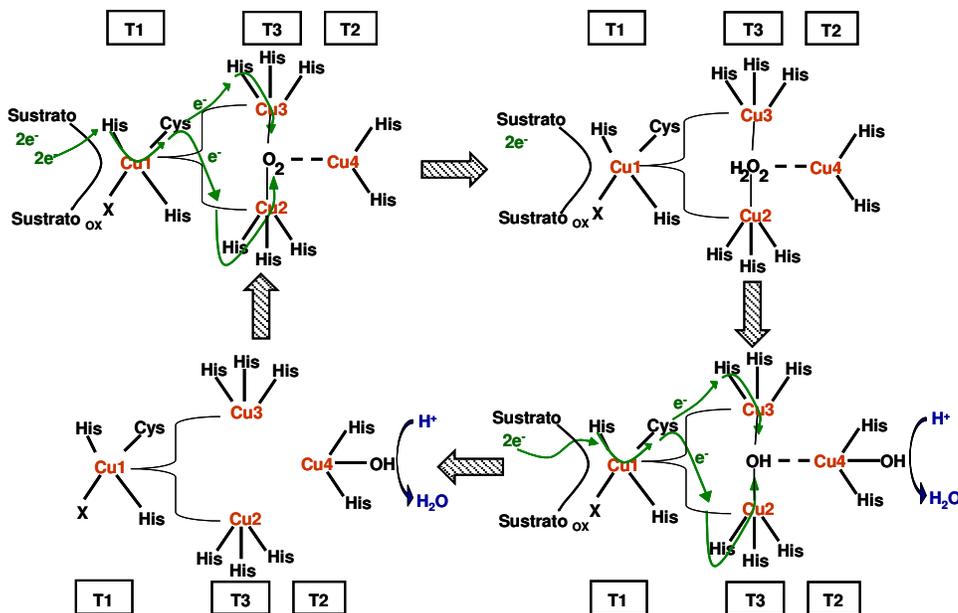


Figura 1.9. Representación esquemática de la reducción del O_2 por la acción de las lacasas, basado en el modelo de Bento *et al.*, 2005.

especificidad de sustrato característica de estas enzimas permite que un amplio rango de compuestos sean susceptibles de ser oxidados, tales como metoxifenoles, aminas aromáticas, mono- y polifenoles, iones inorgánicos, etc (Thurston, 1994; Larrondo *et al.*, 2003; Baldrian, 2006; Giardina *et al.*, 2010). También pueden llevar a cabo desmetilaciones (Kirk y Farrell, 1987) y deshalogenaciones. La disposición de los sustituyentes en una molécula fenólica en las posiciones *meta*-, *orto*- y *para*- es un factor determinante de la capacidad de la lacasa para oxidar dicho compuesto, siendo la sustitución *meta*- la menos favorecida para la oxidación del compuesto. En la oxidación de un sustrato también es determinante la presencia de determinados grupos en la molécula; así, mientras que los grupos $-OH$ y $-NH_2$ mejoran la susceptibilidad del compuesto a ser oxidado por la lacasa, los grupos $-Cl$ y $-NO_2$, al ser secuestradores de electrones, perjudican la acción catalítica de la enzima.

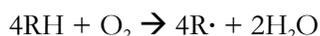
La acción de las lacasas frente a compuestos fenólicos es dependiente del pH, ya que el potencial redox de estos compuestos disminuye al aumentar el pH (Xu, 1997). Se demostró la existencia de enzimas bacterianas capaces de actuar a valores de pH muy alcalinos, como es el caso de las lacasas de *Streptomyces ipomoea*

(Molina-Guijarro *et al.*, 2009), *S. svicens* (Gunne y Urlacher, 2012) y *S. coelicolor* (Machczynski *et al.*, 2004), entre otras.

Se ha descrito que iones inorgánicos como cloruros y compuestos orgánicos como la cisteína o la azida sódica resultan inhibidores de la actividad lacasa (Morozova *et al.*, 2007a). No obstante, algunas de las lacasas bacterianas caracterizadas hasta la fecha presentan una alta resistencia a la presencia de determinados compuestos. Tal es el caso de la lacasa recombinante SilA producida por *S. ipomoea* cuya actividad permanece estable en presencia de concentraciones 1M de cloruro de sodio o 10 mM de azida sódica (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). Otros compuestos descritos capaces de inhibir la acción de las lacasas son metales pesados como el Hg^{2+} o quelantes como el EDTA (Lorenzo *et al.*, 2005; Baldrian, 2006).

Las lacasas se diferencian de otras enzimas como las tirosinasas (EC 1.14.18.1) o las catecol oxidasas (EC 1.10.3.1) en que no oxidan la tirosina y no son inhibidas por monóxido de carbono. Como ya se ha mencionado con anterioridad, las lacasas actúan extrayendo electrones del sustrato fenólico convirtiéndolos en radicales fenoxilo los cuales pueden polimerizar espontáneamente o reorganizarse dando lugar a quinonas mediante

desprotonación (Giardina *et al.*, 2010). La reacción se produce según el siguiente patrón:



El hecho de que un compuesto sea susceptible de ser oxidado por una lacasa está determinado tanto por su estructura tridimensional como por su potencial redox (Tadesse *et al.*, 2008).

1.2.3. Caracterización molecular de las lacasas

A partir de la primera publicación de la secuencia genética de una lacasa, correspondiente al hongo ascomiceto *Neurospora crassa* (Germann y Lerch, 1986), el número de secuencias genéticas de otras lacasas ha ido creciendo casi exponencialmente. La mayoría de estas secuencias se corresponden con lacasas fúngicas y de plantas. No obstante, la mayoría de los genes de cuya información se dispone, no son más que secuencias parciales o genes putativos de lacasas. Estos organismos suelen presentar familias de lacasas multigénicas más extensas en plantas donde se han identificado hasta 25 genes distintos en el césped inglés (*Lolium perenne*) (Gavnholt *et al.*, 2002). En hongos se han identificado 3 ó 5 genes en *Pleurotus sajor-caju* y *Trametes sanguinea*, respectivamente (Hoshida *et al.*, 2001; Soden y Dobson, 2001).

La información genética disponible sobre estas enzimas, ha permitido su sobreexpresión en otros microorganismos con el propósito final de mejorar la producción enzimática para su posterior aplicación a nivel industrial. Algunos de los microorganismos utilizados normalmente para la expresión heteróloga de lacasas fúngicas son, entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulus* y *Pichia pastoris*, mientras que para la expresión de lacasas bacterianas se utiliza principalmente *Escherichia coli* (Kunamneni *et al.*, 2008). Sin embargo, factores como el grado de glicosilación o el plegamiento de la proteína son determinantes para el buen funcionamiento de la enzima y suelen variar en función del hospedador utilizado. Por estas razones, se están buscando nuevas formas de mejorar las propiedades e incrementar los niveles de producción de estas enzimas, mediante procesos de mutagénesis o evolución

dirigida que permitan, entre otros objetivos, ampliar su especificidad de sustrato o aumentar su estabilidad estructural mediante cambios precisos en la secuencia de aminoácidos (Iffland *et al.*, 2000; Madzak *et al.*, 2005). Mediante estas técnicas también se pueden potenciar otras propiedades importantes de estas enzimas con vistas a su aplicación industrial, tales como, la actividad enzimática, la estabilidad frente a temperatura o pH (Mordukhova *et al.*, 2008) o aumentar la expresión génica de una determinada proteína en el hospedador (Bulter *et al.*, 2003).

Se ha observado que la presencia de determinados compuestos en el medio tales como iones metálicos, entre los que cabe mencionar principalmente, el cobre, la plata y el manganeso (Palmieri *et al.*, 2000; Soden y Dobson, 2001), conlleva un aumento en la actividad de lacasas fúngicas. Esto se debe a que estos iones actúan como inductores de ciertos genes implicados en la homeostasis o detoxificación de metales (Kagi y Schaffer, 1988). De igual modo, la presencia de compuestos aromáticos como el ácido ferúlico o el ácido verátrico e incluso de colorantes industriales, induce la expresión de genes de respuesta a xenobióticos (Soden y Dobson, 2001; Faraco *et al.*, 2003). Además, se ha observado la dependencia de la actividad lacasa de ciertos nutrientes, como es el caso del nitrógeno en *Trametes versicolor* (Thurston, 1994) o de la glucosa, que se ha demostrado que a concentraciones elevadas es capaz de inhibir la actividad lacasa de algunas especies de *Trametes* (Galhaup *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2006).

1.2.4. Distribución y función biológica de las lacasas.

Las lacasas son enzimas estudiadas desde finales del siglo XIX. La primera lacasa conocida se descubrió en el árbol japonés de la laca *Toxicodendron vernicifluum* (Yoshida, 1883) anteriormente denominado *Rhus vernicifera*, del que tomó nombre la enzima. A partir de ese momento se puso de manifiesto la amplia distribución de estas enzimas, descubriéndose posteriormente en hongos (Bertrand, 1896), siendo los basidiomicetos los mayores

productores de lacasa (Gianfreda *et al.*, 1999). En bacterias se ha descrito un número más limitado de estas enzimas, entre las que cabe mencionar las producidas por *Azospirillum lipoferum* (Givaudan *et al.*, 1993), *Marinomonas mediterranea*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis* (Claus, 2003) y *Streptomyces* (Berrocal *et al.*, 1997). También se han descrito en insectos (Dittmer *et al.*, 2004), arqueas (Uthandi *et al.*, 2010) y más recientemente en algas como *Tetracystis aeria* (Otto y Schlosser, 2014). Se ha llegado a describir la presencia de lacasa en líquenes, aunque sin embargo, la enzima parece ser producida principalmente por el hongo y no por el alga simbiote (Lisov *et al.*, 2012). Se ha descrito la implicación de las lacasas en una gran parte de procesos biológicos diferentes, pero en la mayor parte de los casos la función específica que realizan es desconocida.

1.2.4.1. Lacasas de plantas

Las lacasas de plantas son glicoproteínas que se caracterizan por presentar un grado de glicosilación comprendido entre el 22 y el 45 %, siendo todas ellas enzimas extracelulares monoméricas (Solomon *et al.*, 1996). La lacasa del árbol de la laca japonés ha sido extensamente estudiada desde su descubrimiento en 1883 y es la enzima de la que posee un mayor conocimiento. Otras lacasas fueron descubiertas posteriormente tanto en monocotiledóneas, como la lacasa del césped inglés (*Lolium perenne*), que se ha clonado y caracterizado ampliamente, (LaFayette *et al.*, 1999) o las del arroz y el maíz (Caparrós-Ruiz *et al.*, 2006), como en dicotiledóneas, tales como la del tabaco (Richardson y McDougall, 1997) o el algodón (Wang *et al.*, 2004).

Dentro de una misma especie de planta es posible encontrar varias isoformas de esta enzima, puesto que en general, las lacasas de plantas pertenecen a familias multigénicas (Dwivedi *et al.*, 2011). Así, hasta cinco lacasas distintas se han detectado en el xilema de *Populus trichocarpa* (Ranocha *et al.*, 1999) y hasta ocho lacasas fueron descritas en *Pinus taeda* (Sato *et al.*, 2001).

Las lacasas de plantas se han relacionado con la biosíntesis de la lignina, al haberse demostrado

la capacidad de la lacasa para polimerizar monómeros de lignina (Freudenberg, 1959) mediante procesos de deshidrogenación (Sterjiades *et al.*, 1992). La hipótesis de la implicación de estas lacasas en la síntesis de lignina ha fluctuado durante bastantes años. Algunos estudios corroboraban la hipótesis al demostrar la participación de las lacasas en la polimerización de monolignoles (Sterjiades *et al.*, 1992) y la deposición de lignina en paredes celulares del xilema (Bao *et al.*, 1993; Dean y Eriksson, 1994). Por el contrario, otros estudios genéticos demostraron que las variaciones en el contenido de lignina eran prácticamente imperceptibles (Ranocha *et al.*, 1999). Asimismo, las lacasas vegetales se han implicado en la respuesta frente a heridas (McCaig *et al.*, 2005), en la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} (Hoopes y Dean, 2004) o en la polimerización de flavonoides para la pigmentación de semillas (Pourcel *et al.*, 2005). Sin embargo, a pesar de la amplia distribución de estas enzimas, su purificación a partir de extractos crudos de plantas resulta un proceso complejo y es por ello que no han sido caracterizadas ni estudiadas en extensión (Strong y Claus, 2011).

1.2.4.2. Lacasas de insectos

Las enzimas de tipo fenoloxidasas han sido relacionadas desde hace años con procesos de esclerotización de la cutícula de insectos. De hecho, entre 1970 y 1980 se han aislado varias lacasas de dicha cutícula (Andersen *et al.*, 1996). Posteriormente, las lacasas del gusano del tabaco (*Manduca sexta*) y del mosquito transmisor de la malaria (*Anopheles gambiae*) (Dittmer *et al.*, 2004) fueron clonadas y caracterizadas. También se ha relacionado a estas enzimas con procesos de pigmentación de la cutícula en el escarabajo rojo *Tribolium castaneum* (Arakane *et al.*, 2005) y en el gusano de seda *Bombix mori* (Yatsu y Asano, 2009). Algunas de las nuevas funciones que se les atribuye a las lacasas de insectos son la destoxicación de compuestos fenólicos procedentes de las plantas que ingieren y la gelificación de la saliva, debido a la presencia de estas enzimas en las glándulas salivales de *Nephotettix cincticeps* (Hattori *et al.*, 2010).

1.2.4.3. Lacasas de hongos

La presencia de actividad lacasa en hongos es bien conocida desde hace años. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en ascomicetos, deuteromicetos y basidiomicetos, aunque no se han encontrado evidencias de lacasas en algunos grupos taxonómicos como *Zigomycetes*. Se han aislado más de cien lacasas de estos grupos y al ser muy extenso el conocimiento sobre ellas, se consideran las mejor caracterizadas.

Todas las lacasas fúngicas son monómeros u homodímeros, excepto la isoenzima I homotetrámera de *Podospira anserina* (Solomon *et al.*, 1996). Al igual que las lacasas de plantas, son proteínas glicosiladas aunque en menor grado (10-25 %). Poseen un punto isoeléctrico en torno a pH 4 y una masa molecular de unos 60 a 70 kDa (Baldrian, 2006).

Algunas de las lacasas de hongos mejor estudiadas son las producidas por *Trametes versicolor*, *T. villosa*, *T. hirsuta*, *T. ochracea*, *Cerrena maxima*, *Phlebia radiata*, *Corioloopsis polizona* y *Pleurotus eryngii*, entre otros. También hay lacasas caracterizadas de hongos ectomicorrizógenos como *Cantharellus cibarius*, *Lactarius piperatus* o *Russula delica*, de ascomicetos saprofitos como *Aspergillus* y *Penicillium*, o incluso de hongos saprofitos y formadores de ectomicorrizas como son, *Marasmius*, *Agaricus* o *Tricholoma* (Dwivedi *et al.*, 2011).

La mayoría de las lacasas fúngicas son extracelulares, aunque algunas especies concretas producen isoenzimas tanto intra- como extracelulares (Solomon *et al.*, 1996). Algunas de las funciones biológicas atribuidas a las lacasas fúngicas están relacionadas con procesos de morfogénesis, formación de pigmentos, como se ha demostrado que ocurre en *Aspergillus nidulans*, cuyos mutantes carentes de actividad lacasa presentaban esporas amarillas en lugar del color verde característico de la cepa silvestre (Clutterbuck, 1972; Law y Timberlake, 1980). También se han relacionado con el desarrollo de rizomorfos en *Armillaria mellea* (Worrall *et al.*, 1986) o la formación de cuerpos fructificantes en especies de *Schizophyllum* (Vries *et al.*, 1986) y en *Volvariella volvacea* (Chen *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha

demostrado el papel de las lacasas como factores de virulencia y patogenicidad en enfermedades de plantas causadas por los hongos *Botrytis cinerea* (Viterbo *et al.*, 1994), *Ophiostoma novo-ulmi*, *Fusarium proliferatum* (Regalado *et al.*, 1999) o *Magnaporthe grisea* (Iyer y Chattoo, 2003) al degradar depósitos de lignina que la planta produce como respuesta al ataque fúngico (Litvintseva y Henson, 2002). Un hecho que corrobora el papel de las lacasas en las infecciones fúngicas hace referencia a la infección producida en humanos por la levadura *Cryptococcus neoformans*. En este caso, la lacasa localizada en la pared celular del hongo actúa como factor de virulencia, convirtiendo las catecolaminas del hospedador en melanina, con el consiguiente bloqueo de la producción de radical hidroxilo que forma parte de la defensa de los macrófagos frente al agresor, lo que conlleva la producción de daño en el hospedador (Salas *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2001).

Sin embargo, uno de los papeles más conocidos y característicos de las lacasas fúngicas es su implicación en la degradación de la lignina. Los basidiomicetos productores de actividad lacasa se han implicado en la despolimerización y degradación de la lignina, función que ejercen junto con otras enzimas degradativas como la lignina peroxidasa, la manganeso peroxidasa o la glucosa oxidasa (Dwivedi *et al.*, 2011). Aún así, algunos estudios ponen en duda dicha función, al comprobarse que se produce degradación de la lignina tras la inhibición de la actividad lacasa (Haars y Huttermann, 1980; Evans, 1985). Sin embargo, otros estudios respaldan el papel de la lacasa en la degradación de este biopolímero al comprobar que mutantes no productores de esta enzima del hongo de la podredumbre blanca *Sporotrichum pulverulentum* no fueron capaces de degradar lignina (Ander y Eriksson, 1976) al igual que ocurría en el caso del hongo *Pycnoporus cinnabarinus* productor de lacasa y carente de otras enzimas relacionadas con la degradación del polímero, como la lignina peroxidasa o la manganeso peroxidasa (Eggert *et al.*, 1996a).

Algunos trabajos sugieren la presencia de lacasas en hongos de la podredumbre parda,

que degradan fundamentalmente la celulosa y la hemicelulosa de los materiales lignocelulósicos (Ander y Eriksson, 1976; Dsouza *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004), generando una acumulación de lignina oxidada que aporta color pardo a la madera (Wei *et al.*, 2010).

1.2.4.4. Lacasas de arqueas

En contraste con el gran número de lacasas descritas en eucariotas, el número de lacasas identificadas en arqueas es muy limitado. A pesar de que hace varios años ya aparecieron las primeras descripciones de la posible existencia de lacasas en este grupo de microorganismos (Claus, 2003), no ha sido hasta fechas recientes cuando se ha corroborado este hecho. Las primeras descripciones hacen referencia a un estudio realizado “in silico” en el que se revelaba la posibilidad de que distintas arqueas podrían ser fuente de lacasas, como por ejemplo, las especies *Haloarcula marismortui* ATCC 43049, *Pyrobaculum aerophilum* IM2 o *Natronomonas pharaonis* DSM2160 (Sharma y Kuhad, 2009).

Sin embargo, posteriormente se ha comprobado que la mayoría de las arqueas, cuyos genomas han sido secuenciados, son anaerobias, lo que dificulta la posibilidad de que estos microorganismos presenten oxidasas multicobre. A pesar de ello, una lacasa (Lcca) producida por la especie *Haloferax volcanii* se ha purificado y caracterizado recientemente (Uthandi *et al.*, 2010). Se trata de una lacasa termoestable con un pH óptimo alcalino y con una elevada tolerancia a altas concentraciones de sales y disolventes orgánicos.

1.2.4.5. Lacasas bacterianas

Aunque se conoce desde hace varios años la amplia distribución de lacasas en bacterias, su conocimiento es relativamente reciente. La primera lacasa bacteriana se descubrió en *Azospirillum lipoferum* (Givaudan *et al.*, 1993) y se relacionó con la síntesis de melanina. Un estímulo importante para el estudio de lacasas en bacterias fue el resultado del trabajo “in silico” realizado por Alexandre y Zhulin (2000), en el que exploró un gran número de genomas bacterianos publicados en las bases de datos.

Los resultados pusieron de manifiesto la existencia de secuencias típicas de lacasa en numerosos grupos bacterianos, en las que se detectaron entre otros, los genes codificantes de los centros de unión al cobre.

Las bacterias, al ser microorganismos ubicuos, capaces de colonizar hábitats muy diversos, presentan una gran versatilidad metabólica, lo que las convierte en candidatos muy idóneos para la búsqueda de enzimas que resistan condiciones extremas, que son las que normalmente se requieren en la industria biotecnológica. El interés por el descubrimiento de lacasas bacterianas condujo a la descripción de una serie de ellas en bacterias aisladas de distintos ambientes. En este sentido, cabe señalar, la oxidasa multicobre producida por la bacteria marina melanogénica *Marinomonas mediterránea* (Sánchez-Amat y Solano, 1997), que produce dos fenoloxidasas diferentes, una de las cuales presenta actividad tirosinasa y es capaz asimismo de oxidar los sustratos típicos de las lacasas (Sánchez-Amat *et al.*, 2001). Esta enzima presenta además una elevada tolerancia a la presencia de sales y un alto potencial redox (900 mV) (Lucas-Elio *et al.*, 2002). Posteriormente, se han descrito dos proteínas con actividad lacasa en *Pseudomonas syringae* (Mellano y Cooksey, 1988) y en *Escherichia coli* (Brown *et al.*, 1995), denominadas CopA y PcoA respectivamente. Estas enzimas son estructuralmente homólogas a las oxidasas multicobre con respecto a los sitios de unión al cobre, y se ha demostrado su importancia en la resistencia al cobre de estas bacterias.

Una de las lacasas bacterianas que han recibido mayor atención es la lacasa CotA, presente en la superficie de la espora de *Bacillus subtilis* (Hullo *et al.*, 2001). Se trata de una lacasa termoestable (Martins *et al.*, 2002) que participa en la formación de un pigmento pardo tipo melanina en la superficie de la espora de este microorganismo (Driks, 2004), que le protege frente a la radiación UV y el peróxido de hidrógeno. Cabe destacar, que se trata de la primera lacasa bacteriana cristalizada, en la que se detectaron motivos únicos no observados en eucariotas (Engueta *et al.*, 2003). Otras lacasas descritas posteriormente, algunas de las cuales han sido purificadas y caracterizadas, son

producidas por las especies *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).

Entre las lacasas bacterianas, cabe señalar las producidas por distintas especies del género *Streptomyces*, que presentan un gran interés biotecnológico, al ofrecer diferencias estructurales incluso entre distintas especies del mismo género, y una gran versatilidad para actuar en condiciones extremas de pH y temperatura. Entre estas lacasas, cabe mencionar, la enzima EpoA producida por *Streptomyces griseus* que ha sido caracterizada bioquímica y fisicoquímicamente (Endo *et al.*, 2003), habiéndose expresado como enzima recombinante en *E. coli*. Se trata de un homotrímero que presenta una especificidad de sustrato relativamente reducida y parece tener un papel en la morfogénesis del microorganismo. Otra de las lacasas bacterianas mejor estudiadas, es la lacasa SLAC producida por *Streptomyces coelicolor* (Machczynski *et al.*, 2004), que se caracteriza por presentar únicamente dos dominios de tipo cupredoxina, en contraste con los tres que se han descrito para el resto de las lacasas. Su cristalización (Skálová *et al.*, 2009) ha permitido revelar su naturaleza trimérica y no dimérica como se había sugerido en principio (Machczynski *et al.*, 2004).

Otras de las lacasas que se han descubierto dentro de este género corresponden a las especies, *S. lavendulae*, que muestra estabilidad a 70 °C (Suzuki *et al.*, 2003), *S. psammoticus*, que se muestra estable a pH alcalino y es altamente tolerante a sales (Niladevi *et al.*, 2008), *S. svicens* (Gunne y Urlacher, 2012), *S. ipomoea* (Molina-Guijarro *et al.*, 2009) que también presenta alta tolerancia a condiciones alcalinas y a elevadas concentraciones de cloruro sódico, y que al igual que la lacasa SLAC solamente posee dos dominios cupredoxina, *S. cyaneus* (Moya *et al.*, 2010) con una gran estabilidad a un amplio rango de pH y temperatura y más recientemente *Streptomyces* sp. SB086 (Fernandes *et al.*, 2014) que produce una lacasa termoestable.

Es importante mencionar que las lacasas producidas por algunas de las especies bacterianas señaladas son extracelulares, como es el caso de la lacasa producida por *S. ipomoea* que ha sido aislada y caracterizada en nuestro laboratorio, lo cual ofrece una ventaja importante sobre la mayor parte de las lacasas bacterianas intracelulares, a efectos de su utilización industrial.

En cuanto a las funciones biológicas desempeñadas por las lacasas bacterianas en los microorganismos productores, existe bastante controversia, habiéndose relacionado con procesos de morfogénesis, resistencia a metales, degradación de lignina, producción de pigmentos, etc. En la Tabla 1.1 se muestra un resumen de las posibles funciones que se han atribuido a las principales oxidasas multicobre con actividad lacasa descritas en bacterias. Hay que tener en cuenta que algunas de estas funciones se han atribuido tras deducir su identidad como lacasas a partir de las secuencias publicadas en las bases de datos para las oxidasas multicobre, careciendo actualmente de evidencias que corroboren su identidad a nivel bioquímico.

1.3. Potencial oxidativo de las lacasas: los sistemas lacasa-mediador y la producción de radicales hidroxilo

La capacidad de las lacasas para oxidar un amplio rango de compuestos de naturaleza fenólica, utilizando el oxígeno molecular fácilmente disponible como aceptor final de electrones, avalan la utilidad de estas enzimas para ser utilizadas en distintas aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, a pesar del gran potencial de óxido-reducción que muestran algunas lacasas, como es el caso de las lacasas de hongos, éste suele ser inferior al de las peroxidases ligninolíticas (mayor de 1 V), limitando el rango de acción a compuestos aromáticos de bajo potencial redox, como corresponde a las unidades fenólicas de la lignina (Kawai *et al.*, 1987). No obstante, se ha demostrado la posibilidad de aumentar la capacidad oxidativa de estas enzimas en la degradación de compuestos fenólicos, así como ampliar su rango de acción a sustratos de

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

Especie (gen)	Posible función	Referencia
<i>Leptothrix discophora</i> SS1	Destoxificación de Mn ²⁺ Eliminación especies tóxicas O ₂	(Adams y Ghiorse, 1987)
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Actividad nucleósido oxidasa	(Isono <i>et al.</i> , 1989)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>copA</i>)	Resistencia al Cu ²⁺	(Cha y Cooksey, 1991)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Pigmentación y oxidación de compuestos fenólicos	(Givaudan <i>et al.</i> , 1993)
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Síntesis de fenoxacinona	(Freeman <i>et al.</i> , 1993; Hsieh y Jones, 1995; Jones, 2000)
<i>Xanthomonas campestris</i> (<i>copA</i>)	Resistencia al Cu ²⁺	(Lee <i>et al.</i> , 1994)
<i>Bacillus</i> sp. (<i>mnxG</i>)	Esporulación y oxidación Mn ²⁺	(Van Waasbergen <i>et al.</i> , 1996)
<i>Bacillus sphaericus</i>	Esporulación, pigmentación	(Claus y Filip, 1997)
<i>Marinomonas mediterranea</i> (<i>ppoA</i>)	Pigmentación	(Sánchez-Amat <i>et al.</i> , 2001; Sánchez-Amat y Solano, 1997)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> GB-1	Oxidación de Mn ²⁺ Eliminación especies tóxicas del O ₂	(Okazaki <i>et al.</i> , 1997)
<i>Aquifex aelicus</i> (<i>sufI</i>)	Implicada en división celular	(Deckert <i>et al.</i> , 1998)
<i>Pseudomonas putida</i> GB1 (<i>cumA</i>)	Oxidación de Mn ²⁺	(Brouwers <i>et al.</i> , 1999)
<i>Pseudomonas</i> sp. (<i>CumA</i>)	Oxidación de Mn ²⁺	(Francis y Tebo, 2001)
α -proteobacteria SD 21	Oxidación de Mn ²⁺	(Francis <i>et al.</i> , 2001)
<i>Bacillus subtilis</i> (<i>cotA</i>)	Protección UV y H ₂ O ₂ . Pigmentación de esporas	(Hullo <i>et al.</i> , 2001)
<i>Escherichia coli</i> (<i>yacK</i>)	Flujo de Cu ²⁺ , oxidación de fenolatos-sideróforos. Actividad ferroxidasa	(Kim <i>et al.</i> , 2001; Roberts <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> (<i>paε1888</i>)	Desconocida	(Fitz-Gibbon <i>et al.</i> , 2002; Hernández-Romero <i>et al.</i> , 2005)
<i>Escherichia coli</i> (<i>pcoA</i>)	Resistencia al Cu ²⁺	(Huffman <i>et al.</i> , 2002)
<i>Oceanobacillus ibeyensis</i> (<i>cotA</i>)	Esporulación	(Takami <i>et al.</i> , 2002)
<i>Streptomyces griseus</i> (<i>epoA</i>)	Pigmentación, morfogénesis	(Endo <i>et al.</i> , 2002)
γ -proteobacteria JB	Oxidación compuestos tóxicos	(Bains <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptomyces cyanens</i> CECT 3335	Degradación de lignina Degradación contaminantes	(Arias <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptomyces lavendulae</i>	Desconocida	(Suzuki <i>et al.</i> , 2003)
<i>Bacillus halodurans</i> C-125 (<i>lhb 2082</i>)	Resistencia al Cu ²⁺	(Ruijsenaars y Hartmans, 2004)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Desconocida	(Dubé <i>et al.</i> , 2008; Machczynski <i>et al.</i> , 2004)
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	Desconocida	(Miyazaki, 2005)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Resistencia a compuestos fenólicos	(Hernández-Romero <i>et al.</i> , 2005)
<i>Snorhizobium mehloti</i>	Desconocida	(Hernández-Romero <i>et al.</i> , 2005; Rosconi <i>et al.</i> , 2005)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Homeostasis del cobre Respuesta a estrés oxidativo	(Hernández-Romero <i>et al.</i> , 2005; Sitthisak <i>et al.</i> , 2005)
Bacteria melanogénica del suelo	Protección UV y contra oxidantes	(Dalfard <i>et al.</i> , 2006; Hernández-Romero <i>et al.</i> , 2005)
<i>Rhodobacter capsulatus</i> (<i>cutO</i>)	Resistencia al Cu ²⁺	(Wiethaus <i>et al.</i> , 2006)
<i>Streptomyces psammoticus</i>	Desconocida	(Niladevi <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus licheniformis</i> (<i>cotA</i>)	Dimerización de ácidos fenólicos	(Koschorreck <i>et al.</i> , 2008)
<i>Streptomyces ipomoea</i>	Desconocida	(Molina-Guijarro <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus endospores</i>	Degradación de fenoles	(Naclerio <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus subtilis</i> WD23	Desconocida	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
<i>Aeromonas hydrophila</i> WL-11	Desconocida	(Wu <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LC02	Desconocida	(Pan <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus pumilus</i> (<i>cotA</i>)	Pigmentación de esporas Resistencia UV y H ₂ O ₂	(Reiss <i>et al.</i> , 2011)
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> MS5	Desconocida	(Verma y Shikot, 2014)

naturaleza no fenólica, mediante la utilización de compuestos que actúen como puentes de oxidación entre la enzima y el sustrato. Estos compuestos intermediarios se les denominó mediadores siendo el primero descubierto el 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), compuesto sintético capaz de oxidar dímeros no-fenólicos considerados modelos de la lignina (Bourbonnais y Paice, 1990). La actuación de estos compuestos mediadores de bajo peso molecular junto con las lacasas reforzó la implicación de estas enzimas en la degradación de lignina al extenderse su acción oxidativa a compuestos aromáticos no fenólicos, que no son sustrato habitual de las lacasas.

La lignina es un polímero tridimensional de naturaleza fenilpropanoide compuesta por tres monolignoles que se unen entre sí por más de diez tipos de enlaces diferentes de tipo éter y carbono-carbono, con distinto grado de metoxilación (Adler, 1977; Karhunen *et al.*, 1995). Estos monolignoles son tres alcoholes cinamílicos (3-fenil-2-propen-1-ol) denominados alcohol cumarílico (4-hidroxicinamílico), alcohol coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamílico) y alcohol sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamílico) los cuales a su vez son los precursores de las unidades 4-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S) de la lignina (Figura 1.10). Estos alcoholes se sintetizan a partir de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina y L-tirosina durante el metabolismo primario de plantas. La lignina, junto con la celulosa y hemicelulosa forman parte de la lignocelulosa, componente mayoritario de la pared celular vegetal, donde tiene funciones cementantes entre las células de la pared aportando así rigidez, e hidrofóbicas, evitando la penetración del agua. El polímero de lignina presenta una alta variabilidad estructural en función de las proporciones de unidades H, G y S que contenga. Esa variabilidad dependerá no sólo de la especie y tejido sino también del tipo de planta. Así las unidades de tipo G predominan en la lignina de gimnospermas, mientras que angiospermas presentan cantidades equivalentes de unidades

G y S. De igual modo el contenido en lignina varía de unas plantas a otras como en el caso de coníferas donde su contenido en lignina es superior al de árboles de hoja caduca (Faravelli *et al.*, 2010). Las distintas unidades de la lignina se unen por distintos tipos de enlaces, siendo los más abundantes los de tipo aril-éter como el β -O-4 (Nimz, 1974), presente hasta en un 60 % en la molécula (Balakshin *et al.*, 2009). Otros enlaces son de tipo β -1, β - β , 4-O-5, α -O-4 y 5-5'. La gran presencia de enlaces de tipo éter permite la unión de unidades no fenólicas que junto con el resto de enlaces intermonoméricos proporcionan una elevada resistencia a la lignina frente a procesos de biodegradación.

No obstante, el descubrimiento de compuestos de bajo peso molecular capaces de penetrar en la molécula de la lignina actuando sobre unidades no fenólicas y por tanto, haciendo a la lignina más susceptible de ser degradada, fue un paso determinante para la búsqueda de mecanismos de oxidación indirectos por las enzimas ligninolíticas, basados en la producción de los anteriormente citados agentes oxidantes.

Entre estos compuestos se encuentran radicales de metabolitos fúngicos como el alcohol veratrílico (Harvey *et al.*, 1986), iones metálicos oxidados (Martínez, 2002) y radicales libres de oxígeno, tales como, superóxido, hidroxilo y radicales peroxilo y alcoxilo (Hammel *et al.*, 2002). Como consecuencia de la catalización de la oxidación de las tres unidades de la lignina por parte de las lacasas, se generan estos agentes degradativos en forma de radicales libres. Estos radicales, debido a su inestabilidad, desencadenarán una serie de reacciones sucesivas dando lugar a nuevos radicales intermediarios como los derivados del oxígeno que provocarán la rotura de enlaces y despolimerización de la lignina (Schoemaker, 1990). También pueden darse oxidaciones o reducciones de los productos de despolimerización de la lignina generando otros radicales, los cuales potenciarán la acción de las lacasas si actúan como radicales oxidantes (Baiocco *et al.*, 2003).

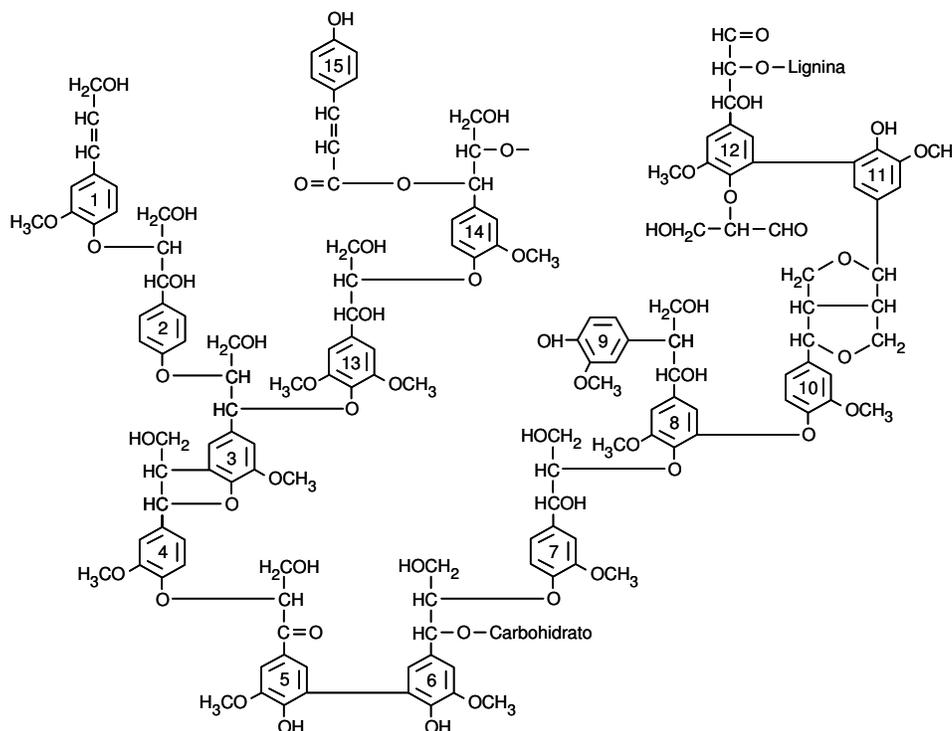
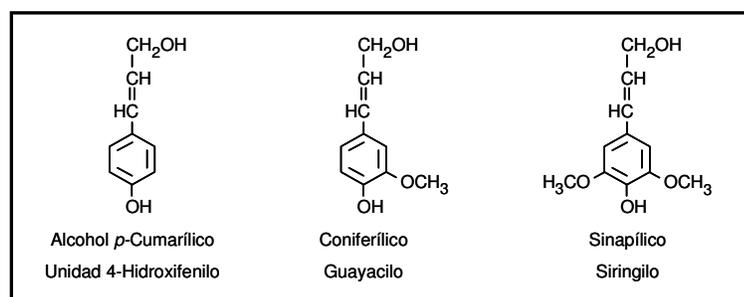


Figura 1.10. Alcoholes precursores de la lignina y modelo estructural del polímero, basado en el propuesto por Adler (1977).

Los productos resultantes del proceso de despolimerización de la lignina son ácidos y aldehídos aromáticos y quinonas, así como sus productos de reacción (hidroquinonas y alcoholes aromáticos). Este método de oxidación indirecto en el que los mediadores actúan como puentes de oxidación entre la enzima y el sustrato, expandiendo la actividad catalítica de la misma hacia la degradación de moléculas más complejas y compuestos recalcitrantes, es lo que se conoce como sistema enzima-mediador (Figura 1.11). Entre las cualidades que un mediador ideal debería poseer serían su bajo coste para que así resulte económica su utilización, que no resulte tóxico, tener un tamaño relativamente pequeño, generar radicales estables en su forma oxidada que no inactiven a la enzima y cuya reactividad

permita su reciclado sin ser degradado (Morozova *et al.*, 2007b; Cañas y Camarero, 2010).

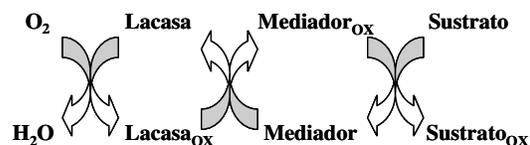


Figura 1.11. Representación esquemática de la actividad catalítica de la lacasa para la oxidación indirecta de compuestos no fenólicos en presencia de compuestos mediadores (Bourbonnais y Paice, 1990).

1.3.1. Los sistemas lacasa-mediador

Desde el descubrimiento en 1990 del ABTS, primer compuesto susceptible de actuar como

mediador para la oxidación de compuestos no fenólicos, el rango de compuestos sustratos de la lacasa capaces de actuar como puentes de electrones entre la enzima y sustratos más complejos o de naturaleza no fenólica, ha aumentado considerablemente en los últimos años. Así se descubrieron otros compuestos como el 1-hidroxibenzotriazol (HBT), el ácido violúrico (VLA) o el radical de tipo nitroxilo, 2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-N-oxil (TEMPO), altamente eficientes en la degradación de compuestos aromáticos recalcitrantes (Call y Mucke, 1997; Srebotnik y Hammel, 2000; Xu *et al.*, 2000; Fabbrini *et al.*, 2001; Cañas y Camarero, 2010). Más recientemente se han sumado las fenilpirazolonas como mediadores en la oxidación de xenobióticos (Shleev *et al.*, 2004). Estos mediadores han demostrado su gran utilidad en aplicaciones como bioblanqueo de pastas de papel (García *et al.*, 2003), degradación de lignina (Srebotnik y Hammel, 2000) o decoloración de colorantes textiles (Claus *et al.*, 2002). Asimismo, se ha descrito la capacidad de iones metálicos tales como el Mn^{2+} o de polioxometalatos de actuar como mediadores en la degradación de lignina (Shleev *et al.*, 2004; Gamelas *et al.*, 2007)

Sin embargo, a pesar de la probada eficiencia de estos sistemas lacasa-mediador, la utilización de estos compuestos artificiales presenta ciertas desventajas. Entre ellas cabe destacar, el elevado coste de dichos compuestos así como su toxicidad y producción de especies tóxicas. Por este motivo, se hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos mediadores económicos y que no resulten tóxicos para el medioambiente.

En este sentido, se descubrió que ciertos metabolitos de hongos podían ser utilizados como mediadores naturales. Así, en el hongo *Pycnoporus cinnabarinus* se describió la producción del ácido 3-hidroxiantranílico capaz de mediar en la oxidación de sustratos no fenólicos y despolimerización de lignina sintética (Eggert *et al.*, 1996b). Otros mediadores provenientes de metabolitos fúngicos como el ácido 4-hidroxibenzoico y el alcohol 4-hidroxibencílico han puesto de manifiesto su capacidad para participar junto con la lacasa en la oxidación de

hidrocarburos aromáticos policíclicos (Johannes y Majcherczyk, 2000). Otros compuestos derivados de la degradación de la lignina, como son la acetosiringona, el siringaldehído o el siringato de metilo han demostrado su eficiencia en la degradación de distintos colorantes textiles y tintas junto con lacasas bacterianas y fúngicas (Camarero *et al.*, 2005; Moya *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2011; Fillat *et al.*, 2012).

Otras aplicaciones en las cuales los mediadores naturales han demostrado su utilidad han sido en el bioblanqueo de pastas de papel (Arias *et al.*, 2003; Camarero *et al.*, 2007; Aracri *et al.*, 2009; Eugenio *et al.*, 2011), degradación de fungicidas (Maruyama *et al.*, 2007), insecticidas (Tran *et al.*, 2013) y contaminantes emergentes (Marco-Urrea *et al.*, 2010a), tales como, disruptores endocrinos (Majeau *et al.*, 2010; Bibi *et al.*, 2011), fármacos y productos de cuidado personal (Hata *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013).

1.3.2. Especies reducidas de oxígeno y ciclos redox de quinonas

La acción oxidativa de las lacasas sobre un compuesto genera un radical libre, que cuando se comporta como agente reductor, puede desencadenar una transferencia seriada de electrones al oxígeno que actúa como aceptor electrónico, pudiendo quedar éste en forma libre generando los radicales superóxido (O_2^-), hidroperoxilo (HO_2^-) e hidroxilo ($\cdot OH$) o unido a un compuesto orgánico formando en este caso los radicales peroxilo (RO_2^-) y alcoxilo ($RO\cdot$). Todos estos radicales son los denominados Radicales Libres del Oxígeno (RLO) (Figura 1.12). El O_2^- es el producto de reducción monovalente del O_2 . El producto de reducción divalente del O_2 es el H_2O_2 , el cual puede ser generado a partir del O_2^- mediante dismutación. Como resultado de la reducción del O_2 por tres electrones se genera el radical hidroxilo, el más reactivo de los RLO con un potencial redox de 2,8 V.

Asimismo, este radical puede ser generado a partir de la reducción del H_2O_2 por el O_2^- por un proceso catalizado por metales quelantes

como el Fe^{3+} en la que se conoce como reacción de Haber-Weiss:

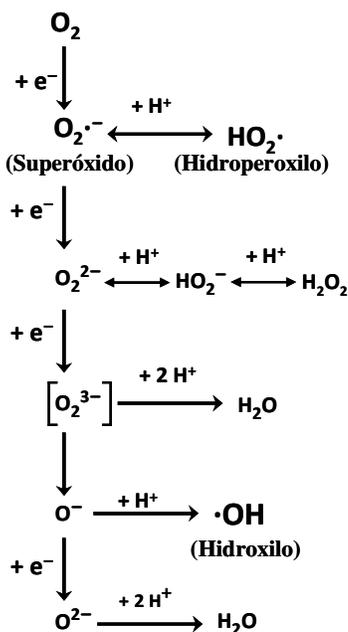
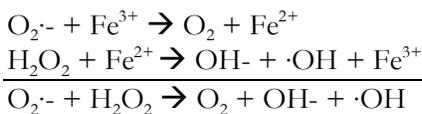


Figura 1.12. Especies reactivas del oxígeno generadas durante su reducción seriada por un electrón hasta agua (Adaptado de Halliwell y Gutteridge, 1999).

Uno de los mecanismos de producción de radical hidroxilo ampliamente distribuido entre los seres vivos es mediante la reducción de H_2O_2 por el Fe^{2+} , proceso conocido como reacción de Fenton. El radical hidroxilo es un agente lignocelulolítico como así se ha demostrado en distintos estudios (Joseleau *et al.*, 1994). Los radicales superóxido e hidroperoxilo pueden participar en la degradación de lignocelulosa generando agentes ligninolíticos de bajo peso molecular ($\cdot\text{OH}$ y Mn^{3+}), los cuales actuarán oxidando o reduciendo respectivamente estructuras difenólicas y quinónicas. Asimismo, pueden cooperar con enzimas ligninolíticas suministrándoles sustratos o reaccionando con sus productos directos de oxidación (radicales fenoxilo y catión aromático).

La producción de dichas especies reactivas del oxígeno ha sido demostrada en numerosos

estudios *in vitro* mediante la utilización de enzimas ligninolíticas de microorganismos implicados en la degradación de lignina (Tanaka *et al.*, 1999a; Tanaka *et al.*, 1999b). La generación de los radicales libres de oxígeno puede ser llevada a cabo por prácticamente la totalidad de las enzimas implicadas con la degradación de lignina, junto con productos de degradación de la misma, iones metálicos presentes y metabolitos del microorganismo.

Las enzimas ligninolíticas más importantes son la lignina peroxidasa, la manganeso peroxidasa, la peroxidasa versátil y la celobiosa deshidrogenasa, además de las lacasas incorporadas en último lugar a este grupo (Schoemaker, 1990; Mason *et al.*, 2002; Brown y Chang, 2014).

El conjunto de tecnologías y procesos físico-químicos que se basan en la producción de radicales altamente reactivos se conocen como “Procesos de oxidación avanzada” (POA) (Glaze *et al.*, 1987). Entre ellos están el reactivo de Fenton, Fotofenton, la fotocatalisis heterogénea, la fotocatalisis homogénea, la utilización de ozono (O_3), la combinación O_3/UV y $\text{O}_3\text{-H}_2\text{O}_2$, oxidación anódica, etc (Andreozzi *et al.*, 1999; Kraft *et al.*, 2003; Gogate y Pandit, 2004; Pignatello *et al.*, 2006). Los POA han sido aplicados en el tratamiento de aguas residuales y efluentes de papeleras, en la degradación de fármacos, colorantes y disruptores endocrinos, entre otros (Andreozzi *et al.*, 1999; Kos y Perkowski, 2000; Balcioglu *et al.*, 2003; Suty *et al.*, 2004; Bokhari *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2013; Rasalingam *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2014).

Para la producción de radicales hidroxilo mediante las enzimas ligninolíticas se han descrito dos mecanismos. Uno de ellos, puesto de manifiesto con la lignina peroxidasa del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, requiere un suministro de H_2O_2 para la actuación de la enzima y una oxidación secuencial de dos metabolitos fúngicos para la generación del radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Barr *et al.*, 1992). A continuación, este radical superóxido interviene en una reacción de Fenton donde catalizará el paso de Fe^{3+} a Fe^{2+} y cuyo producto final será la generación de radicales hidroxilo. Por el

contrario, el segundo mecanismo descrito en *Pleurotus eryngii* presenta cierta ventaja al tratarse de un proceso mucho más sencillo ya que solo requiere la presencia de una hidroquinona y Fe^{3+} convenientemente quelado (Guillén *et al.*, 2000a). En esta reacción, las semiquinonas producidas por la lacasa actúan como radicales primarios que reducen al O_2 , desencadenando así la generación de radicales secundarios, como el $\cdot\text{OH}$, capaces de oxidar la lignina y otros compuestos aromáticos. Se consigue de este modo, la producción extracelular de $\cdot\text{OH}$ mediante un ciclo redox de quinonas catalizado por reductasas intracelulares y enzimas ligninolíticas (Guillén *et al.*, 1997; Gómez-Toribio *et al.*, 2009a). Las etapas que conforman este ciclo de quinona tal como se muestran en la Figura 1.13 serían las siguientes:

1. Reducción de quinona (Q) a hidroquinona (QH_2) por una quinona reductasa (QR) intracelular.
2. Oxidación de la QH_2 a semiquinona ($\text{Q}\cdot^-$) por la lacasa.
3. Conversión de la $\text{Q}\cdot^-$ en Q mediante una autooxidación, con la consiguiente reducción del O_2 a $\text{O}_2\cdot^-$.
4. Reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} por la $\text{Q}\cdot^-$ (4a) y $\text{O}_2\cdot^-$ (4b).
5. Producción de H_2O_2 mediante la dismutación del $\text{O}_2\cdot^-$.

6. Producción de $\cdot\text{OH}$ a través de la reacción de Fenton.

El ciclo redox de quinonas ha sido demostrado utilizando las quinonas más representativas de las unidades de la lignina como son, la 1,4-benzoquinona (BQ), 2-metoxi-1,4-benzoquinona (MBQ) y 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DBQ). El ciclo redox de quinonas se ha demostrado también en otras especies de hongos, tales como, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Plebia radiata*, *Trametes versicolor* (Gómez-Toribio *et al.*, 2009b) y *Coryolopsis rigida*, todos ellos hongos de podredumbre blanca productores de enzimas ligninolíticas y *Gloeophyllum trabeum* de podredumbre parda.

Los mayores niveles de producción de radical hidroxilo se obtuvieron en aquellos hongos productores de lacasas.

La producción de radicales hidroxilo mediante ciclos redox de quinonas se ha utilizado para la degradación de contaminantes de distinta naturaleza, entre los que cabe mencionar, el colorante textil Reactive Black 5 por *Pleurotus eryngii* (Gómez-Toribio *et al.*, 2009a), hidrocarburos clorados (Marco-Urrea *et al.*, 2009; Vilaplana *et al.*, 2012), BTEX (Aranda *et al.*, 2010) y fármacos (Marco-Urrea *et al.*, 2010b; Marco-Urrea *et al.*, 2010c), entre otros.

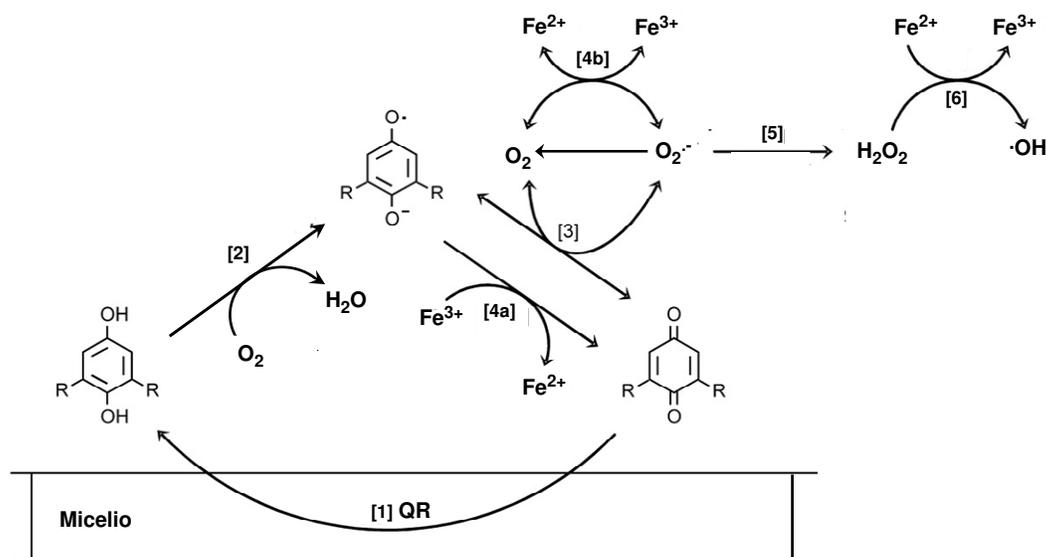


Figura 1.13. Generación de radicales hidroxilo mediante el ciclo redox de quinonas (adaptado de Gómez-Toribio *et al.*, 2009a).

1.4. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas

Aunque existen en el mercado distintas preparaciones de lacasas disponibles para su aplicación en distintas áreas biotecnológicas, continúa la búsqueda de otras nuevas que respondan a la demanda cada vez más amplia de biocatalizadores que resistan condiciones extremas y que cumplan con los cánones de regulación medioambiental.

Hasta el momento, las lacasas han demostrado su aplicabilidad en distintos campos industriales, tales como, la industria papelera, la industria textil, la industria alimentaria, en biorremediación, en síntesis orgánica y más recientemente en nanobiotecnología (Rodríguez-Couto y Herrera, 2006; Kunamneni *et al.*, 2008). Las lacasas son consideradas enzimas “ahorradoras de energía” que junto con su biodegradabilidad las convierten en biocatalizadores idóneos para ser utilizados en industrias altamente eficientes, sostenibles y respetuosas con el medio ambiente. Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofrecen estas enzimas, aún hay que vencer ciertos impedimentos para su aplicación, siendo uno de los más importantes su coste de producción. La producción de grandes cantidades de lacasa se hace necesaria en ciertas aplicaciones industriales como la biorremediación. Para solventar este problema se plantea la posibilidad de utilizar residuos agrícolas y/o alimentarios, o efluentes industriales como sustrato para los microorganismos productores de estas enzimas y así disminuir su coste de producción. Asimismo, es importante tener en cuenta el proceso de optimización de la producción de estas enzimas, generalmente desarrollado a escala de laboratorio, con vistas a su posterior aplicación a nivel industrial.

1.4.1. Industria papelera

La producción de papel es un proceso complejo con alta demanda de energía y en el que se generan grandes volúmenes de contaminantes (Pokhrel y Viraraghavan, 2004). Uno de los problemas a los que aún se enfrenta esta industria es la eliminación de la lignina presente

en la materia prima de partida, polímero recalcitrante que rodea al entramado formado por la celulosa y la hemicelulosa, dificultando el acceso a esta última.

Una de las etapas fundamentales en la fabricación del papel es el pasteado de la madera o residuo lignocelulósico, para la degradación y/o eliminación de la lignina, proceso que habitualmente se lleva a cabo en la industria mediante métodos físicos o químicos. El pasteo físico, basado en fragmentaciones mecánicas de los tejidos, supone un considerable gasto energético, mientras que los procesos químicos, basados en la despolimerización parcial y solubilización de la lignina, utilizan tradicionalmente oxidantes artificiales que resultan en muchos casos contaminantes para el medioambiente (Weinstock *et al.*, 1996). Tras el proceso de pasteo es necesaria la aplicación de una serie de secuencias de blanqueo con el fin de eliminar la lignina residual que aporta un color pardo o amarillento a la pasta de celulosa y conseguir así un aumento en la blancura de la misma. Tras este proceso de blanqueo, se liberan grandes cantidades de lignina en los efluentes industriales, cuyo tratamiento y eliminación supone un alto coste (Zhang *et al.*, 2002). Es precisamente en el proceso de blanqueo de las pastas y en el tratamiento de efluentes derivados de estas industrias, donde las lacasas y los sistemas lacasa-mediador presentan ventajas como una alternativa a los procesos físicos (pasteado mecánico) y químicos antes mencionados. De hecho, se ha comprobado que los sistemas lacasa-mediador (LMS) presentan una especificidad sobre las fracciones fenólicas y no fenólicas de la lignina mayor que el de otras enzimas utilizadas en el proceso de bioblanqueo de pastas de celulosa, como las xilanasas (Bajpai *et al.*, 2006).

Hasta el momento, las lacasas fúngicas han sido objeto de numerosos estudios debido a su alto potencial redox y elevada actividad enzimática (Cho *et al.*, 2004). Sin embargo, la mayor parte de las lacasas fúngicas presentan ciertas limitaciones en cuanto a su estabilidad en condiciones extremas y su dificultad de manipulación genética dado el carácter eucariota de sus productores, lo cual supone un

estímulo para continuar la búsqueda de nuevas enzimas en microorganismos procariotas. En este sentido, las lacasas bacterianas se muestran como una alternativa interesante a las lacasas fúngicas, aunque son menos activas (Kunamneni *et al.*, 2008). No obstante, en los últimos años se han conseguido en nuestro grupo de investigación resultados positivos en la etapa de bioblanqueo de pastas kraft con las lacasas producidas por algunas cepas de actinobacterias junto con mediadores de oxidación, como es el caso de *S. cyaneus* (Arias *et al.*, 2003) y *S. ipomoea* (Eugenio *et al.*, 2011) poniéndose de manifiesto la alteración de la estructura de la lignina por acción de estos sistemas. Estos resultados son comparables a los obtenidos con lacasas fúngicas utilizadas en conjunción con mediadores sintéticos o naturales (Camarero *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2006; Moldes *et al.*, 2008; Fillat *et al.*, 2010).

Cabe destacar la existencia de empresas que ya comercializan productos basados en el sistema LMS para su aplicación a la industria papelera, como es el caso de Lignozym® (Call y Mucke, 1997) o MetZyme® de la empresa finlandesa MetGen, entre otras, mostradas en la Tabla 1.2.

Otras aplicaciones en las que se ha comprobado la utilidad de las lacasas y de los sistemas LMS han sido en el reciclado de papel (Schmid y Urlacher, 2007), o modificación de la lignina para mejorar sus propiedades físicas y químicas (Lund y Ragauskas, 2001) o en el tratamiento de efluentes de la industria papelera (Widsten y Kandelbauer, 2008).

1.4.2. Industria textil

La industria textil es una de las más importantes a nivel mundial, pero se debe tener en cuenta que la cantidad de sustancias químicas que se utilizan en el proceso de tinción y lavado de las fibras hace que los efluentes de estas fábricas viertan una cantidad considerable de compuestos perjudiciales para el medio ambiente. Los tintes usados antiguamente en la industria textil poseían un origen natural como la hematita o el ocre. Sin embargo, gracias al descubrimiento en 1865 de la estructura molecular del benceno, la producción de colorantes sintéticos experimentó un gran avance y desde entonces, han sido sintetizados más de 100.000 tintes en el mundo. Muchos de los tintes utilizados en la industria textil son tóxicos y/o mutagénicos para los seres vivos (dos Santos *et al.*, 2007). Sin tratamientos

Tabla 1.2. Preparados comerciales de lacasas disponibles para su uso industrial.

	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)
	Deslignificación de pasta de papel. Biopasteo.	MetZyme	MetGen (Finland)
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 (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)

adecuados, pueden permanecer estables en los ecosistemas durante largos periodos de tiempo, como es el caso del Reactivo Blue 19 con una vida media de 46 años a una temperatura de 25 °C y un pH de 7. De ahí la necesidad de desarrollar tratamientos eficaces capaces de eliminar los distintos tintes utilizados y evitar de ese modo su persistencia en el medio ambiente. Otro problema añadido es la cantidad de agua, muchas veces potable, requerida por este tipo de industrias. Por tanto, la reutilización de las mismas sería un requisito indispensable que debería ser solventado.

Los tintes industriales poseen una estructura molecular formada por grupos cromóforos responsables del color y grupos de átomos ionizables llamados auxocromos capaces de modificar la intensidad del cromóforo. Hay varios tipos de cromóforos como grupos vinilo (-C=C-), carbonilo (-C=O-), ciano (-CH=N-), azo (-N=N-), nitrito (-NO₂) y estructuras de tipo quinona. Los auxocromos más característicos son los radicales carboxilo (-COOH), hidroxilo (-OH), sulfonato (-SO₃H) y amonio (-NH₃) (Figura 1.14). Los colorantes o tintes usados en la industria textil pueden ser clasificados en función de su origen, propiedades químicas o físicas o su estructura química, entre otros. Atendiendo sólo a su estructura química podemos establecer entre 20-30 tipos de tintes entre los que destacan los de tipo azo, índigo, antraquinona, triarilmetano

y heterociclo. Estos compuestos tienen una gran afinidad por las fibras textiles sobre las cuales se adhieren mediante uniones covalentes e interacciones electrostáticas. Pueden formar grupos reactivos en un ambiente alcalino, como el vinil sulfónico, que enlazan con las fibras. Sin embargo, estos grupos reactivos pueden hidrolizarse y perder su afinidad por las fibras ante la presencia de agua, siendo así liberados en los efluentes industriales. Por tanto, los colorantes utilizados en las industrias textiles suponen un porcentaje significativo (10-20%) de los contaminantes presentes en las aguas residuales. Como ya se ha comentado, la degradación de estos contaminantes exige la puesta a punto de tratamientos complejos, debido a su carácter recalcitrante y a su heterogeneidad estructural.

Además, otro problema añadido a la eliminación de estos contaminantes, es el hecho que en las condiciones anaerobias inherentes a los tratamientos de depuración convencional de aguas, los colorantes de tipo azo van a dar lugar a la formación de aminas aromáticas por la reducción del enlace azo característico. La presencia en las aguas de muchas de estas aminas aromáticas, como la *o*-toluidina y la de tipo aminobifenil está prohibida ya en algunos países como Alemania, por tratarse de sustancias altamente tóxicas y considerarse potencialmente carcinógenas (Tauber *et al.*, 2005). Para evitar la formación de estas aminas

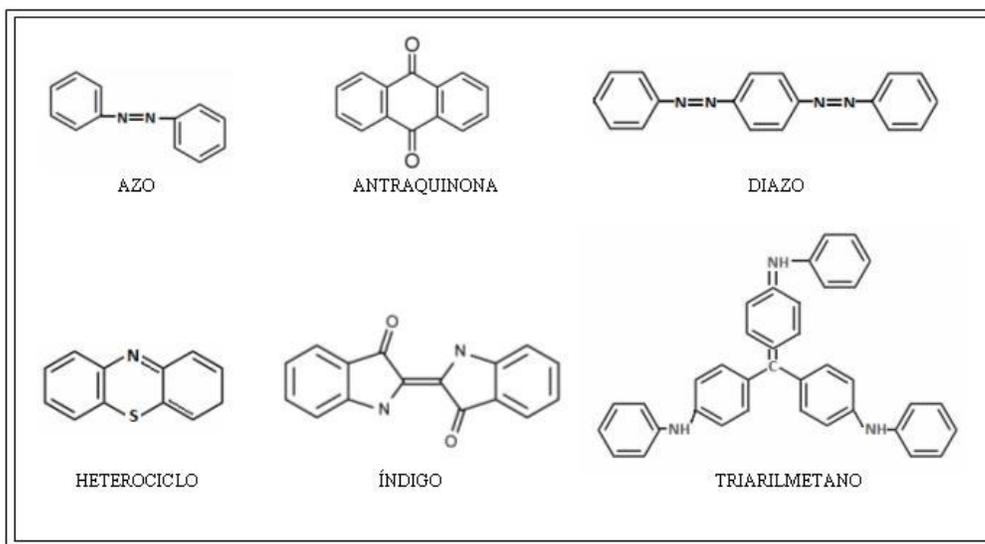


Figura 1.14. Estructura química básica de los colorantes textiles más comunes.

aromáticas, se hace imprescindible la búsqueda de nuevos métodos de degradación de tipo oxidativo que resulten eficaces para la eliminación de los colorantes de tipo azo presentes en los efluentes industriales, y cuyo efecto sea extensible a la degradación de otros tintes de distinta naturaleza.

Aunque existen técnicas para el tratamiento de aguas residuales que contengan tintes textiles, no resultan ventajosas debido a su baja efectividad y alto coste. Las lacasas nuevamente han demostrado ser una alternativa prometedora en la decoloración de efluentes industriales y el blanqueo de textiles. Su baja especificidad de sustrato favorece su rango de acción sobre colorantes de distinta naturaleza y estructura ya sea de manera directa o indirecta mediante sistemas LMS. Mucho se ha profundizado en este tema y varios son los estudios sobre degradación de tintes textiles con microorganismos (Rodríguez *et al.*, 1999; Abadulla *et al.*, 2000; Nerud *et al.*, 2004), sus enzimas oxidativas, ya sean lacasas, peroxidases, etc (Ben Younes y Sayadi, 2013; Guan *et al.*, 2014) o una combinación de tratamiento biológico con distintas técnicas físico-químicas.

1.4.3. Biorremediación

Debido a la semejanza estructural entre muchos compuestos contaminantes y el polímero de lignina las lacasas y los sistemas LMS pueden ser aplicados también en la degradación de una gran variedad de contaminantes recalcitrantes derivados de las actividades industriales y persistentes en el medio ambiente. Entre ellos encontramos Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH), BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno), bifenilos policlorados (PCB) conocidos por tener efectos carcinógenos y mutagénicos.

Como resultado de la actividad industrial grandes cantidades de energía y material se liberan en forma de emisiones y efluentes al medioambiente. El progreso de la población junto con la diversificación de los procesos industriales, hace que un elevado número de

compuestos contaminantes y material orgánico sean liberados a la atmósfera, ecosistemas y cursos de agua.

En los últimos años, gracias al desarrollo de técnicas más sensibles y precisas se ha revelado la presencia de nuevos fármacos y contaminantes en suelos y aguas potables (Rigol *et al.*, 2002), anteriormente indetectables por las técnicas tradicionales debido a su baja concentración (de 1 ng L^{-1} a unos pocos $\mu\text{g L}^{-1}$) (Larsson *et al.*, 2007). Cabe destacar, que a pesar de la baja concentración de estos contaminantes emergentes tales como antibióticos, disruptores endocrinos o analgésicos (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009), no sólo suponen un impacto para los ecosistemas acuáticos y el medio ambiente, sino también un peligro para la salud de la población con incidencia en la génesis de enfermedades mentales, esterilidad o aumentos de la incidencia de cáncer (Takahashi y Hashimoto, 2001; Kolpin *et al.*, 2002). Incluso, se ha descrito el efecto de estos fármacos sobre la inducción fágica (Ingrey *et al.*, 2003). Así, se ha demostrado recientemente que la presencia de fármacos tales como las fluoroquinolonas en aguas, es capaz de inducir procesos de conversión fágica, causando la transformación de la microflora habitual de las aguas residuales en patógenos peligrosos (Goerke *et al.*, 2006). El anti-epiléptico Carbamazepina no produce efectos tóxicos en la microbiota de las aguas epicontinentales; sin embargo, en presencia de otros compuestos contaminantes podría suponer un peligro para la vida acuática (Joss *et al.*, 2003).

Actualmente, varios métodos son empleados en la descontaminación de este tipo de compuestos contaminantes. Varias de las técnicas utilizadas son físico-químicas tales como adsorción de fangos, fotodegradación u ozonización. Otras tecnologías entre las que destacan la humificación (Bollag, 1992) para la descontaminación de suelos y técnicas biológicas como floculación, coagulación o filtración para la biorremediación en aguas residuales, mostraron no ser lo suficientemente efectivas en la eliminación de los contaminantes principalmente fármacos. No obstante, estas técnicas físico-químicas

presentan la desventaja de necesitar considerables cantidades de energía e inversión. Por lo tanto, se hace necesaria la búsqueda de nuevas y efectivas estrategias de descontaminación de aguas residuales. Entre ellas, aquellas que implican microorganismos ligninolíticos han cobrado un gran interés. Asimismo, con la aplicación de los anteriormente citados procesos de oxidación avanzada, se han obtenido elevados niveles de eliminación de contaminantes orgánicos (Fink *et al.*, 2012). Algunos de los compuestos contaminantes y xenobióticos pueden ser degradados o inmovilizados con otras sustancias no tóxicas como los ácidos húmicos por las lacasas y los sistemas LMS (Durán y Espósito, 2000). La capacidad degradativa de estas enzimas se extiende sobre hidrocarburos aromáticos policíclicos (Böhmer *et al.*, 1998; Bressler *et al.*, 2000; Johannes y Majcherczyk, 2000; Pointing, 2001; Torres *et al.*, 2003), disruptores endocrinos (Raghukumar, 2000; Tanaka *et al.*, 2001), clorofenoles (Bollag *et al.*, 2003) y fármacos (Lloret *et al.*, 2010; Marco-Urrea *et al.*, 2010a; Marco-Urrea *et al.*, 2010b) que a pesar de la baja biodegradabilidad que presentan algunos de ellos como las fluoroquinolonas, algunos microorganismos como hongos han demostrado su capacidad para degradarlas (Martens *et al.*, 1996) como es el caso de *Trametes versicolor* tanto el microorganismo en sí como su lacasa en presencia de mediadores (Prieto *et al.*, 2011).

1.4.4. Industria alimentaria

La aplicación de las lacasas en el sector alimentario está cobrando cada vez más importancia. La presencia en los alimentos de carbohidratos, ácidos grasos insaturados, fenoles o proteínas con grupos tiol y su modificación por estas enzimas puede conllevar a una mejora de los alimentos aportando una nueva funcionalidad o reduciendo los costes de producción (Minussi *et al.*, 2002).

Entre las aplicaciones en las que puede tomar parte la lacasa destaca la mejora en la calidad del sabor de vegetales eliminando el oxígeno disuelto y evitando así posibles oxidaciones (Kunamneni *et al.*, 2008), eliminación de olores

o la mejora o modificación del color en ciertos alimentos y bebidas. Dentro de las bebidas, las lacasas han sido utilizadas en procesos de clarificación del vino eliminando los fenoles y evitando la aparición de turbidez y alteraciones en el sabor y aroma (Servili *et al.*, 2000), en el estabilizado de zumos de frutas (Alper y Acar, 2004) o en la mejora de la vida media de la cerveza (Minussi *et al.*, 2002) al oxidar polifenoles presentes en la misma y eliminar el oxígeno residual tras el proceso de producción. En cuanto a los alimentos, se ha descrito que la adición de lacasas a la masa favorece las propiedades organolépticas del pan mejorando la textura y esponjosidad (Renzetti *et al.*, 2010). También estas enzimas oxidativas han contribuido a una mejora en el aroma y sabor del cacao y productos derivados (Osma *et al.*, 2010).

Asimismo, las lacasas han demostrado su utilidad no solo en el procesado de alimentos y bebidas sino también en el tratamiento de materiales relacionados con el almacenamiento de los mismos, como en el proceso de producción del corcho de embotellado donde estas enzimas disminuyen la astringencia y contaminación de los mismos (Xu, 2005), evitando de este modo la posterior contaminación de los vinos, así como el tratamiento de los efluentes generados por esta industria (Chiacchierini *et al.*, 2004). Los efluentes generados por las industrias cerveceras contienen grandes cantidades de polifenoles. Yagüe *et al.* (2000) pusieron de manifiesto la capacidad de la lacasa de *Coriopolis gallica* para degradar estos polifenoles. Otras lacasas fúngicas también han demostrado su utilidad en la descontaminación de efluentes generados tras la molienda de la oliva o en la producción de etanol a partir de la caña de azúcar (Brijwani *et al.*, 2010).

1.4.5. Síntesis química

Las lacasas no solo están implicadas en reacciones de oxidación sino también en síntesis y polimerización. Así, a partir de sustratos fenólicos y aminas las lacasas pueden formar dímeros, oligómeros o polímeros mediante acoplamiento de los intermediarios

radicálicos (Riva, 2006). Se han descrito en la síntesis de compuestos de interés clínico como antibióticos y antiinflamatorios (Agematu *et al.*, 1993a; Agematu *et al.*, 1993b; Nicotra *et al.*, 2004; Riva, 2006); en la producción *in situ* de yodo utilizado como desinfectante (Xu, 2005); en la inhibición de la retrotranscriptasa inversa del virus HIV-1 (Wang y Ng, 2004). También dentro de la industria cosmética estas enzimas han encontrado utilidad en la fabricación de tintes para el cabello que son menos irritantes (Xu, 2005) y en la producción de cremas aclaradoras de la piel (Rodríguez-Couto y Herrera, 2006).

Otra de las aplicaciones de las lacasas está relacionada con la síntesis de ligninas sintéticas (Moya *et al.*, 2011), de compuestos orgánicos (Uyama y Kobayashi, 2002), colorantes (Mustafa *et al.*, 2005) o péptidos (Semenov *et al.*, 1993). La aplicación de estas enzimas oxidativas en la química de polímeros contribuirá en la mejora de industrias al aumentar la disponibilidad de materias primas renovables disminuyendo el uso de combustibles fósiles, reduciendo los niveles de energía requeridos para estos procesos y posibilitando la creación de nuevos procesos de síntesis de compuestos imposibles de generas con las tecnologías químicas convencionales (Nyanhongo *et al.*, 2012).

1.4.6. Nanotecnología

El avance de la nanotecnología en distintos campos como medioambiente, medicina, industria, hace de esta tecnología una de las más importantes actualmente a nivel global. La nanotecnología ofrece una novedosa y prometedora herramienta en distintas aplicaciones como el tratamiento de aguas naturales superficiales, subterráneas y de efluentes industriales contaminados con metales tóxicos, materia orgánica e inorgánica y microorganismos; creación de biosensores o producción de células de biocombustible.

Un biosensor es una sonda con un componente biológico incorporado que a través de un transductor electrónico es capaz de convertir una señal bioquímica en una

respuesta eléctrica cuantificable aportando información sobre cambios bioquímicos o fisiológicos (Kunamneni *et al.*, 2008). La utilidad de las lacasas en este sector se ve favorecida gracias a su habilidad para catalizar reacciones de transferencia sin necesidad de cofactores y a la capacidad de actuación sobre un amplio rango de compuestos fenólicos. Estas características hacen de las lacasas perfectos biosensores capaces de detectar gran variedad de compuestos como catecoles en té (Palmore y Kim, 1999; Guo *et al.*, 2014), compuestos fenólicos en vino o ligninas y fenoles en efluentes industriales (Giovannelli y Ravasini, 1993), oxígeno (Gardiol *et al.*, 1996) opiáceos (Bauer *et al.*, 1999; Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2005). De igual modo, las lacasas pueden formar parte de biosensores junto con otras enzimas lo que permite ampliar el rango de detección de sustratos aumentando su sensibilidad (Freire *et al.*, 2002).

La capacidad de las lacasas para usar el oxígeno como sustrato y reducirlo hasta agua resulta provechosa para su uso en las células de biocombustibles. Estas enzimas inmovilizadas en el cátodo de las células de biocombustibles proporcionan una energía limpia especialmente a pequeña escala lo que resulta interesante desde el punto de vista medioambiental.

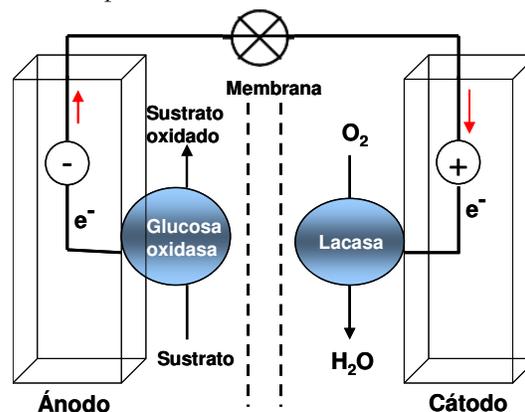


Figura 1.15. Representación esquemática de un ejemplo de una célula de biofuel (tomado de Kunamneni *et al.*, 2008).

Una célula de este tipo está formada por dos electrodos: un ánodo que obtiene electrones de un sustrato reducido (azúcar o alcohol) y un cátodo que transfiere los electrones a un sustrato oxidado como el O_2 . Ambos

electrodos contienen enzimas como la glucosa oxidasa o la lacasa, inmovilizadas en nanoestructuras (Figura 1.15). Las reacciones conjuntas de oxidación del sustrato de la glucosa oxidasa (azúcar o alcohol) y reducción oxígeno por la lacasa genera una fuente de energía. Las células de combustible basadas en

la utilización de enzimas como la lacasa resultan particularmente interesantes en medicina para la monitorización de pacientes ya que podría controlarse enfermedades como la diabetes (Heller, 2004) o para el suministro de medicamentos (Ivanov *et al.*, 2010).

Planteamiento del trabajo y Objetivos

2. Planteamiento del trabajo y objetivos

Esta tesis se enmarca dentro de la línea prioritaria del grupo de investigación dirigido por la Dra. M^a Enriqueta Arias Fernández, en el área de Microbiología de la Universidad de Alcalá, que desde hace varios años trata de contribuir a la elucidación de los mecanismos enzimáticos y del papel que desempeñan los radicales tóxicos del oxígeno en la degradación de lignocelulosa por actinobacterias, con vistas a su aplicación biotecnológica y/o medioambiental. Más recientemente, el potencial degradativo de estos microorganismos y/o de sus enzimas se está dirigiendo a la eliminación de contaminantes ambientales.

El descubrimiento por nuestro grupo de la primera lacasa descrita en *Streptomyces* (Berrocal *et al.*, 1997; Arias *et al.*, 2003), condujo a su caracterización y al escrutinio de sus aplicaciones biotecnológicas. En este sentido, se demostró la capacidad de este microorganismo para solubilizar y mineralizar lignocelulosa (Berrocal *et al.*, 1997), así como para llevar a cabo la degradación parcial de la lignina de paja de trigo (Berrocal *et al.*, 2000). Posteriormente, se puso de manifiesto la capacidad de la lacasa producida por este microorganismo para el bi blanqueo de pastas kraft de eucalipto (Arias *et al.*, 2003; Arenas, 2004), así como para la degradación de tintes textiles mediante sistemas lacasa-mediador (Moya *et al.*, 2010).

Paralelamente, se ha llevado a cabo la caracterización físico-química y molecular de la lacasa nativa producida por la cepa *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 (Molina-Guijarro *et al.*, 2009), cuyo potencial biotecnológico ha sido demostrado en el bi blanqueo de pastas de papel (Eugenio *et al.*, 2011). Entre las características físico-químicas de esta enzima cabe destacar su amplia especificidad de sustrato en función del pH, de tal forma que a pH ácido es capaz de oxidar ABTS y ferrocianuro mientras que a pH alcalino oxida preferentemente compuestos fenólicos y animas aromáticas. Asimismo, resulta interesante su gran estabilidad a pH alcalino,

así como su amplia tolerancia a elevadas concentraciones de cloruro sódico (hasta 1 M) y a compuestos considerados inhibidores de lacasas como la azida sódica (10 mM) y EDTA (100 mM). Estas características abren perspectivas para su aplicación en las condiciones extremas que con frecuencia se dan en los procesos industriales y/o en distintos ambientes contaminados con compuestos de difícil erradicación.

El interés de esta enzima nos ha conducido a plantear el trabajo que se presenta, cuyos objetivos se detallan a continuación:

1. Producción y caracterización físico-química y cinética de la lacasa recombinante SilA de *Streptomyces ipomoea*.
2. Optimización de sistemas SilA-mediador para la degradación de contaminantes industriales y emergentes.
3. Demostrar la capacidad de *S. ipomoea* para producir radicales hidroxilo mediante ciclos redox de quinonas.
4. Validar la utilidad del ciclo redox de quinonas establecido en *S. ipomoea* para degradar contaminantes industriales y emergentes.
5. Evaluar la toxicidad de los contaminantes de partida y de los productos de degradación obtenidos por ambos sistemas oxidativos.
6. Elucidar la función biológica de SilA mediante la comparación de la cepa silvestre con un mutante no productor de la enzima.

Materiales y Métodos

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Microorganismos utilizados

3.1.1.1. *Streptomyces*

Para la realización de este trabajo se utilizó la cepa de *Streptomyces ipomoea* aislada en nuestro laboratorio a partir de residuos agrícolas (Centenera, 1997). Esta cepa se encuentra depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso 3341.

3.1.1.2. *Escherichia coli*

Las distintas cepas utilizadas de este microorganismo, su genotipo y aplicación, se muestran en la Tabla 3.1.

3.1.2. Mantenimiento y conservación de los microorganismos

La cepa *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 se mantuvo en cultivo puro en placas de medio GAE mediante resiembras periódicas. Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C hasta alcanzar un adecuado grado de desarrollo y la esporulación del micelio (5-7 días). Para su conservación durante largos períodos de tiempo, se obtuvieron suspensiones de esporas con glicerol al 20 % (v/v) a partir de cultivos bien esporulados. Las esporas se mantuvieron congeladas a -20 °C. Para el mantenimiento de las distintas cepas de *Escherichia coli* 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 su conservación durante largos periodos de tiempo, se utilizaron suspensiones de las cepas en glicerol al 20 % (v/v) que se guardaron congeladas a -80 °C.

3.1.3. Medios de cultivo

3.1.3.1. Medios para *Streptomyces*

- Agar Bennet (Locci *et al.*, 1969). Utilizado para el mantenimiento, 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 el mantenimiento y recuperación de *Streptomyces ipomoea*, así como para los estudios de viabilidad, pigmentación y morfogénesis. Composición:
 - 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

Tabla 3.1. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo

Cepa	Aplicación	Genotipo
DH10B (Invitrogen)	Preparaciones de plásmidos y clonación de fragmentos de ADN	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-bsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL nupG</i> λ ⁻
BL21 (DE3) (Invitrogen)	Sobreexpresión de proteínas recombinantes	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)
DH5α TM -T1 ^R (Invitrogen)	Clonación de productos de amplificación obtenidos por PCR	F-Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i>
Top10 (Invitrogen)	Clonación de productos de amplificación obtenidos por PCR	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-bsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>
ET12567 (pUB307) (Flett <i>et al.</i> , 1997)	Cepa deficiente en Dam metilasa utilizada en experimentos de conjugación interespecífica	F- <i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR recF143, zji-201::Tn10 gal/K2 gal/T22 ara14 lacY1, xyl5 leuB6 thi1 tonA31 rpsL 136 hisG4 tsx78, mtl, glnV44 Kmr</i>

experimentos de ciclo redox de quinonas. 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.

Para la producción de actividad lacasa, este medio fue además suplementado con asparagina (2 g L⁻¹), manano (10 g L⁻¹) y sulfato de cobre 100 µM.

- SM (Soja-Manitol) (Hobbs *et al.*, 1989).

Utilizado para el mantenimiento y recuperación de *Streptomyces ipomoea* para la producción de la lacasa nativa y 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 para *E. coli*

- LB (Caldo de lisogénesis) (Bernati, 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 super 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. Medios para *E. coli* y *S. ipomoea*

- MA (Medio A) (Sánchez y Braña, 1996).

Medio utilizado para la recuperación de transconjugantes tras la conjugación interespecífica entre *E. coli* ET12567 y *S. ipomoea* CECT 3341. 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

- Kanamicina

Antibiótico utilizado para seleccionar bacterias portadoras de plásmidos que confieren resistencia a este antibiótico, como es el caso de pET28a utilizado para la sobreexpresión de la lacasa, así como para el crecimiento de la cepa ET12567 resistente a este antibiótico. Se añadió en el caso de *E. coli* a una concentración final de 25 µg mL⁻¹ y para *Streptomyces* a 10 µg mL⁻¹.

- 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.

- Apramicina

Antibiótico utilizado para seleccionar bacterias portadoras de plásmidos que confieren

resistencia a este antibiótico, como es el pOJ260 utilizado en los experimentos de obtención del mutante. 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. En el proceso de transformación, numerosos plásmidos contienen el gen codificante de esta enzima en el sitio de clonación múltiple característica 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.

- Tampón fosfato I: ácido fosfórico 10 mM. Ajustar con NaOH hasta alcanzar el pH deseado. Empleado en la mayoría de métodos que requieren un pH neutro o ligeramente alcalino.

- Tampón fosfato II 8x. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 138 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 22 mM; NaCl 4M.

Ajustar con NaOH hasta un pH de 7,4. Empleado en la purificación de la lacasa recombinante.

- 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. Empleado en la obtención de proteínas totales durante los experimentos de sobreexpresión.

3.1.4.2. Tampones utilizados para 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 % (p/v); azul de bromofenol al 0,01 % (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).

3.1.4.3. Tampones utilizados para la electroforesis de ADN

- TAE 1x (Sambrook y Russell, 2001): Tris 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA pH 8 1 mM. El pH final de la solución es 8,5 aproximadamente. Para su uso rutinario se preparó un stock 50x.

- TBE 0.5X (Sambrook y Russell, 2001): Tris 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1

mM pH 8. Para su uso rutinario se prepara un stock 5 veces concentrado.

- Tampón de carga 5x: EDTA pH 8 100 mM; azul de bromofenol 0,25 % (p/v); xileno cianol 0,25 % (p/v); glicerol 30 % (v/v).

3.1.4.4. Tampones utilizados para la preparación de células competentes

- RF1: RbCl 100 mM; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 50 mM; acetato potásico 30 mM; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10 mM; glicerol al 15 %. Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M y esterilizar por filtración.

- RF2: MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 75 mM; glicerol al 15 %. Ajustar el pH a 6,8 con NaOH y esterilizar por filtración.

3.1.4.5. Tampones utilizados para la purificación de la lacasa recombinante

- Tampón de unión: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 10 mM; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 10 mM; NaCl 500 mM; Imidazol 20 mM. Ajustar con HCl a un pH final de 7,4.

- Tampón de unión 2x: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 20 mM; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 20 mM; NaCl 1 M; Imidazol 40 mM. Ajustar con HCl a un pH final de 7,4.

- Tampón de elución: $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 10 mM; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 10 mM; NaCl 500 mM; Imidazol 250 mM. Ajustar con HCl a un pH final de 7,4.

3.1.5. Determinaciones analíticas

3.1.5.1. pH

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

3.1.5.2. Cuantificación 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 de 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 $\mu g mL^{-1}$.

3.1.5.3. Valoración de la actividad lacasa

3.1.5.3.1. 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 (2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]). La oxidación del ABTS se monitorizó por el aumento de absorbancia a 436 nm en 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 para el ABTS a 436 nm es de $29.300 M^{-1} cm^{-1}$.

3.1.5.3.2. Asociada a micelio

Para determinar la actividad lacasa asociada al micelio de *S. ipomoea*, el micelio lavado se resuspendió en matraces de 100 ml con 20 ml de tampón acetato 50 mM pH 4,5 con 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 μ M. 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. Valoración de la producción de radicales hidroxilo

La valoración de los radicales 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, 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 $\cdot\text{OH}$, a 500 μ L de muestra (en algunos casos fue necesario la dilución de la misma) se añadieron 250 μ L de ácido tricloroacético (preparado al 2,8 % (p/v) en agua) y 250 μ L de ácido tiobarbitúrico (preparado al 1 % en NaOH (p/v) 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 recombinante de *Streptomyces ipomoea* CECT 3341

La producción de la lacasa recombinante de *S. ipomoea*, así como su posterior purificación, se realizó según el protocolo descrito previamente por nuestro grupo de investigación (Molina-Guijarro *et al.*, 2009).

3.2.1. Producción de la enzima recombinante

La producción de la enzima comenzó con la transformación de células competentes de *E.coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET28a que contenía el gen de la lacasa (ATC). A continuación, las células transformadas se

sembraron en placas de LB suplementadas con Kanamicina (25 μ g mL⁻¹) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Al día siguiente se inoculó un matraz con 40 mL de LB suplementado con Kanamicina (25 μ g mL⁻¹) con 4 o 5 colonias de las placas de transformación y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (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 del medio LB con Kanamicina (25 μ g mL⁻¹) que se inocularon con 4 mL del preinóculo anterior y se cultivaron a 37 °C y 200 rpm. Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento se cambió su temperatura de incubación a 28 °C, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a esta temperatura durante 2 horas.

Transcurridas las 2 horas, las células se recogieron por centrifugación a 12000 g a 4 °C durante 10 minutos. El sedimento obtenido se lavó con PBS y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Las células recogidas se guardaron congeladas a -20 °C hasta su procesamiento.

Para obtener la proteína recombinante de la fracción citoplasmática soluble, las células se resuspendieron en 50 μ L de tampón fosfato I 10 mM pH 7, previamente enfriado a 4 °C, por cada mL inicial de cultivo. A continuación, las células se rompieron utilizando una prensa French® (Sim-Aminco) tras tres pases a 1500 PSIG, enfriando previamente el cilindro y recogiendo el lisado celular en un tubo inmerso en hielo. Finalmente, se centrifugó el lisado a 15000 g a 4 °C durante 10 minutos, separando el sobrenadante que contenía la enzima soluble de los restos celulares precipitados.

3.2.2. Obtención de la forma activa de la enzima recombinante

Al extracto crudo obtenido tras la ruptura de las células de *E. coli* inducidas, se le añadió sulfato de cobre hasta una concentración de 1 mM, con el fin de que la proteína captase el cobre necesario para completar su centro activo y con ello conseguir que la enzima

recombinante tuviese actividad. El extracto obtenido se incubó con el cobre durante 3 horas en hielo y transcurrido el tiempo se introdujo en una bolsa de diálisis y se dializó a 4 °C frente a 5 L de tampón fosfato I 10 mM, pH 7, durante una noche, con el fin de eliminar el exceso de cobre que no se hubiese unido a la proteína. La muestra dializada y tamponada se guardó congelada a -20 °C hasta su purificación.

3.2.3. Purificación de la enzima recombinante por cromatografía de afinidad

Para la purificación de la lacasa recombinante se utilizaron columnas His GraviTrap (GE Healthcare). Son columnas de gravedad que poseen una matriz cargada con iones Ni^{2+} que se unen selectivamente a las histidinas presentes en la superficie de las proteínas; las proteínas recombinantes obtenidas con el vector pET28a presentan una cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal, lo que incrementa notablemente la afinidad por el níquel haciendo que las proteínas se retengan con mayor intensidad que el resto de las contenidas en el extracto de *E. coli*. Esto permite purificar rápidamente la proteína recombinante en pocos pasos. La elución de las proteínas de la columna se consiguió empleando una fase móvil con una cantidad apropiada de imidazol, molécula que compite y desplaza las proteínas de la matriz adheridas, al tratarse de una molécula idéntica a la cadena lateral del aminoácido histidina. El imidazol también se añade, a una baja concentración, a la propia muestra que se va a cargar en la columna, con el fin de minimizar la unión de proteínas no deseadas que presenten cierta afinidad con la matriz.

La fase móvil utilizada para la purificación de la proteína recombinante fue tampón fosfato II 1x pH 7,4 suplementado con imidazol 10 mM. La muestra que se pretendía purificar fue diluida en proporción 1:1 con el tampón anterior doblemente concentrado, con el fin de dejar la muestra en la misma fase móvil utilizada. Las proteínas se separaron utilizando un tampón fosfato II 1x suplementado con imidazol 750 mM.

3.2.4. Concentración y diálisis de las fracciones cromatográficas

Una vez purificada la proteína recombinante, el volumen eluido de las columnas de níquel se dializó empleando una columna “PD-10 Desalting column” (GE Healthcare), con el fin de eliminar el exceso de imidazol del tampón de elución. Para ello se utilizó tampón fosfato III. Cuando fue preciso concentrar las muestras se utilizaron los sistemas de ultrafiltración Amicon 15K (Milipore).

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.

Tabla 3.2. Composición de un gel SDS-PAGE

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 μ l
Persulfato amónico 10 % (p/v)	50 μ l
TEMED	10 μ l
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 μ l
Persulfato amónico 10 % (p/v)	50 μ l
TEMED	10 μ l

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 tener una solución al 30 % (p/v). La composición completa de la mezcla para la formación de los geles (para 10 ml de mezcla) se muestra en la Tabla 3.2. Las muestras se

mezclaron con el tampón de carga en una proporción 1:1 para ser aplicadas a los geles. Cuando se quisieron desnaturalizar las proteínas por completo se le añadió a la mezcla β -mercaptoetanol al 5 % (v/v) y se hirvió durante 10 minutos.

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 proporción 30:60:10, dejándolo en agitación suave hasta que las bandas del gel se visualizaran claramente.
- *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. Zimogramas

3.3.2.2.1. Ensayo de actividad lacasa.

Para la detección de actividad lacasa en los geles de poliacrilamida una vez realizada la electroforesis, el gel se aclaró dos veces con agua destilada durante tres minutos para eliminar restos de sales y a continuación, se

sumergió en una solución de ABTS a una concentración de 5 mM, preparado en tampón acetato 200 mM pH 4,5. Se mantuvo en la solución hasta la aparición de bandas de color verde correspondientes a las bandas de proteína con actividad lacasa.

3.3.2.2.2. Ensayo de actividad mananasa.

La detección de actividad β -mananasa en los geles de poliacrilamida fue realizada siguiendo el método descrito por Béguin (1983). Tras haber realizado la electroforesis en condiciones nativas se superpuso una lámina de agarosa al 1,5 % (p/v) de 1 mm de espesor que contenía manano (LBG) 0.1 % (p/v) en tampón fosfato a pH 8. Ambos geles se incubaron a 45 °C durante 15-30 minutos. Transcurrido el tiempo, el gel de agarosa se retiró y se tiñó con una solución de Rojo Congo (0.5 mg mL^{-1}) y posteriormente se lavó con NaCl 1 M (Teather y Wood, 1982). El Rojo Congo es un colorante específico de polisacáridos. Cuando éstos son hidrolizados, el Rojo Congo no se fija a ellos y por tanto, tras lavar con la solución salina, aparecen bandas de hidrólisis fácilmente identificables al estar desteñidas.

3.4. Caracterización de la lacasa recombinante SilA

3.4.1. Determinación del potencial redox

Para la determinación del potencial de óxido-reducción de SilA se llevó a cabo una potenciometría o titulación redox. Para ello, en una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud con un agitador magnético en el fondo se colocó una mezcla compuesta por la enzima SilA en tampón fosfato 10 mM pH 8 y diferentes mediadores con potenciales redox conocidos, según se muestra en la Tabla 3.3

Los ensayos se realizaron con un electrodo de plata/cloruro de plata, calibrado con una solución saturada de quinhidrona 1 M a pH 7. La potenciometría se realizó a 25 °C y pH 7 bajo una atmósfera de argón. Como compuesto oxidante se utilizó

hexacloroiridato de potasio y como agente reductor ditionito de sodio. SilA fue monitorizada mediante espectrofotometría en el rango del visible (300-700 nm).

Tabla 3.3. Mediadores usados en la titulación redox.

Mediadores	Potencial (mV)
Dimetil-p-fenilendiamina	+340
Ferrocianuro de sodio	+433
Ácido ferroceno monocarboxílico	+530
1,1'-ácido ferroceno dicarboxílico	+644
Fe (II/III) Tris-1,10-fenantrolina	+1070

3.4.2. Termoestabilidad cinética.

Para estimar la termoestabilidad cinética de SilA, preparaciones de la enzima purificada se incubaron a distintas temperaturas (70, 80 y 95 °C) durante 24 h, monitorizando a distintos tiempos de incubación y en cada una de las temperaturas ensayadas, la estabilidad de la actividad enzimática, así como de la conformación nativa de la proteína mediante el grado de precipitación de la misma.

3.4.3. Estabilidad térmica y química

La estabilidad térmica y química de SilA se determinó mediante espectroscopía de fluorescencia. Para ello, se sometió la enzima a dos agentes caotrópicos, como son, la temperatura y cloruro de guanidinio. Para la realización de estos ensayos, la estabilidad termodinámica fue analizada mediante fluorescencia de estado estacionario con un espectrofotómetro de fluorescencia ISA Horiba acoplado a un peltier LF1-3751 (Wavelength Electronic), usando longitudes de onda de excitación de 280 y 296 nm y de emisión de 340 nm.

La estabilidad térmica de una proteína viene determinada por la energía libre de estabilización (energía de Gibbs), la cual refleja diferencias entre las energías libres del estado nativo y desnaturalizado. Asimismo, la estabilidad térmica de la proteína viene determinada por su temperatura de desdoblamiento (T_m). Para conocer los cambios conformacionales de SilA frente a los agentes caotrópicos utilizados, se calcularon

los valores de entalpía (ΔH_{T_m}) y entropía (ΔS_{T_m}) y a partir de estos valores se pudo calcular la energía libre de Gibbs (ΔG_{T_m}) mediante la ecuación de Van't Hoff, donde T es la temperatura en ° Kelvin.

$$\Delta G_{T_m} = \Delta H_{T_m} - T\Delta S_{T_m}$$

Para llevar a cabo el ensayo de desnaturalización térmica, preparaciones de SilA ($Abs_{296}=0.1$) en tampón fosfato 10 mM pH 8 se sometieron a un aumento progresivo de la temperatura de 20 a 100 °C con incrementos de 1 °C min^{-1} . A partir de estos ensayos se intentaba determinar la temperatura de desdoblamiento (T_m) de la enzima.

En el ensayo de desnaturalización proteica por agentes químicos la determinación de la estabilidad de la enzima se estimó de modo indirecto a partir del valor de la energía libre de Gibbs en ausencia de agente desnaturalizante, esto es determinando la energía libre de Gibbs del disolvente (ΔG_{water}), cuyo valor aumenta a mayor estabilidad de la proteína. Este valor se obtuvo mediante la siguiente ecuación donde m es una constante de proporcionalidad relacionada con el área apolar de la enzima que queda expuesta al disolvente una vez que se inicia la desnaturalización y $[GndHCl]$ es la concentración de cloruro de guanidinio.

$$\Delta G^0 = \Delta G_{water}^0 + m[GndHCl]$$

El estudio de la estabilidad química de la enzima frente a cloruro de guanidinio se realizó sometiendo a la enzima a concentraciones crecientes de cloruro de guanidinio (GndHCl) a una temperatura constante de 25 °C. Representando la energía libre de Gibbs (ΔG^0) frente a la concentración del agente desnaturalizante, se obtiene una recta cuya ordenada en el origen expresa la energía libre de Gibbs en ausencia de agente desnaturalizante (ΔG_{water}^0), parámetro que indica el grado de estabilidad proteica (Pace, 1990; Sánchez, 2009).

El análisis de la estabilidad térmica y química de SilA se realizó utilizando las ecuaciones descritas por Durão *et al* (2006).

3.5. Ensayos conducentes a la cristalización de SilA

Previamente a la cristalización de la enzima, es necesario conocer las características del tampón adecuado en el cual la enzima presenta un alto porcentaje de solubilización mediante el procedimiento denominado “Thermal shift assay”. Se trata de un ensayo de termodesnaturalización para monitorizar la estabilidad térmica de las proteínas a investigar y los factores que afectan a dicha estabilidad. El principio se basa en usar un colorante fluorescente como Spyro Orange, el cual en medios acuosos normales no emite fluorescencia. Con el aumento progresivo de la temperatura, la enzima en solución comienza a desnaturalizarse exponiendo sus regiones hidrofóbicas. Es en este momento cuando el colorante Spyro comienza a unirse a estas regiones emitiendo fluorescencia. En una placa especial de 96 pocillos se prepararon series de distintos tampones con distintas concentraciones de sales o aditivos. Los diferentes tampones utilizados que abarcaban un rango de pH de 4.5 a 9 se muestran en la Tabla 3.5 y los aditivos añadidos a los distintos tampones se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Tampones utilizados en la técnica “Thermal shift assay”

Tampón (100 mM)

Acetato de sodio
Citrato de sodio
Fosfato potásico
Fosfato de sodio
Mes
Cacodilato de sodio
Hepes
Acetato amónico
Tris
Imidazol
Bicina

A cada pocillo de la placa se añadió una alícuota de una mezcla de 2 µg de la enzima SilA con Spyro Orange 50 x en tampón

fosfato 10 mM pH 8. A continuación, se selló la placa con una lámina de sellado de PCR (Bio-Rad) y se introdujo en un sistema de detección iCycler iQ5 de PCR a tiempo real (Bio- Rad), en el cual se produce un aumento progresivo de la temperatura desde 20 hasta 100 °C con incrementos de 1 °C min⁻¹. El cambio en la intensidad de fluorescencia se monitorizó a través de una cámara CCD con longitudes de onda de excitación a 490 y de emisión a 575 nm.

3.6. Optimización del sistema lacasa-mediador

3.6.1. Evaluación de posibles mediadores

Para la optimización del sistema lacasa-mediador se llevó a cabo un estudio con distintos compuestos naturales relacionados con la estructura de la lignina que podrían ser susceptibles de actuar como mediadores en la acción oxidativa de la enzima. Los compuestos ensayados fueron alcohol 4-hidroxibencílico, ácido 4-hidroxibenzoico, alcohol vainillílico (alcohol 4-hidroxi-3-metoxibenzil), vainillina (2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), ácido vainílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico), acetovainillona (4'-hidroxi-3'-metoxiacetofenona), ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico), alcohol siringílico (alcohol 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzílico), siringaldehído (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldehído), ácido siringico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico), acetosiringona (3',5'-dimetoxi-4'-hidroxiacetofenona), siringato de metilo (metil 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato) y 4'-hidroxiacetofenona. Así, se prepararon distintas mezclas de reacción en tampón fosfato 50 mM pH 8 con los distintos compuestos a una concentración final de 0,5 mM y en presencia de 0,4 U de SilA, tomando muestras a distintos tiempos (0, 2, 4 y 24 h). Los productos de reacción fueron posteriormente analizados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para valorar la idoneidad de los diferentes compuestos para ser buenos sustratos de la lacasa mediante la formación de sus correspondientes quinonas.

Tabla 3.5. Aditivos utilizados en la técnica “Thermal shift assay”

Aditivo	Concentración (mM)	Aditivo	Concentración (mM)
FAD	2.5	Fructosa	5
NAD	5	Glucosa	5
NADH	5	Manosa	5
NADP	5	GDP	5
NADPH	10	ATP	5
FeCl ₂	15	UTP	5
ZnCl ₂	10	Glicerol	10 %
MgAc	15	Lisina	5
MnCl ₂	15	Glicina	10
CuCl ₂	15	Fenilalanina	10
CoCl ₂	15	Prolina	5
NiCl ₂	15	Ácido vainílico	10
CaAc	15	Protoporfirina	10
Galactosa	10		

3.6.1.1. Análisis de los productos de oxidación por cromatografía líquida de alta eficacia asociada a detector de díodos (HPLC-DAD)

El análisis cromatográfico de los productos resultantes del tratamiento de oxidación de los posibles mediadores con SilA se llevó a cabo en un HPLC 1260 Infinity Binary (Agilent) equipado con una columna ACE C18-PFP (2.1 x 50 mm, ACE) acoplado a un detector de díodos (DAD). Como fase móvil se utilizó ácido fórmico al 1 %. Los distintos analitos se eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 100 % de acetonitrilo con un flujo de 1 mL min⁻¹ y con una temperatura de columna de 30 °C. Alícuotas de 2 µL de cada muestra fueron inyectadas a través de un auto-inyector Agilent 1200 Infinity. Los perfiles cromatográficos de elución se obtuvieron mediante la realización de espectros en intervalos de 1 s entre 800 y 200 nm. 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 mediadores y sus correspondientes quinonas. Para este fin, se utilizaron los cromatogramas correspondientes a cada una de las longitudes de onda características de cada compuesto.

3.6.2. Selección de la concentración óptima de mediador y de la temperatura de ensayo

Con objeto de aumentar la capacidad oxidativa del sistema lacasa-mediador se realizaron distintos ensayos de degradación de algunos

colorantes con concentraciones diferentes del mediador o mediadores seleccionados (0.1, 0.3 y 0.5 mM). Asimismo, se valoró la posibilidad de mejorar los rendimientos del sistema incubando la mezcla de degradación a tres temperaturas diferentes (35, 60 y 95 °C).

3.7. Establecimiento de ciclos redox de quinonas

3.7.1. Determinación de las actividades quinona reductasa y lacasa asociadas al micelio de *S. ipomoea* y producción de radicales hidroxilo

Para producir radicales hidroxilo mediante el ciclo redox de quinonas, es necesaria la presencia de actividades 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 µL de una suspensión de esporas que contenía 10⁸ ufc mL⁻¹. Los cultivos se incubaron en agitación a 150 rpm a 28 °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 10 mM pH 8. La medida de las actividades quinona reductasa y lacasa se llevó a cabo según lo descrito en los apartados 3.1.5.3.2 y 3.1.5.4, respectivamente.

Paralelamente y para comprobar si el micelio de *S. ipomoea* 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 10 mM pH 7 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 μM y la 2,6-DBQ 1,2 mM. Asimismo, se añadió la 2-desoxirribosa (2,8 mM) como sonda para detectar el radical hidroxilo (ver apartado 3.1.5.5). 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.

3.7.2. Efecto de los radicales hidroxilo sobre la viabilidad del microorganismo

Con objeto de comprobar el efecto de los radicales hidroxilo sobre el micelio de *Streptomyces ipomoea*, se llevó a cabo un estudio de viabilidad del microorganismo sometido a ciclos redox de quinona valorando su capacidad de crecimiento posterior en placas que contenían los medios de cultivo SM y GAE. Para ello, se llevó a cabo un recuento de microorganismos viables a distintos tiempos de incubación, tanto en ausencia (control positivo) como en presencia de quinona y Fe^{3+} , inoculando diferentes porciones de micelio en el medio SM. Asimismo, se realizó también un control negativo con el microorganismo inactivado por calor sometido a ciclos redox de quinonas completos. Transcurrido el tiempo de incubación adecuado, se realizó un recuento de viables teniendo en cuenta el número de porciones que fueron capaces de esporular y formar micelio vegetativo. El factor de viabilidad se estableció por comparación con los viables aislados de incubaciones control en medios de cultivo carentes de quinona y Fe^{3+} .

3.8. Evaluación del potencial degradativo del sistema lacasa-mediador

Una vez producida y purificada la enzima según el apartado 3.2, se evaluó su capacidad tanto en ausencia como en presencia de compuestos mediadores, para degradar distintos contaminantes ambientales de naturaleza recalcitrante, como los tintes textiles y de los considerados emergentes, como los fármacos.

3.8.1. Decoloración de tintes textiles

En primer lugar se llevó a cabo un ensayo de la capacidad de SilA y del sistema SilA-mediador para decolorar colorantes textiles de distinta naturaleza tales como: antraquinona, azo, diazo, heterociclo y triarilmetano. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando 400 mU mL^{-1} de enzima en tampón fosfato 50 mM pH 8 y con el colorante a una concentración final de 50 μM . Como mediadores se utilizaron 3 compuestos fenólicos relacionados con la estructura de la lignina: siringaldehído, acetosiringona y siringato de metilo. La mezcla de todos los componentes se incubó a 35 °C durante 24 horas midiendo la absorbancia a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 4 y 24 h. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y como control se prepararon mezclas de reacción con la enzima inactivada por calor. La capacidad de la lacasa para decolorar estos colorantes textiles se analizó mediante la monitorización del descenso de la absorbancia a la longitud de onda característica de cada uno de ellos a lo largo del tiempo. Para determinar el máximo de absorción en el visible de cada uno de los colorantes se realizó un espectro de absorción entre 400 y 800 nm en un espectrofotómetro Hitachi modelo U-2001. Los resultados se expresaron en concentración (μM) a partir de los coeficientes de extinción molar calculados. Posteriormente, los productos de degradación fueron analizados mediante HPLC, con el fin de estudiar en mayor detalle el rendimiento del tratamiento enzimático.

3.8.2. Degradación de fármacos

Por otro lado, se realizaron ensayos de degradación de distintos fármacos: Carbamazepina y dos fluoroquinolonas, Ciprofloxacina y Norfloxacina. Las reacciones

se llevaron a cabo en tampón fosfato 50 mM pH 8 utilizando 400 mU mL⁻¹ de enzima y añadiendo el fármaco a una concentración final de 400 μM. Como mediadores se utilizaron siringaldehído, acetosiringona y siringato de metilo. La mezcla de todos los componentes se incubó a 35 °C durante 24 horas midiendo la absorbancia a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 4 y 24 h. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y como control se prepararon mezclas de reacción con la enzima inactivada por calor. La capacidad de la lacasa para degradar estos compuestos se analizó mediante HPLC.

3.8.3. Análisis de los controles y de los productos de oxidación por cromatografía líquida de alta eficacia asociada a detector de diodos (HPLC-DAD)

El análisis cromatográfico de los productos de degradación de los distintos contaminantes se llevó a cabo en un HPLC 1260 Infinity Binary (Agilent) equipado con una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 50 mm, 1.8-Micron, 600 bar, Scharlau) acoplado a un detector de diodos (DAD). Los productos se eluyeron con un flujo isocrático de una fase móvil compuesta por 40 % metanol y 60 % ácido acético 10 mM. Los análisis se realizaron a un flujo de 1 mL min⁻¹ con una temperatura de columna de 30 °C. Alícuotas de 2 μL de cada muestra fueron inyectadas a través de un auto-inyector Agilent 1200 Infinity. Los perfiles cromatográficos de elución se obtuvieron mediante la realización de espectros en intervalos de 1 s entre 800 y 200 nm. Para la cuantificación de los productos, se realizaron curvas patrón mediante la integración del área del pico cromatográfico correspondiente a

concentraciones conocidas de los distintos colorantes, fármacos y mediadores (controles). Para este fin, se utilizaron los cromatogramas correspondientes a cada una de las longitudes de onda características de cada compuesto.

3.9. Evaluación del potencial degradativo de los radicales ·OH

3.9.1. Optimización de la producción de radicales hidroxilo mediante ciclos 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 ml de una suspensión estandarizada de esporas de *S. ipomoea* mantenidas en glicerol al 20 % (v/v). Estos matraces se incubaron a 28 °C en agitación durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, el micelio de cada uno de los matraces se filtró y lavó con dos volúmenes de agua destilada. A continuación, el micelio filtrado y lavado se dividió a razón de 1 L de medio de cultivo para 15 reacciones de “redox cycling” de 30 mL cada una. Para determinar los factores que promueven la producción de radical hidroxilo, se incubó el micelio del microorganismo en tampón fosfato 100 mM pH7 en presencia de DBQ y Fe³⁺ quelado con EDTA. En todos los casos 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 ·OH. Las soluciones de cloruro férrico, se prepararon justo antes de ser utilizadas. En la Tabla 3.6, se detalla la mezcla de reacción en mL para cada una de las condiciones estudiadas.

Tabla 3.6. Composición de las mezclas control y problema utilizadas para la inducción de radicales ·OH

Componente	Volumen (mL)		Concentración final
	Control	Problema	
Tampón fosfato 100 mM pH 7	6	6	20 mM
2,6-DBQ 1,2 mM		15	500 μM
EDTA 22 mM-FeCl ₃ 20 mM		0.3	110 μM-100 μM
2-desoxirribosa 140 mM	0.6	0.6	2.8 mM
Agua miliQ	23.4	8.1	
Micelio (mg)			

3.9.2. Ensayos de degradación de tintes textiles y fármacos

Una vez optimizado el proceso de producción de $\cdot\text{OH}$ mediante ciclo redox de quinonas, se evaluó la eficacia de este sistema para la degradación de distintos colorantes textiles y fármacos. Para ello, se prepararon las mezclas de reacción para el ensayo degradativo de los tintes (Tabla 3.7) y de los fármacos (Tabla 3.8)

Tabla 3.7. Mezcla de reacción para la degradación de colorantes textiles mediante ciclos redox de quinonas.

Componente	Volumen (mL)	
	Control	Problema
Tampón fosfato 500mM pH 7	1.2	1.2
2,6-DBQ 1,2 mM		15
EDTA 22 mM-FeCl ₃ 20 mM		0.3
Colorante 1 mM	1.5	1.5
Agua miliQ	27.3	12
Micelio (mg)		

Las concentraciones finales de los colorantes y de los fármacos fueron de 50 μM . Los matraces control y problema se incubaron en agitación a 28 °C en oscuridad. Se recogieron muestras de 1 mL a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 4 y 24 horas. Los productos de reacción fueron analizados por HPLC.

Tabla 3.8. Mezcla de reacción para la degradación de fármacos mediante ciclos redox de quinonas.

Componente	Volumen (mL)	
	Control	Problema
Tampón fosfato 500 mM pH 7	1.2	1.2
2,6-DBQ 1,2 mM		15
EDTA 22 mM-FeCl ₃ 20 mM		0.3
Fármaco 1 mM	12	12
Agua miliQ	4.8	1.5
Micelio (mg)		

Asimismo, los productos resultantes de los ensayos de decoloración fueron analizados mediante espectrofotometría. Los resultados se expresaron en concentración (μM) a partir de los coeficientes de extinción molar calculados.

3.10. Análisis de toxicidad

El análisis de la toxicidad tanto de los compuestos de partida utilizados (colorantes y fármacos) como de los productos de degradación tras su tratamiento con el sistema

lacasa-mediador o con los radicales hidroxilo, se analizó mediante dos métodos distintos. Por un lado, el grado de toxicidad fue determinado mediante el sistema Microtox® (Azur Environmental) de acuerdo a la norma ISO/TC 147/SC 5. Este sistema está basado en la disminución de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* por acción de sustancias tóxicas. Todos los ensayos se llevaron a cabo a un pH entre 6.0 y 8.0 y a una temperatura de 15 °C. La concentración de la muestra que inhibe el 50 % de la bioluminiscencia emitida tras 5 o 15 minutos de periodo de exposición (EC_{50}) fue automáticamente calculada mediante el software MicrotoxOmni suministrado con el sistema Microtox. El grado de toxicidad se expresó como $(1/\text{EC}_{50}) * 100$.

El segundo análisis toxicológico realizado se llevó a cabo mediante el empleo del alga *Pseudokirchneriella subcapitata* de acuerdo a la directriz OCED n° 201 (OECD, 1984), usando el sistema Algaltokit FTM (Microbiotests, BE). El stock de algas se incubó a 24 ± 1 °C en condiciones uniformes de iluminación (10000 lux para una iluminación lateral o 3000-4000 lux mínimo para una iluminación basal) hasta que se alcanzó una densidad de algas de 10^6 células mL^{-1} , suficiente para preparar el inóculo. A continuación, se hicieron diluciones seriadas de cada compuesto a analizar desde 50 a 5 μmL^{-1} en el caso de las quinolonas y desde 50 a 5 mM para los colorantes, tanto de los controles como de los productos de reacción tras 24 h de tratamiento enzimático. Cada dilución se inoculó con una suspensión de algas suficiente para obtener 10^4 células mL^{-1} . Las muestras se incubaron en las mismas condiciones de iluminación y temperatura de indicadas anteriormente, durante 72 h. Diariamente se determinó el crecimiento las algas mediante absorbancia a 670 nm extrapolando a una curva patrón suministrada por Microbiotests BE. Los valores de EC_{50} se calcularon de acuerdo a la directriz 201 (ISO 8692) para la estimación de tasas de crecimiento. Todos los análisis de toxicidad fueron realizados por triplicado. El grado de toxicidad se estimó como $(1/\text{EC}_{50}) * 100$.

Tabla 3.9. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Aplicación
Mut58-5'	<u>GAATTC</u> CTGATCGAGCTGAACGAGGGC	Obtención de sonda y del mutante <i>S. ipomoea</i> SilA-
Mut58-3'	GAATTC <u>G</u> GTGATCTTGTTCGATTAC	Obtención de sonda y del mutante <i>S. ipomoea</i> SilA-

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

3.11. Técnicas de Biología Molecular aplicadas

3.11.1. Plásmidos y oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 3.9, indicando el nombre con el que fueron denominados, su secuencia en sentido 5'-3', subrayando los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, y su aplicación.

Los plásmidos utilizados en este trabajo, así como su tamaño, hospedador y algunas de sus características principales se muestran en la Tabla 3.10.

3.11.2. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*

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 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y con una DO_{600} 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 resuspendió 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.

3.11.3. Manipulación de las muestras de ADN

3.11.3.1. Extracción de 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

Tabla 3.10. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Tamaño	Huésped	Descripción	Fuente
pET28a(+)	5.3 Kb	<i>E. coli</i>	Kan ^R , expresión de proteínas	Novagen
Poj260 (ermE*p)	3.8 Kb	<i>E. coli</i> <i>S. ipomoea</i>	Apra ^R , ermE*p, ori T	Este estudio
pCR®2.1-TOPO	3.9 Kb	<i>E. coli</i>	Amp ^R , Kan ^R , lacZa, flori	Invitrogen

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 de nuevo 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 una temperatura de -20 °C.

3.11.3.2. 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). 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, MgCl₂ 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. 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 durante 2 minutos; y por último la reacción se concluyó con una polimerización a 72 °C durante 12 minutos.

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

3.11.3.3. Electroforesis de fragmentos los 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. 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 µg mL⁻¹ en TAE 1x) que tras unos 15 minutos permitió la visualización de las bandas en un transiluminador de luz UV. Cuando se requirió

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).

3.11.3.4. Digestión enzimática de las 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.

3.11.3.5. Ligación de los 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 μ L, 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.

3.11.3.6. 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.

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

3.11.4.1. 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.

3.11.4.2. 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 μ L de células electrocompetentes con 1 μ g 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.

3.11.5. Conjugación intergenérica

El proceso de conjugación intergenérica llevado a cabo entre *E. coli* y *S. ipomoea* 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 nalidixico (que permite seleccionar los transconjugantes,

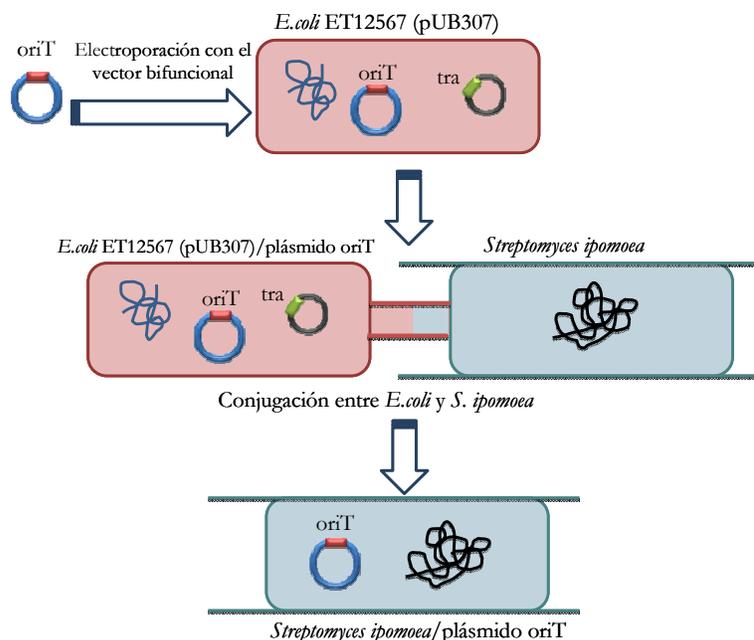


Figura 3.1. Representación esquemática del proceso de conjugación intergenérica entre *S. ipomoea* y *E. coli* ET12567 (pUB307).

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). 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*. 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. ipomoea* conteniendo 10^8 ufc mL⁻¹ se sometieron a un

choque térmico a 50 °C durante 10 minutos con el fin de estimular la germinación. Finalmente, la suspensión de esporas de *S. ipomoea* se añadió a las células de *E. coli* y la mezcla se sembró en placas de medio A, las cuales fueron incubadas a 28 °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.

3.12. Estrategias para el estudio de la función de la lacasa SilA

3.12.1. Obtención de un mutante no productor de lacasa de *S. ipomoea*

Para la obtención de un mutante de *S. ipomoea* no productor de lacasa se decidió optar por la estrategia de mutagénesis por disrupción génica. Para poner en práctica esta técnica, era necesario en primer lugar, amplificar una porción interna del gen de aproximadamente 500 pb, para lo que se utilizaron los mismos cebadores empleados en la clonación de *SilA* (ver Tabla 3.7). El producto de amplificación obtenido (Sipo500), se clonó mediante el kit “Topo TA Cloning kit” (Invitrogen) con el fin

de disponer del producto amplificado en cantidad suficiente. Así, para obtener dicho fragmento se digirió pCR2.1-Sipo500 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-Sipo500. Una vez realizadas las comprobaciones necesarias para conocer la orientación del inserto, pOJ260-Sipo500 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. ipomoea*, seleccionándose aquellas esporas portadoras de la mutación gracias a su resistencia a Apramicina, conferida por el plásmido pOJ260.

3.12.1.1. Ensayos para la comprobación del mutante *S. ipomoea* (SilA⁻)

3.12.1.1.1. Ensayo a nivel molecular

Para la comprobación del mutante *S. ipomoea* SilA⁻ a nivel molecular se llevó a cabo una PCR utilizando como cebadores los primers universales M13. Estos primers hibridan con el plásmido pOJ260, pero no así con el genoma de *Streptomyces*.

3.12.1.1.2. Ensayo a nivel bioquímico

Para comprobar la ausencia de actividad lacasa en la cepa mutante *S. ipomoea* SilA⁻ se llevó a cabo un ensayo de detección de dicha actividad, en comparación con la cepa silvestre, en medio MBS 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 MBS, que se incubaron en agitación (150 rpm) y a 28 °C durante 7 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 spot en el medio sólido MBS, suplementado con 1 g L⁻¹ de ABTS, en el que se podría detectar la actividad tras 4 días de incubación, mediante la aparición de un halo verde alrededor de la colonia.

3.12.2. Implicación en procesos de morfogénesis, esporulación y pigmentación de las esporas

Con objeto de comprobar la posible implicación de la lacasa de *S. ipomoea* en los procesos de morfogénesis, esporulación y pigmentación de las esporas 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 (SilA⁻) de *S. ipomoea*.

3.12.2.1. Microscopía óptica

Para el estudio fenotípico de las cepas silvestre y mutante de *S. ipomoea* mediante microscopía óptica, se inocularon suspensiones de esporas estandarizadas (10⁷ ufc mL⁻¹) de ambas cepas sobre cubreobjetos estériles introducidos de forma inclinada en placas de medio SM, suplementado con 25 µL mL⁻¹ de Apramicina en el caso de la cepa *S. ipomoea* SilA⁻. 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”.

3.12.2.2. Microscopía electrónica de barrido

Para el estudio fenotípico de las cepas silvestre y mutante de *S. ipomoea* 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.

Para comprobar la posible implicación de la lacasa de *S. ipomoea* en procesos de pigmentación de las esporas se realizaron siembras de las cepas silvestre y mutante en tres medios de cultivo sólidos: GAE, SM y Bennet. Las placas se inocularon con una suspensión de esporas estandarizada (10^8 ufc mL⁻¹) de ambas cepas mediante las técnicas de siembra por agotamiento y en masa. Transcurridos 5-6 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 en estría por agotamiento. Para

conseguir un mayor aumento se utilizó una lupa binocular Nikon.

3.12.3. Implicación en procesos de resistencia al cobre

Para comprobar la posible implicación de la lacasa de *S. ipomoea* 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 SM en ausencia de cobre externo (cultivos no inducidos) y otra, en la que las células fueron crecidas en medio SM sólido suplementado con cobre, previamente a realizar el estudio de tolerancia (cultivos inducidos).

3.12.3.1. Cultivos no inducidos

A partir de una suspensión de esporas estandarizada (10^8 ufc mL⁻¹) de ambas cepas crecidas en medio sólido SM, 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 μ M. El medio utilizado para el cultivo de la cepa mutante se suplementó además con 25 μ g mL⁻¹ de Apramicina. Los matraces se incubaron en agitación (150 rpm) durante 7 días a 28 °C. 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.

3.12.3.2. Cultivos inducidos

Tanto *S. ipomoea* como *S. ipomoea* SilA⁻ fueron sembrados en medio sólido SM suplementado con sulfato de cobre a una concentración final de 400 μ M. Transcurridos 5 a 6 días de incubación a 28 °C se obtuvo una suspensión de esporas estandarizada de 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.

3.12.4. Implicación en la degradación del polímero de lignina

Para poner de manifiesto la posible implicación de la lacasa de *S. ipomoea* 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.

3.12.4.1. 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 se esterilizó 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 se incubaron a 28

°C durante 7 ó 14 días en estático. Como control se utilizaron matraces que contenían paja de trigo pretratada sin inocular.

3.12.4.2. 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.

Resultados y Discusión

4.1. Producción y purificación de la lacasa recombinante SilA

La producción de la enzima recombinante se llevó a cabo según las condiciones óptimas establecidas en el apartado 3.2. Una vez obtenida la forma activa de la enzima, se procedió a su purificación mediante la utilización de columnas de gravedad His Gravitrap. El exceso de sales que acompañaban a la enzima purificada, debido a los tampones utilizados durante el procedimiento, fue eliminado mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando las columnas PD-10. Sin embargo, se observaba que tras este procedimiento la enzima presentaba una escasa estabilidad, precipitando al poco tiempo. Por ello, se decidió cambiar el método de eliminación de sales, y así en lugar de cromatografía se utilizó la centrifugación mediante el uso de las columnas Amicon® Ultra-15.

El grado de purificación de la enzima se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. En la Figura 4.1 se muestran los resultados de la electroforesis llevada a cabo en presencia de SDS, donde se puede observar una única banda correspondiente a la lacasa (A). Asimismo, en el gel de la derecha (B) se aprecian los resultados del zimograma realizado donde se observa la misma banda correspondiente a dicha actividad sobre ABTS.

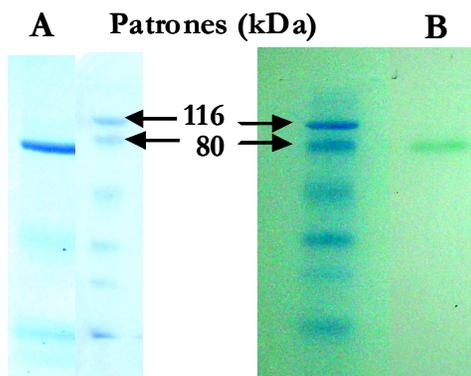


Figura 4.1. SDS-PAGE de la lacasa recombinante SilA. Gel teñido con azul Coomassie (A) y zimograma obtenido con ABTS (B)

Cabe señalar que tras el proceso de purificación se obtuvo un rendimiento muy

elevado de actividad lacasa, con valores en torno a 15-30 U mL⁻¹.

4.2. Determinación del potencial redox y de la estabilidad térmica, química y termocinética de SilA

4.2.1. Potencial redox

Una característica fundamental de las lacasas es la relación que existe entre su potencial redox (E^0) y la energía requerida para abstraer un electrón de un sustrato reducido. Aquellas lacasas que presentan elevados potenciales redox y son, por tanto, capaces de oxidar más fácilmente determinados sustratos, resultan de especial interés en procesos biotecnológicos. Con el propósito de conocer la capacidad oxidativa de SilA, así como comprender el proceso de transferencia electrónica de la enzima, se llevó a cabo una titulación redox que permitió determinar su potencial de oxidoreducción. El potencial de óxido-reducción (E^0) de la enzima se ha definido como aquel en el cual la concentración de lacasa oxidada es igual a la concentración de lacasa reducida.

En estudios similares llevados a cabo por otros autores se han obtenido los potenciales redox de diferentes lacasas determinados mediante voltametría cíclica o titulaciones redox (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta el potencial de óxido-reducción de las lacasas se han clasificado en: lacasas de bajo potencial redox (<500 mV), de potencial medio (500-700 mV) y de alto potencial redox (>790 mV) (Morozova *et al.*, 2007b). A lo largo de la escala biológica nos encontramos con lacasas de plantas y bacterias que presentan potenciales redox de 400 mV y con lacasas fúngicas cuyo potencial redox llega hasta 800 mV.

Para la determinación del potencial redox de la lacasa SilA se partió de la enzima completamente oxidada con hexacloroiridato de potasio, y en condiciones anóxicas, se fue adicionando lentamente una solución de ditionito de sodio para ir reduciendo la enzima. La titulación se continuó hasta que la muestra estuvo reducida al máximo. La curva de

titulación obtenida (Figura 4.2) se ajustó a la ecuación de Nernst, estimándose el potencial de óxido-reducción del centro del cobre T1 de SilA en 337 mV, lo que pone de manifiesto que se trata de una enzima con un potencial redox bajo, en comparación con otras lacasas. En base a este resultado, SilA podría clasificarse en el grupo de las lacasas de bajo potencial redox, al igual que ocurre con la lacasa de la planta *Rhus vernicifera* (Reinhammar y Vanngard, 1971), la de *Streptomyces svicens* (Gunne *et al.*, 2014), las lacasas LAC2 y LAC3 producidas por un Basidiomiceto (Klonowska *et al.*, 2002) o la lacasa de la arquea *Haloferax volcanii* (Uthandi *et al.*, 2010).

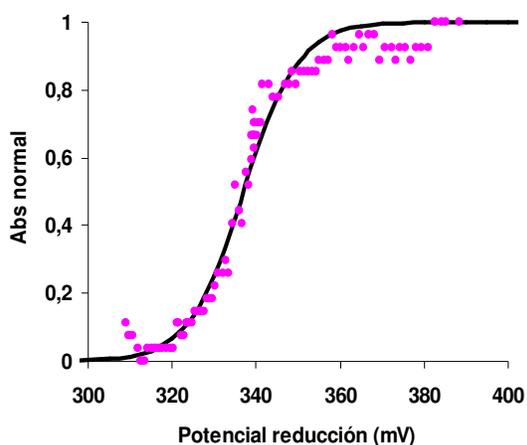


Figura 4.2. Titulación redox de la enzima recombinante SilA. La línea representa el mejor ajuste a la ecuación de Nernst para una reacción de 4 electrones.

La diferencia de potencial entre el cobre T1 de la enzima y el potencial del compuesto a degradar es un factor clave a tener en cuenta, ya que condiciona la capacidad de la enzima para oxidar el compuesto, así como la velocidad de reacción (Xu, 1996). Por tanto, el potencial redox de los compuestos a degradar es un factor importante a considerar para conocer la especificidad de sustrato de una lacasa. Asimismo, resulta de especial interés conocer una serie de factores que pueden afectar al cobre del centro T1, tales como las interacciones electrostáticas intramoleculares o el proceso de plegamiento de la enzima que pueden interferir y modular los valores de potencial redox de las lacasas (Li *et al.*, 2004). Otro factor que puede influir en el potencial redox del centro del cobre T1 tiene que ver

con el medio hidrofóbico que se genera en el centro T1 por influencia del núcleo hidrofóbico del dominio 2. Un medio hidrofóbico favorece la estabilidad de los iones Cu^+ frente al Cu^{2+} , lo que se traduce en un aumento del potencial redox del centro T1 (Walter *et al.*, 1996). Cabe destacar el alto grado de conservación que presentan los aminoácidos coordinantes del cobre de este centro (Piontek, 2002). El cobre del centro T1 está coordinado por aminoácidos altamente conservados como son dos histidinas y una cisteína. Hay un cuarto ligando que varía de unas lacasas a otras. En la mayoría de las lacasas, este cuarto ligando axial es una metionina; sin embargo, en las lacasas de origen fúngico este ligando suele ser una fenilalanina o una leucina no coordinantes, lo que contribuye en parte al alto potencial redox que presentan estas enzimas fúngicas. Análisis estructurales llevados a cabo en *Trametes versicolor*, así como estudios sobre mutagénesis dirigida realizados en especies de *Bacillus*, revelaron el papel del ligando axial del cobre T1 en la modulación del potencial redox. La presencia de una fenilalanina en lugar de una metionina como ligando axial en la lacasa de *T. versicolor*, determina en parte el elevado potencial redox de la enzima (780 mV) (Piontek *et al.*, 2002).

Mutaciones realizadas en las lacasas CotA de *Bacillus subtilis* o en la de *S. svicens*, donde la metionina fue sustituida por aminoácidos más hidrofóbicos como la leucina o la fenilalanina, permitieron aumentos del potencial redox entre 20 y 100 mV, comparado con sus respectivas lacasas sin modificar (Durão *et al.*, 2006; Gunne *et al.*, 2014). Otros estudios sobre mutagénesis dirigida han demostrado una disminución del potencial de oxidorreducción en 100-150 mV al sustituir la fenilalanina o la leucina por una metionina (Osipov *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 1999).

Las lacasas bacterianas se caracterizan por presentar potenciales redox medios y/o bajos, reduciendo su capacidad catalítica a un grupo limitado de compuestos. No obstante, resultan de especial interés en la industria debido a su alta estabilidad térmica y su capacidad de actuar en un rango amplio de pH. Algunas

lacasas de medio potencial redox han puesto de manifiesto su utilidad en ciertas aplicaciones como la lacasa del hongo de podredumbre blanca *Ganoderma*, que ha demostrado su capacidad para mejorar y facilitar la digestión de los alimentos en rumiantes monogástricos (Sharma *et al.*, 2013). Otra ventaja de las lacasas de medio y bajo potencial redox reside en su facilidad para ser sobreexpresadas de forma heteróloga en un hospedador, mientras que la dificultad en la sobreexpresión de lacasas de alto potencial redox limita su posterior comercialización a gran escala (Fillat *et al.*, 2012).

Por otro lado, en los últimos años se ha establecido la posibilidad de mejorar el potencial redox de las lacasas de medio y bajo potencial mediante evolución dirigida. Hay que señalar, que a pesar de la gran capacidad catalítica que presentan las lacasas de alto potencial redox, generalmente de origen fúngico, su posterior aplicabilidad en procesos biotecnológicos industriales se ve limitada debido a la falta de sistemas de expresión adecuados para su mejora mediante evolución dirigida (Mate *et al.*, 2010). Sin embargo, las lacasas bacterianas han resultado útiles en procesos de evolución dirigida gracias a su mayor facilidad de manipulación genética. La primera lacasa sometida a un proceso de evolución dirigida fue la lacasa MTL de bajo-medio potencial redox producida por *Myceliophthora thermophila*. Otros estudios de evolución dirigida han sido llevados a cabo con la lacasa bacteriana CotA mejorando su expresión y su especificidad de sustrato, entre otras características (Brissos *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2010; Koschorreck *et al.*, 2008).

El éxito conseguido en los estudios anteriormente mencionados con lacasas bacterianas modificadas mediante evolución dirigida, abre la posibilidad de considerar a la lacasa SilA como una buena candidata para aplicar dicho procedimiento, lo que permitirá en un futuro conseguir un aumento de su potencial redox que junto con la estabilidad de esta enzima a altas temperaturas y pH alcalinos así como su amplia tolerancia a sales e inhibidores de lacasas (Molina-Guijarro *et al.*,

2009), harían de SilA una prometedora enzima para su utilización en aplicaciones biotecnológicas.

4.2.2. Estabilidad termodinámica y química

La estabilidad termodinámica de SilA se determinó sometiendo a la enzima a un aumento progresivo de temperatura en un intervalo de 20 a 100 °C. Asimismo, se determinó la estabilidad química de la enzima frente al agente químico cloruro de guanidinio. Ambos ensayos se monitorizaron mediante espectrofotometría de fluorescencia. Este estudio permitió establecer asimismo la temperatura de desdoblamiento (T_m) y el proceso de desnaturalización de la enzima. Es sabido que cuando una enzima se desnaturaliza y por tanto despliega su conformación nativa ordenada, expone sus residuos internos de triptófano, lo cual se traduce en un incremento de la intensidad de fluorescencia.

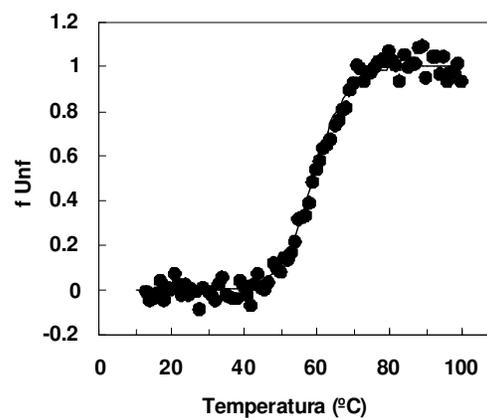


Figura 4.4. Fracción desnaturalizada (f_{Unf}) de SilA durante el aumento de temperatura y monitorizada mediante emisión de fluorescencia. La línea se ajusta a la ecuación $f_U = e^{(-\Delta G^\circ / RT) / (1 + e^{(-\Delta G^\circ / RT)})}$.

De este modo, las longitudes de onda correspondientes a la máxima emisión de estos residuos reflejan claramente la exposición de los residuos de triptófano. Esto se traduce en un desplazamiento de su espectro de emisión de 330 a 360 nm aproximadamente o en una disminución de la intensidad de fluorescencia monitorizada a 336 nm. Así, las longitudes de onda en la máxima emisión de estos residuos reflejan claramente la exposición de los residuos de triptófano durante la

desnaturalización de la proteína, los cuales presentan mayor apolaridad que la superficie de la misma (Lakowicz *et al.*, 1999).

Los resultados de estos estudios pusieron de manifiesto una moderada estabilidad térmica de SilA, que presentó una temperatura media de desdoblamiento (T_m) (a la cual el 50 % de las moléculas de la enzima están desnaturalizadas) de $60 \pm 6^\circ\text{C}$ (Figura 4.4), una energía de entalpía ΔH_{T_m} de 44 ± 4 kcal/mol y una entropía ΔS_{T_m} de 0.13 ± 0.01 kcal/mol K.

En los ensayos de desnaturalización inducida por agentes químicos no está claro aún el mecanismo mediante el cual estos agentes desnaturalizan las enzimas, aunque parece que podrían debilitar la cohesión entre los grupos apolares de la proteína responsables del efecto hidrofóbico que permite su plegamiento. En los ensayos de desnaturalización de SilA mediante el agente químico cloruro de guanidinio se observó que era necesaria una concentración de 2,2 M de dicho agente para desestabilizar la estructura terciaria de la enzima, demostrándose a su vez que el estado nativo es más estable que el desnaturalizado pues el valor de la energía de Gibbs del disolvente (ΔG_{water}) a 25°C se estimó en 2.8 kcal/mol, valor muy similar al obtenido con la oxidasa multicobre (McoA) de *Aquifex aeolicus* pero algo inferior al obtenido por otras lacasas (Durão *et al.*, 2006; Tavares, 2011). Las diferencias de energía entre el estado nativo y el desnaturalizado se deben, a nivel molecular, a la conformación de enlaces y a la exclusión de moléculas de agua por efectos hidrofóbicos con relevancia en la entropía del sistema.

Asimismo, se pudo observar el desplazamiento de la emisión del triptófano hacia 360 nm (Figura 4.5).

La desnaturalización térmica o química registrada a través de las medidas de emisión de fluorescencia, indicaron que la proteína se desnaturalizó siguiendo un modelo simple e irreversible de dos etapas, en el que sólo se pueden apreciar dos fracciones, la nativa y la desnaturalizada. La desnaturalización suele ser un proceso complejo, si bien la mayoría de las proteínas siguen este modelo simplificado de dos etapas (Brissos *et al.*, 2014). En este

modelo, en un primer paso se ve afectada la cadena polipeptídica de la proteína y a continuación, la proteína desnaturalizada se puede renaturalizar de nuevo o continuar el proceso de desnaturalización hasta un estado irreversible que conllevaría agregación y precipitación de la misma y cambios covalentes, tales como desaminaciones u oxidaciones de los residuos cisteína y metionina (Volkin y Klivanov, 1989). En el caso de la lacasa SilA se observó que una vez desnaturalizada precipita, impidiendo la renaturalización de la misma.

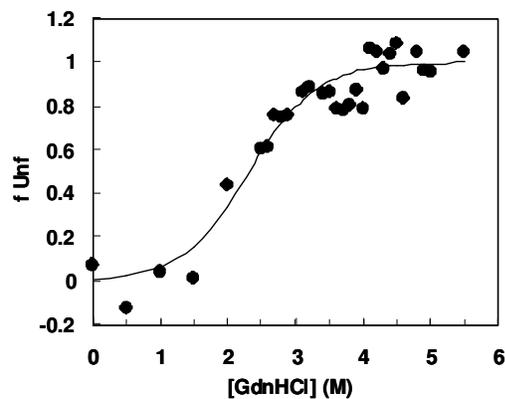


Figura 4.5. Fracción desnaturalizada (fUnf) de SilA con concentraciones crecientes de cloruro de guanidinio y monitorizada mediante emisión de fluorescencia. La línea se ajusta a la ecuación $f_U = e^{(-\Delta G^\circ / RT)} / (1 + e^{(-\Delta G^\circ / RT)})$.

4.2.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad lacasa a largo plazo (estabilidad termocinética)

El conocimiento de los procesos de plegamiento y desnaturalización de las proteínas recombinantes resulta fundamental con vistas a su aplicación en la industria biotecnológica. Con cierta frecuencia, dichas proteínas se inactivan debido a problemas en su plegamiento estructural (Gummadi, 2003), lo cual supone un estímulo para tratar de profundizar en el conocimiento de dichas causas (Brissos *et al.*, 2014). Estos estudios también resultan imprescindibles para conocer la función biológica que desempeñan dichas enzimas en los microorganismos productores, así como para aplicar técnicas de evolución molecular a la mejora de las mismas.

Estudios anteriores llevados a cabo con SilA, pusieron de manifiesto la elevada tolerancia de la enzima a la temperatura, observándose que tras 24 h de incubación a 50 y 60 °C la enzima mantenía más del 50 % de actividad enzimática (Molina-Guijarro, 2006). No obstante, con objeto de conocer la estabilidad de la actividad enzimática de SilA frente a temperaturas superiores a las anteriormente ensayadas, durante 24 horas de incubación, se sometió la enzima a distintas temperaturas (70, 80 y 95 °C), monitorizando a diferentes intervalos de tiempo la actividad enzimática y la conformación nativa de la enzima, mediante observación del grado de precipitación de la misma.

En las dos primeras temperaturas ensayadas (70 y 80 °C) se observó cierta estabilidad de la actividad enzimática, ya que ésta no sólo no disminuía durante las primeras 6 horas de incubación, sino que experimentaba un incremento a determinados tiempos. En el ensayo realizado a 95°C, se observó tanto una disminución progresiva de la actividad enzimática, como un aumento en el grado de precipitación de la misma. Finalmente, se estimó una vida media de SilA a 95 °C de 1.3 horas mediante la ecuación $t_{1/2} = \ln 2 / k_d$, (Figura 4.3). Si se compara la vida media de SilA con la de otras lacasas de *Streptomyces*, se observa que hay variaciones en cuanto a la estabilidad de estas enzimas a la temperatura. Así, la lacasa de *S. svicens* presenta una temperatura media de desdoblamiento (T_m) de 88 min a 60 °C (Gunne y Urlacher, 2012), la de *S. lavendulae* de 20 min a 70 °C (Suzuki *et al.*, 2003), habiéndose logrado más recientemente mediante mutagénesis dirigida aumentar la estabilidad térmica de la lacasa SLAC de *S. coelicolor* de forma muy significativa, alcanzando una temperatura media de desdoblamiento de 10 h a 80 °C, de 7 h a 90 °C y de 1 h a 100 °C (Sherif *et al.*, 2013).

De los resultados obtenidos en nuestro estudio se puede destacar que la lacasa SilA no presenta una estabilidad térmica tan elevada como la lacasa SLAC modificada, pero su estabilidad es comparable, e incluso mejor, que la de otras lacasas nativas producidas por estreptomicetos.

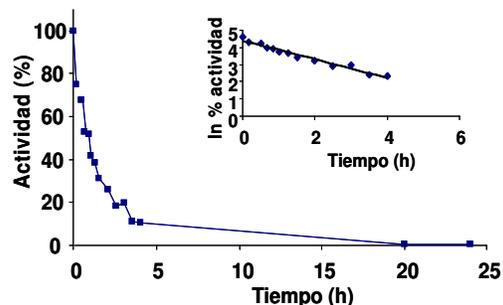


Figura 4.3. Estabilidad cinética de SilA a 95 °C. La desactivación de la enzima obedece a una cinética de primer orden ($\ln \text{actividad} = \ln \text{actividad}_{(t=0)} - k_d t$, donde k_d es la constante de desactivación). En la grafica insertada se puede calcular la vida media de SilA como $t_{1/2} = \ln 2 / k_d$, donde k_d se corresponde con la pendiente.

4.3. Ensayos conducentes a la cristalización de SilA

Los estudios cristalográficos son especialmente útiles para determinar la estructura tridimensional de las proteínas. El hecho de que una proteína pueda formar estructuras cristalinas adecuadas puede aportar información útil sobre la solubilidad y estabilidad de la misma, entre otras propiedades (Ericsson *et al.*, 2006).

Para la obtención de cristales de la enzima SilA, se hizo necesario en primer lugar seleccionar el tampón en el cual la enzima presentara un alto grado de solubilidad y estabilidad, y se minimizaran los problemas de agregación y precipitación de la proteína. Para ello, se realizó el ensayo denominado “Thermal Shift Assay”, utilizando el compuesto Spyro Orange, un colorante que al encontrarse en un entorno hidrofóbico comienza a emitir fluorescencia. A partir de este estudio se podría determinar la temperatura de desdoblamiento (T_m) de SilA en cada uno de los tampones ensayados. Los resultados que cabría esperar frente a los obtenidos tras el ensayo se muestran en la Figura 4.6 A y 4.6 B, respectivamente.

El valor que se corresponde con el punto de inflexión de cada curva de la Figura 4.6 A sería la temperatura transicional de desdoblamiento de la enzima (T_m) que como se observa, sería diferente para cada tampón, eligiéndose como

el más idóneo aquel para el que la temperatura de desdoblamiento fuera más alta.

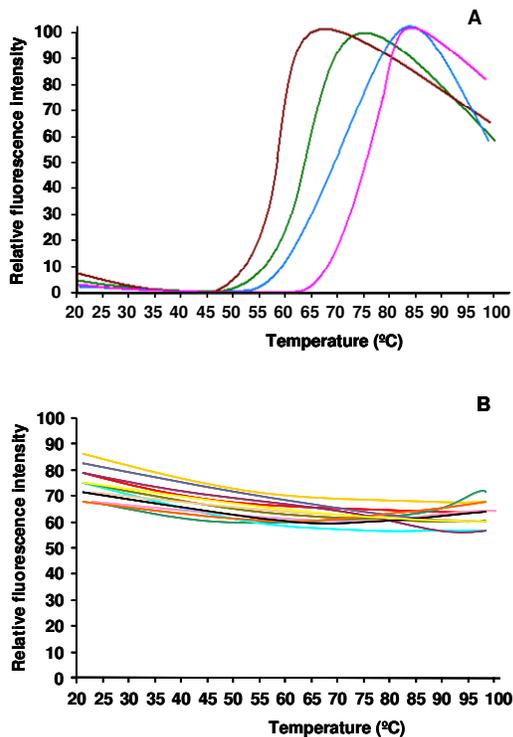


Figura 4.6. Curvas de fluorescencia teóricas (A) y obtenidas (B) durante la cinética de desnaturalización de SilA en presencia de distintos tampones. Los tampones y aditivos utilizados se detallan en el apartado 3.5 de materiales y métodos.

A pesar de nuestro interés, no se pudo determinar la temperatura transicional de desdoblamiento de la enzima, al no obtenerse variaciones significativas en la intensidad de fluorescencia en los distintos tampones ensayados. De hecho, los resultados mostraron intensidades de fluorescencia iniciales muy elevadas, que no variaban prácticamente con el tiempo ni con la temperatura (Figura 4.6 B). Se ha descrito que una intensidad de fluorescencia inicial elevada podría ser indicativo de la presencia de regiones altamente hidrofóbicas en la estructura de la enzima o debido a que la enzima se encuentra parcialmente desnaturalizada en los tampones ensayados exponiendo parte de sus aminoácidos hidrofóbicos internos, lo que no permitiría observar la cinética de desnaturalización de la misma mediante espectrofotometría de fluorescencia, al haberse unido el colorante

Spyro Orange a dichas regiones desde un comienzo (Ericsson *et al.*, 2006).

Una posible solución a este problema sería tratar de bloquear las regiones hidrofóbicas exteriores de la enzima con detergentes no iónicos, Tween 20, polietilenglicol (PEG) o alcohol polivinílico (PVA). Es importante tener en cuenta que el compuesto utilizado para saturar las regiones hidrofóbicas no tiene que interferir en la medida de la intensidad de fluorescencia que emita Spyro Orange.

Los problemas surgidos con la aplicación de la técnica “Thermal shift assay”, impidieron proceder a la cristalización de SilA, al no haber encontrado un tampón adecuado en el que la enzima mostrase un alto grado de solubilidad y estabilidad. Aún así, mediante el uso de herramientas informáticas a través de páginas web como Phyre2, Swiss-Model o 3Dligandsite y gracias a la reciente publicación de la estructura cristalina de la lacasa de *Streptomyces coelicolor* (Skálová *et al.*, 2009), hemos comprobado mediante comparación de secuencias que SilA presenta un alto grado de semejanza (92-95%) con la lacasa de esta bacteria y de otras cercanas como *Streptomyces viridosporus*, con la que presenta un 88% de semejanza. Este hecho nos ha permitido obtener un modelo teórico tridimensional de la estructura de SilA (Figura 4.7) a través de su secuencia utilizando el programa informático Phyre2. (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/).

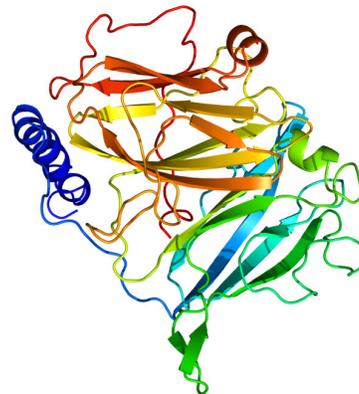


Figura 4.7. Modelo tridimensional de la lacasa recombinante SilA elucidada mediante análisis de secuencias con el programa Phyre2.

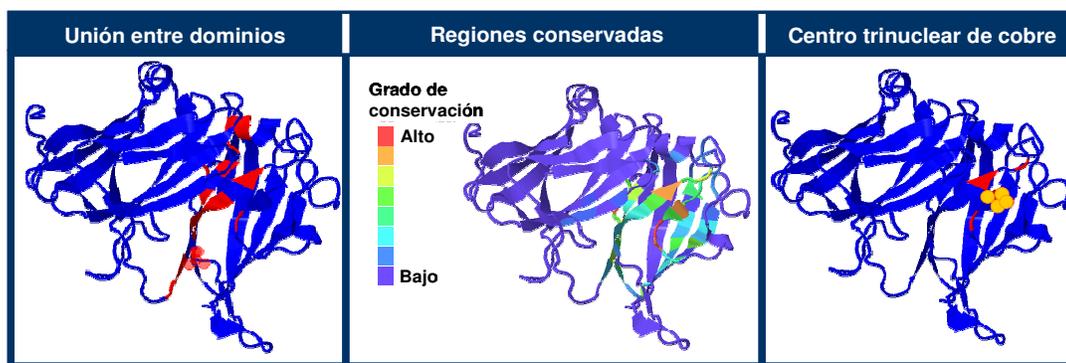


Figura 4.8. Análisis de la posible estructura de SilA mediante su modelo tridimensional a través de la Herramienta Phyre2.

En la Figura 4.8 se puede apreciar además la posible zona intermedia o de unión entre los dos dominios 1 y 3 que posee esta enzima, las regiones más conservadas y el centro trinuclear del cobre de SilA. La lacasa SilA de *S. ipomoea* al igual que las lacasas de *S. coelicolor*, *S. griseus* y *S. viridosporus*, presenta solo los dos dominios cupredoxina 1 y 3, careciendo del segundo dominio. El dominio 2 está implicado en la formación del sitio de unión al sustrato y en la correcta posición de los dominios 1 y 3, lo que facilita la formación del centro trinuclear.

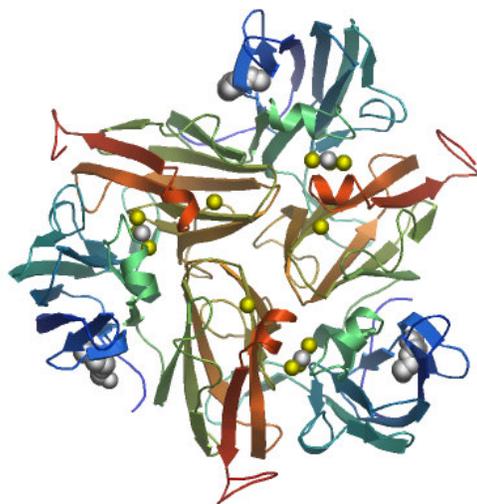


Figura 4.9. Predicción de la posible estructura de la lacasa SilA mediante Swiss Model, con una conformación en homotrímero basándose en la secuencia de la lacasa de *S. coelicolor*. En amarillo se representan los átomos de cobre.

Las lacasas de dos dominios carecen del dominio 2 lo que conllevaría cambios en la estructura de la enzima que podrían afectar a la formación del centro trinuclear (Morozova *et*

al., 2007a; Piontek, 2002; Skálová *et al.*, 2009). Se ha sugerido la presencia necesaria de estos dos dominios por triplicado para la formación adecuada del centro del cobre trinuclear, dando lugar a proteínas triméricas como se muestra en la Figura 4.9 (Murphy *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2003). Sin embargo, en el caso de SilA y la lacasa de *S. coelicolor* SLAC, se ha observado que bastaría una estructura dimérica (cuatro dominios) para que estas enzimas presenten actividad enzimática (Molina-Guijarro, *et al.*, 2009; Skálová *et al.*, 2009).

4.4. Optimización del sistema lacasa-mediador

4.4.1. Evaluación de distintos compuestos naturales como mediadores

La demostración de la eficacia de distintos compuestos mediadores de bajo peso molecular para mejorar y aumentar el potencial oxidativo de las lacasas, ha permitido el desarrollo de distintos sistemas lacasa-mediador para su aplicación en la degradación de compuestos fenólicos de alto potencial redox (Call y Mucke, 1997). La utilización de compuestos mediadores sintéticos ha incrementado notablemente la capacidad degradativa de las lacasas, extendiendo su efectividad a contaminantes de naturaleza recalcitrante, como son los tintes industriales y los fármacos (Camarero *et al.*, 2005). No obstante, a pesar de su probada eficiencia, la utilización de estos compuestos artificiales presenta ciertos inconvenientes, tales como, su elevado coste y su toxicidad. Por esta razón

se hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos mediadores de fácil obtención y de bajo coste, que no resulten perjudiciales para el medioambiente.

En trabajos previos se descubrió que determinados metabolitos de hongos, como el ácido 3-hidroxiantranílico producido por *Pycnoporus cinnabarinus*, el ácido 4-hidroxibenzoico, el alcohol 4-hidroxibencílico, la acetosiringona, el siringato de metilo o el siringaldehído, eran capaces de mediar en la oxidación de sustratos no fenólicos (Camarero *et al.*, 2005; Eggert *et al.*, 1996b; Fillat *et al.*, 2012; Johannes y Majcherczyk, 2000; Mendes *et al.*, 2011; Moya *et al.*, 2010). La importancia de estos compuestos de origen natural para ser utilizados como mediadores de oxidación de las lacasas, se potencia asimismo por el hecho de que no inhiben a la enzima una vez que han sido oxidados por la misma, como se ha demostrado para el caso de la acetosiringona. Se puede considerar este hecho significativamente relevante, si se compara con lo que ocurre con algunos radicales de mediadores sintéticos como el HBT, que se ha demostrado que pueden inactivar a la enzima (Li *et al.*, 1998). Estos compuestos naturales pueden ser fácilmente obtenidos en el curso de la degradación microbiana de la lignocelulosa. Así, por ejemplo, en estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, se puso de manifiesto que durante la degradación de paja de trigo bajo condiciones de fermentación en estado sólido con distintas cepas de *Streptomyces*, se produce una gran diversidad de compuestos fenólicos de bajo peso molecular derivados de la estructura de la lignina (Hernández-Coronado *et al.*, 1998). Resultados similares se obtuvieron durante el tratamiento de efluentes alcalinos derivados del proceso de cocción de paja de trigo para la obtención de pasta de papel, por cepas seleccionadas de *Streptomyces* (Hernández *et al.*, 1997). En trabajos posteriores se demostró la capacidad de la acetosiringona para actuar de mediador junto con la lacasa producida por *Streptomyces cyaneus* en la degradación de tintes textiles de tipo azo (Moya *et al.*, 2010). Asimismo, este compuesto también ha resultado útil para la

deslignificación de pastas de papel (Camarero *et al.*, 2007).

Todos estos resultados obtenidos con la acetosiringona (AS), uno de los principales productos derivados de la despolimerización biológica y química de ligninas ricas en unidades siringilo, nos han conducido a considerar el sistema SilA-AS como una prometedora estrategia para la degradación de contaminantes ambientales. En estudios anteriores se ha descrito que la acción de estos compuestos fenólicos como mediadores en la oxidación de compuestos no fenólicos por la lacasa, suele ser más dependiente de la estructura del compuesto fenólico en sí que de la enzima utilizada (Rosado *et al.*, 2012). La presencia de una carga negativa cerca del sitio activo de la enzima, parece tener un papel relevante tanto en la formación del radical fenoxilo a partir del compuesto fenólico, como para la estabilidad del mismo durante la reacción catalítica. Sin embargo, no todas las lacasas presentan dicha carga, con lo cual la formación y estabilidad de los radicales fenoxilo recae mayoritariamente en el equilibrio del estado protonado-desprotonado de estos compuestos fenólicos (d'Acunzo y Galli, 2003; Pereira *et al.*, 2009). Así, a valores de pH básicos, compuestos fenólicos, tales como, acetosiringona, siringaldehído y siringato de metilo se encuentran desprotonados y por tanto son más fácilmente oxidables por la lacasa (Rosado *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos tras el análisis por HPLC-DAD de la capacidad oxidativa de SilA sobre los distintos mediadores ensayados, mostraron que la acetosiringona, el siringaldehído, el alcohol siringílico, el ácido siringico y el siringato de metilo resultaron ser los mejores compuestos para actuar como mediadores. Para corroborar estos resultados, dichos compuestos se utilizaron junto con SilA en un ensayo de decoloración de diferentes tintes textiles. Los resultados obtenidos, mostraron que la acetosiringona, el siringaldehído y el siringato de metilo fueron los mediadores que proporcionaron las mayores tasas de decoloración (datos no mostrados). Por tanto, estos tres compuestos

se utilizaron posteriormente como mediadores en los ensayos de degradación llevados a cabo por SilA.

4.4.2. Efecto de la concentración del mediador y de la temperatura de reacción sobre la capacidad oxidativa del sistema lacasa-mediador

Una vez seleccionados la acetosiringona (AS), el siringaldehído (SA) y el siringato de metilo (MeS) como los mediadores más efectivos, se llevó a cabo un estudio sobre el efecto de la concentración del mediador y la temperatura sobre la efectividad del sistema lacasa-mediador para degradar los tintes textiles Acid Orange y Tartrazine.

Los resultados obtenidos de los ensayos de decoloración de Acid Orange 63 y Tartrazine con el sistema lacasa-mediador (AS, SA y MeS) con dos concentraciones distintas de mediador (0.1 y 0.5 mM), pusieron de manifiesto un aumento en los rendimientos del proceso al incrementar la concentración del compuesto mediador a 0.5 mM en el caso del colorante Acid Orange 63 (Tabla 4.1), pero no en el caso del colorante Tartrazine (Tabla 4.2).

Tabla 4.1. Porcentajes de decoloración del Acid Orange 63 tras 24 h de tratamiento con el sistema SilA-mediador en presencia de los mediadores acetosiringona, siringaldehído y siringato de metilo, a dos concentraciones diferentes.

Concentración	SilA-AS	SilA-SA	SilA-MeS
0.1 mM	3.8	0	13.95
0.5 mM	78.89	72.52	80.85

Concentraciones de mediador superiores a 100 μ M suponían a veces, principalmente a temperaturas elevadas, la precipitación de la mezcla de reacción. Por tanto, se estableció para el caso de los tintes, que la concentración idónea de mediador era de 100 μ M, donde el total de la decoloración podría ser atribuido a la capacidad oxidativa del sistema lacasa-mediador y no debido a procesos indeseados como la precipitación del colorante.

Estos mismos resultados se obtuvieron en la degradación de tintes textiles por el sistema lacasa-mediador con la lacasa de *Streptomyces cyaneus*, donde con una concentración de

mediador superior a 0.1 mM se daban procesos de precipitación, probablemente debido a reacciones de polimerización (Moya *et al.*, 2010). Esta concentración de mediador es inferior a la utilizada en otros trabajos con mediadores sintéticos como el HBT, donde se necesitaban concentraciones entre 1 y 11 mM para obtener tasas de decoloración en torno al 90 %, similares a las obtenidas en este trabajo con los tintes Reactive Black 5, Orange II o Indigo Carmine (Nyanhongo *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2001; Daâssi *et al.*, 2013) pero con menor concentración de mediador, lo cual resulta interesante desde el punto de vista económico. Asimismo, cabe destacar, que el sistema SilA-siringato de metilo resultó más efectivo que el resto de los sistemas lacasa-mediador ensayados.

Tabla 4.2. Porcentajes de decoloración de Tartrazine tras 24 h de tratamiento con el sistema SilA-mediador en presencia de los mediadores acetosiringona, siringaldehído y siringato de metilo, a dos concentraciones diferentes.

Concentración	SilA-AS	SilA-SA	SilA-MeS
0.1 mM	19.2	10.4	20.97
0.5 mM	6.4	14.18	19

Debido a la dureza de las condiciones de los procesos industriales, tales como, altas temperaturas y/o presiones, variabilidad en el rango de pH, gran concentración de sales, etc. se precisa de enzimas cada vez más resistentes y estables. En estudios anteriores se había demostrado que SilA es una enzima moderadamente termoestable, pero se desconocía en qué medida la capacidad oxidativa de la lacasa está condicionada por la temperatura. Por ello, se llevó a cabo un estudio sobre el efecto de la temperatura en la capacidad oxidativa de SilA y del sistema lacasa-mediador. Los ensayos de degradación con el sistema lacasa-mediador se llevan a cabo normalmente a 35 °C. Sin embargo, la temperatura óptima de SilA es de 60 °C y debido a esto y a su alta estabilidad a la temperatura (hasta 95 °C) se optó por realizar los ensayos de degradación a estas tres temperaturas (35, 60 y 95 °C). Los resultados de decoloración con los tintes industriales Acid Orange 63 y Tartrazine (Tablas 4.3 y 4.4)

mostraron un aumento de los porcentajes de decoloración al incrementar la temperatura de tratamiento a 60 °C. Por tanto, cabría esperar la misma dinámica para ambos tintes al aumentar la temperatura a 95 °C, como así ocurrió en el caso del Acid Orange 63, para el que se observó que los mayores porcentajes de decoloración se alcanzaron a dicha temperatura.

Tabla 4.3. Porcentajes de decoloración del Acid Orange 63 tras 24 h de tratamiento con el sistema SilA en presencia de 0.1 mM de acetosiringona, siríngaldehído y siríngato de metilo, a tres temperaturas diferentes.

Temperatura (°C)	SilA-AS	SilA-SA	SilA-MeS
35	3.8	0	13.95
60	16.49	13.8	20.82
95	81.82	79.13	84.81

Sin embargo, en el caso del Tartrazine, los porcentajes de decoloración obtenidos a 95 °C fueron inferiores a los obtenidos a 60 °C. No obstante, cabe señalar que aunque los porcentajes de decoloración a 95 °C no fueron elevados para Tartrazine, la velocidad de actuación de SilA frente a ambos colorantes a esta temperatura se acertaba considerablemente. Así, mientras que a 35 y 60 °C las tasas máximas de decoloración se obtenían tras 4 h de tratamiento, a 95 °C estas tasas se alcanzaban en tan solo 15 minutos.

Tabla 4.4. Porcentajes de decoloración del Tartrazine tras 24 h de tratamiento con el sistema SilA en presencia de 0.1 mM de acetosiringona, siríngaldehído y siríngato de metilo, a tres temperaturas diferentes.

Temperatura (°C)	SilA-AS	SilA-SA	SilA-MeS
35	19.2	10.4	20.97
60	61.17	59.35	74.6
95	33.98	45.19	20.62

A pesar de los elevados niveles de degradación del Acid Orange 63 a 95 °C no se optó por utilizar esta temperatura en posteriores ensayos puesto que acertaba de igual manera el tiempo de estabilidad de la enzima SilA. En otros estudios se obtuvieron resultados similares; así, la capacidad oxidativa de la lacasa de *Trametes modesta* frente a los colorantes Acid blue 74 y Reactive blue 221, a temperaturas de 60 y 70 °C se interrumpía tras 30–60 minutos de incubación, obteniéndose porcentajes de

degradación de ambos tintes inferiores a los obtenidos a temperaturas de reacción más bajas (Nyanhongo *et al.*, 2002). Como ya se ha mencionado antes, la temperatura óptima de SilA es de 60 °C, donde conserva más del 50 % de su actividad enzimática tras 24 h de incubación a pH 7. Incrementando la temperatura por encima de 60 °C, la estabilidad de SilA decrece considerablemente. No obstante, se había comprobado que a 35 °C dicha lacasa conserva en torno al 90 % de su actividad (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). La actividad enzimática está estrechamente relacionada con la rigidez/flexibilidad de la proteína y aunque 60 °C sea la temperatura óptima de la actividad lacasa, no tendría porque serlo para la estabilidad de la enzima.

4.5. Establecimiento de ciclos redox de quinonas en *Streptomyces ipomoea*.

Los actuales métodos para la descontaminación de compuestos contaminantes involucran procesos y técnicas físico-químicas que requieren grandes cantidades de energía e inversión. Actualmente, hay una creciente preocupación en la sociedad por la búsqueda de nuevas estrategias efectivas para la descontaminación de aguas residuales. Entre estas estrategias, aquellas que involucran a microorganismos ligninolíticos como *Streptomyces ipomoea* están cobrando una gran importancia.

Un método que ha demostrado ser eficaz en la degradación de contaminantes es la oxidación avanzada mediante la generación de radicales hidroxilo por distintas especies de hongos a través de ciclos redox de quinonas (Aranda *et al.*, 2010; Gómez-Toribio *et al.*, 2009b). Todos los procesos de oxidación avanzada (POA) se caracterizan por explotar la alta reactividad de los radicales $\cdot\text{OH}$ para degradar y mineralizar contaminantes que no pueden ser degradados por tratamientos convencionales (Andreozzi *et al.*, 1999). Sin embargo, estos procesos presentan algunos inconvenientes, entre los que cabe señalar su elevado coste (Andreozzi y Marotta, 1999; Robinson *et al.*, 2001).

Para comprobar si el micelio de *S. ipomoea* en presencia de quinona puede promover la producción de radicales hidroxilo, se requirió determinar en primer lugar la presencia de actividad lacasa y quinona reductasa asociadas al micelio de este microorganismo. El papel de la lacasa en el ciclo redox de quinonas tiene lugar mediando la oxidación de hidroquinona a semiquinona. Sin embargo, para la obtención de la hidroquinona a partir de una quinona es necesaria la enzima quinona reductasa. Los resultados confirmaron la presencia de ambas actividades enzimáticas en el microorganismo, produciéndose el máximo de actividad lacasa al cuarto día de incubación (Figura 4.10), mientras que el máximo de actividad quinona reductasa se obtuvo al segundo día, correspondiéndose con la fase exponencial de crecimiento.

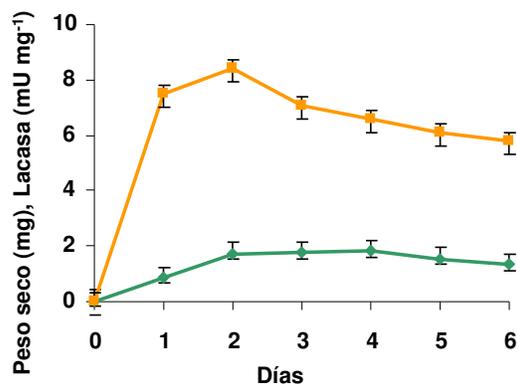


Figura 4.10. Cinética de producción de actividad lacasa asociada al micelio de *S. ipomoea* (línea verde) y curva de crecimiento del microorganismo (línea naranja) durante 6 días de incubación.

Para la producción de radical $\cdot\text{OH}$ se utilizó la 2,6-dimetoxibenzoquinona en presencia de Fe^{2+} quelado con EDTA en tampón fosfato a pH 7. La producción de radical $\cdot\text{OH}$ por unidad de peso seco (mg) generado por el micelio de *S. ipomoea* se muestra en la Figura 4.10 junto con las unidades de actividad lacasa asociada a micelio.

Como se puede observar en la Figura 4.11, la producción más elevada de radicales hidroxilo se produjo al tercer día de incubación, que se corresponde con una producción de TBARS de $40 \text{ mU Abs}_{(532 \text{ nm})} \text{ min}^{-1}$, prácticamente tan alta como la producida por hongos ligninolíticos como *Pleurotus eryngii* (Gómez-

Toribio *et al.*, 2009b). Ya se había demostrado con anterioridad la capacidad de otros microorganismos para generar radicales hidroxilo mediante ciclos redox de quinonas como es el caso de *Pycnoporus cinnabarinus*, *Trametes versicolor* o *Phlebia radiata* (Gómez-Toribio *et al.*, 2009b), siendo *Pleurotus eryngii* el hongo donde se estableció por primera vez su capacidad para generar radicales hidroxilo a través de ciclos redox de quinonas, con el concurso de la lacasa como única enzima ligninolítica (Guillén *et al.*, 2000b).

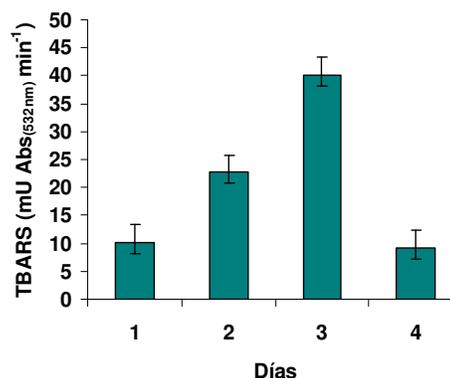


Figura 4.11. Producción de radicales $\cdot\text{OH}$ expresado como TBARS, por *S. ipomoea* mediante ciclos redox de quinonas a lo largo de 4 días.

Más recientemente, también se ha demostrado la capacidad de la lacasa bacteriana producida por *Streptomyces cyaneus* para generar especies reducidas de oxígeno (Moya, 2011). En este estudio, se ha confirmado asimismo, la capacidad de *Streptomyces ipomoea* para generar radicales hidroxilo vía ciclos redox de quinonas merced a la presencia en este microorganismo de actividad quinona reductasa y lacasa. Puesto que apenas se observaron diferencias en la producción de actividad lacasa entre los días 2 y 4 de incubación, se optó por utilizar micelio de *S. ipomoea* de 3 días para futuros ensayos de degradación con este sistema de producción de radicales $\cdot\text{OH}$.

4.5.1. Viabilidad de *Streptomyces ipomoea* a los radicales hidroxilo

Con el fin de conocer el efecto de los radicales hidroxilo sobre la viabilidad del microorganismo, se llevó a cabo un estudio

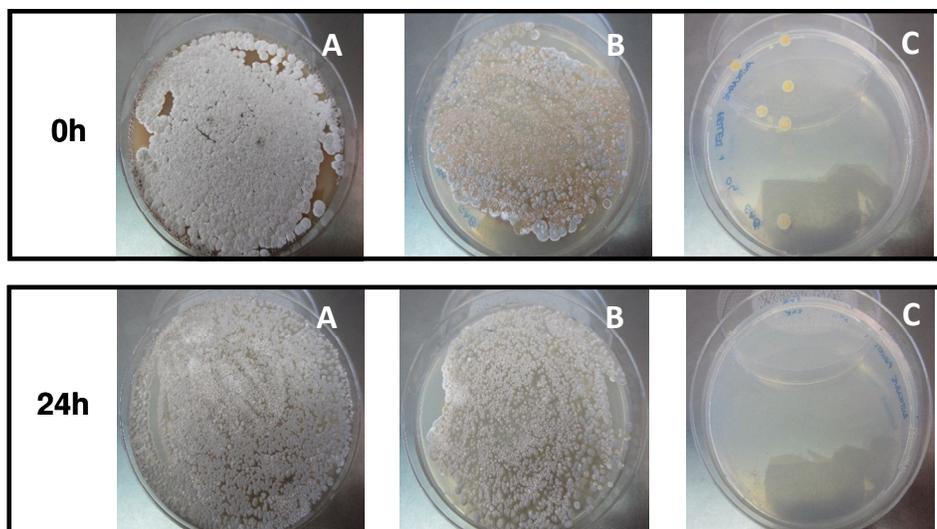


Figura 4.12. Efecto de los radicales hidroxilo sobre la viabilidad de *S. ipomoea* en tiempo 0 y tras 24 h de tratamiento (A: control positivo, B: *S. ipomoea* tratado con los radicales hidroxilo y C: control negativo).

sobre la capacidad de *S. ipomoea* para crecer y esporular en los medios de cultivo soja-manitol (SM) y GAE tras ser sometido a distintas condiciones: ciclos redox de quinonas completos, ciclos redox de quinonas en ausencia de quinona o ciclos redox de quinonas en ausencia de hierro.

En estudios anteriores, se ha demostrado el efecto bactericida de las especies reactivas del oxígeno (ROS), entre ellas los radicales hidroxilo, sobre algunas especies bacterianas patógenas para el ser humano (Ikai *et al.*, 2010). Debido al carácter saprófito de las actinobacterias, microorganismos muy abundantes en el suelo, parece lógico que puedan resistir a las cambiantes condiciones de estrés que ocurren con frecuencia en el medio que habitan. De hecho, se ha comprobado que las actinobacterias codifican numerosos genes relacionados con la respuesta frente a factores de estrés (Bentley *et al.*, 2002). Si se tienen en cuenta las razones expuestas, no es de extrañar que en el estudio realizado la viabilidad de *Streptomyces ipomoea* no se viera afectada por las condiciones de producción de radicales hidroxilo a las que fue sometido, como se pudo comprobar por el desarrollo de un crecimiento y esporulación aparentemente normales en los dos medios de cultivo ensayados (Figura 4.12).

4.6. Evaluación del potencial degradativo del sistema SiIA-mediador y de los radicales $\cdot\text{OH}$ sobre distintos contaminantes de diferente naturaleza

Con el fin de conocer el potencial degradativo de los dos sistemas oxidativos demostrados en *Streptomyces ipomoea* sobre contaminantes ambientales, se realizaron una serie de ensayos para evaluar la efectividad de ambos sistemas para degradar en primer término una serie de tintes textiles de importancia industrial y estructuralmente heterogéneos. Asimismo, se probó la eficacia de ambos sistemas sobre diferentes fármacos considerados actualmente contaminantes emergentes de aguas residuales, como es el caso de las fluoroquinolonas (Ciprofloxacino y Norfloxacino) y del anti-epiléptico Carbamazepina.

4.6.1. Decoloración y/o degradación de tintes textiles

4.6.1.1. Ensayos *in vitro* con el sistema SiIA-mediador

Previamente a la realización de los ensayos, se determinaron las longitudes de onda de máxima absorción en el visible (λ) de cada uno de los tintes utilizados (Tabla 4.5) a partir de los espectros de absorción UV/Vis de los respectivos colorantes.

En el Anexo I se muestran además las estructuras químicas de los tintes obtenidas de la página web de la casa comercial Sigma (www.sigmaaldrich.com). En la Tabla 4.6 se muestran los resultados del ensayo de decoloración de los distintos tintes textiles, tanto en ausencia como en presencia de mediadores.

Tabla 4.5. Longitud de onda de máxima absorción en el visible (λ) y coeficientes de extinción molar (ϵ) de los tintes a pH 8.

Colorante	λ máxima (nm)	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)
ANTRAQUINONA	pH 8	pH 8
Acid Black 48	657	14759
DIAZO		
Acid Orange 63	418	40394
Reactive Black 5	596	44226
AZO		
Orange II	485	23352
Tartrazine	425	28568
HETEROCICLO		
Azure B	645	50359
INDIGO		
Indigo Carmine	609	22711
TRIARILMETANO		
Cresol Red	434	22133

Los resultados obtenidos de los ensayos realizados en ausencia de mediador (Tabla 4.6) pusieron de manifiesto la ineficacia de SilA para decolorar la mayoría de los tintes textiles ensayados. En los casos en que se observó decoloración con la enzima, los porcentajes alcanzados estuvieron entre un 10 y un 30 %. Estos resultados podrían ser atribuidos al bajo potencial redox que presenta la enzima, o a la estructura química del propio tinte que en algunos casos podría condicionar su alto potencial redox, impidiendo su oxidación por la lacasa SilA. Anteriormente, ya se había demostrado la ineficacia de SilA en la decoloración de un colorante de tipo azo como el Orange II (Molina-Guijarro *et al.*, 2009).

Estos resultados son similares a los obtenidos en ensayos de decoloración de tintes sintéticos por la lacasa purificada de *Trametes versicolor* (Forootanfar *et al.*, 2012) y de colorantes de tipo azo por la lacasa de *Streptomyces cyanescens* (Moya *et al.*, 2010).

Para aumentar el potencial oxidativo de la lacasa SilA frente a los tintes textiles, se utilizaron como mediadores los tres compuestos fenólicos previamente seleccionados, AS, SA y MeS. Los resultados obtenidos tras el tratamiento con el sistema SilA-acetosiringona mostraron porcentajes de decoloración que oscilaron entre el 10 y el 20% para la mayor parte de los tintes ensayados, excepto en el caso de los colorantes Reactive Black 5, Orange II e Indigo Carmine, frente a los cuales el sistema demostró ser especialmente efectivo, alcanzándose porcentajes de decoloración superiores al 90 %. Los porcentajes de decoloración obtenidos con el sistema SilA-siringaldehído fueron inferiores a los alcanzados utilizando la acetosiringona como mediador, observándose incluso una total ineficacia frente al colorante Acid Orange 63. El siringato de metilo permitió obtener porcentajes de decoloración superiores a los obtenidos con el sistema SilA-AS para la mayoría de los tintes ensayados, excepto en el caso de los colorantes Orange II y Azure B (Tabla 4.6). Estos resultados concuerdan con la capacidad desactivante de los grupos sustituyentes en la posición *para*, que son el aldehído (SA) con mayor poder desactivante, seguido de la cetona (AS) y por último el éster (MeS) con menor poder desactivante del anillo. Se ha descrito que el potencial de un compuesto fenólico será menor cuanto mayor sea el número de sustituyentes de tipo metoxilo, favoreciendo la actividad de la enzima (Xu, 1996). Esto podría explicar el por qué el MeS y la AS son los compuestos más idóneos como mediadores. La ineficacia de otros compuestos fenólicos naturales como mediadores podría estar relacionada con factores como el pKa que determina la facilidad con que un compuesto pueda ser oxidado o no en determinadas condiciones (Camarero *et al.*, 2005; d'Acunzo y Galli, 2003).

Hay que tener en cuenta también la estructura del colorante, la cual influye en la capacidad de la enzima y del sistema lacasa-mediador para oxidarlo. La heterogeneidad estructural de los colorantes afecta a la distribución electrónica y a la densidad de carga, lo que a su vez podría

Tabla 4.6. Porcentajes de degradación de tintes sintéticos de distinta naturaleza por la lacasa SilA en presencia o ausencia de 0.1 mM de los mediadores acetosiringona, siringaldehído y siringato de metilo, durante 24h a 35 °C.

Colorante	SilA	SilA-AS	SilA-SA	SilA-MeS
ANTRAQUINONA				
Acid Black 48	0	18.53	1.66	22.10
DIAZO				
Acid Orange 63	0	3.8	0	13.95
Reactive Black 5	29.33	90	35.86	94.32
AZO				
Orange II	14.2	90	86.8	88.89
Tartrazine	9.2	19.2	10.4	20.97
HETEROCICLO				
Azure B	0	13	12.41	10
INDIGO				
Indigo Carmine	27.33	96	93.77	98.35
TRIARILMETANO				
Cresol Red	12.04	8	8.35	12.33

estar relacionado con el potencial redox de los mismos (Ciullini *et al.*, 2008). En general, colorantes con estructuras más sencillas y con menor peso molecular presentan tasas de decoloración mayores.

Asimismo, la presencia de un grupo naftaleno hidroxilado facilita la acción oxidativa de la enzima sobre el colorante como en el caso del Orange II (Almansa *et al.*, 2004), al igual que la presencia de grupos metilo considerados donadores de electrones. Por otro lado, los grupos cloro, carboxilo, $-\text{SO}_3\text{H}$ o $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ son desactivantes del anillo, dificultando la oxidación por parte de la enzima (Hsueh *et al.*, 2009; Xu, 1996).

Es importante señalar que las cinéticas de decoloración de los tintes ensayados siguen dos patrones de degradación, tal como se muestra en la Figura 4.13. Uno de estos patrones se corresponde con el obtenido en el caso del colorante Orange II, en el que se observa que la cinética de decoloración fue muy rápida durante las primeras horas, alcanzando su máximo en torno a los primeros 30 o 60 minutos. A partir de ese momento, la velocidad decaer manteniéndose relativamente constante durante el resto del periodo de incubación (Figura 4.13 A). En el segundo modelo que corresponde a la degradación del Tartrazine por el sistema SiA-mediador, se puede observar que en el caso del sistema SilA-MeS la velocidad de decoloración aumenta gradualmente a lo largo de las 24 h, mientras que con el sistema SilA-AS la velocidad de decoloración aumenta hasta las 4 h de

incubación, momento a partir del cual comienza a disminuir progresivamente (Figura 4.13 B).

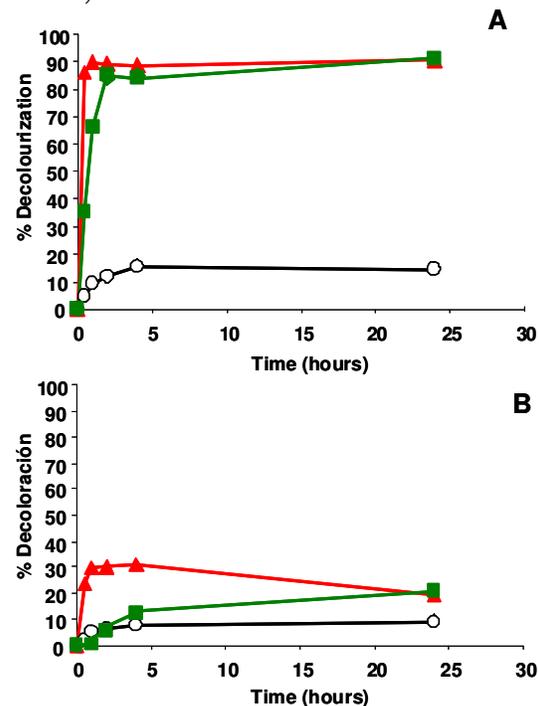


Figura 4.13. Cinéticas de decoloración del Orange II (A) y Tartrazine (B) con la lacasa SilA en ausencia (línea negra) o presencia de los mediadores AS (línea roja) o MeS (línea verde).

Para completar el estudio, se realizó un análisis por cromatografía de HPLC-DAD de los dos tintes ensayados antes y después del tratamiento. Los resultados de este análisis corroboraron los previamente obtenidos mediante espectrofotometría.

4.6.1.2. Ensayos *in vivo* con los radicales $\cdot\text{OH}$

Una vez demostrada la capacidad de *S. ipomoea* para generar radicales hidroxilo mediante ciclos redox de quinonas, se llevó a cabo un ensayo de degradación de los tintes textiles Acid Orange 63 y Orange II.

En relación con este tema, se tienen referencias de otros estudios de degradación llevados a cabo mediante generación de radicales hidroxilo utilizando micelio de distintos hongos ligninolíticos, en los que se ha comprobado su eficacia sobre compuestos contaminantes como BTEX, compuestos clorados y tintes sintéticos (Aranda *et al.*, 2010; Gómez-Toribio *et al.*, 2009b; Marco-Urrea *et al.*, 2009; Marco-Urrea *et al.*, 2010c).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, ponen asimismo de manifiesto la efectividad del sistema SilA-mediador para degradar los tintes textiles Orange II y Tartrazine, con una efectividad del 99 % (Figura 4.14, A) y del 78 % (Figura 4.14 B), respectivamente. Se pudo observar asimismo, que en tan sólo 30 minutos se consigue una degradación del 40 % de ambos tintes, demostrándose así no sólo la efectividad del sistema sino también su rapidez de actuación.

El análisis mediante cromatografía de HPLC-DAD de los tintes tanto antes como después del tratamiento con radicales hidroxilo, mostró cambios en los tiempos de retención de los mismos después de 24 h de tratamiento. Este cambio, junto con las diferencias observadas en los espectros respecto a los correspondientes a los tintes de partida, podría atribuirse a la modificación que sufren los mismos tras ser oxidados y por tanto, los nuevos picos que se detectaron en los cromatogramas se corresponderían con los productos de degradación de los tintes por efecto de los radicales hidroxilo (datos no mostrados). Aún así, resultaría interesante la identificación de los compuestos intermediarios del proceso de oxidación, puesto que en otros estudios de oxidación y biooxidación avanzada se ha observado que algunos de esos intermediarios se corresponden con hidroquinonas provenientes de la degradación de los tintes.

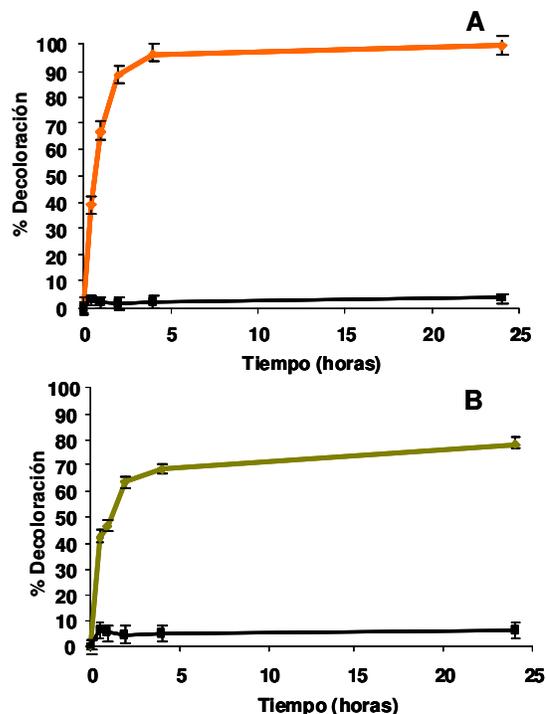


Figura 4.14. Cinética de degradación de los tintes Orange II (A) y Tartrazine (B) tras su tratamiento con el ciclo redox de quinona con *S. ipomoea* y los controles en ausencia del microorganismo (líneas negras)

Como consecuencia, la generación de hidroquinonas podría conducir al establecimiento de ciclos redox paralelos que continuarían el proceso oxidativo aumentando así los niveles de degradación del compuesto contaminante (Alnaizy y Akgerman, 2000; Gómez-Toribio *et al.*, 2009a; Vinodgopal y Peller, 2003)

4.6.2. Degradación de fármacos

Actualmente, se está produciendo en la sociedad una creciente preocupación sobre la degradabilidad de distintos fármacos considerados como contaminantes emergentes en las aguas residuales, como es el caso del antiepiléptico Carbamazepina o de los antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas, Ciprofloxacina y Norfloxacina, cuyas estructuras se presentan en el Anexo II. Diversos estudios han demostrado que una cantidad significativa de estas últimas, es excretada a través de la orina, llegando de forma inalterada al medio ambiente. Las fluoroquinolonas generalmente son insolubles en agua debido a la presencia de grupos ácidos

y básicos en su estructura. Estos agentes antimicrobianos presentan propiedades anfotéricas, con valores de pKa comprendidos entre 5 y 6.3 para el ácido carboxílico y entre 7.6 y 9.3 para el grupo distal amino. Estos compuestos tienden a ser más solubles en agua a valores de pH ácidos o básicos, siendo mínimamente solubles en el rango de la neutralidad. No obstante, en condiciones ácidas estos compuestos suelen precipitar más fácilmente (Sárközy, 2001). Asimismo, las fluoroquinolonas han demostrado tener una baja biodegradabilidad debido a la fuerte unión que presentan con otras sustancias sólidas o incluso con las heces humanas. En los últimos años, se han desarrollado varios métodos para eliminar las fluoroquinolonas presentes en las aguas residuales. La habilidad de los hongos para eliminar o incluso mineralizar contaminantes recalcitrantes tales como las fluoroquinolonas, ha sido demostrada en algunos hongos de podredumbre parda (33 % de degradación) (Wetzstein *et al.*, 1999) o de podredumbre blanca, como por ejemplo con *Trametes versicolor*, con el que se consiguieron porcentajes de degradación de la Ciprofloxacina y Norfloxacina en torno al 90 % (Prieto *et al.*, 2011).

Debido a que las fluoroquinolonas fueron diseñadas para ser excretadas por la orina, y a que las aguas residuales de las plantas de tratamiento donde permanecen inalterables estos fármacos presentan un pH básico, se suscitó nuestro interés por comprobar si los sistemas oxidativos seleccionados eran capaces de actuar sobre los contaminantes emergentes.

4.6.2.1. Ensayos *in vitro* con el sistema SilA-mediador

Para este estudio se seleccionaron como mediadores aquellos que habían presentado una mayor efectividad en los ensayos anteriores, es decir la acetosiringona y el siringato de metilo. Los ensayos de degradación se realizaron a tres concentraciones distintas de mediador 0.1, 0.3 y 0.5 mM. Previamente, se estudió la capacidad de la enzima SilA por sí sola para degradar los antimicrobianos, no observándose prácticamente ningún efecto sobre los mismos, lo cual puso de nuevo de manifiesto la necesidad de un mediador redox para producir su degradación. Resultados similares se han

obtenido en otros estudios llevados a cabo con una lacasa fúngica que únicamente produjo la degradación de fluoroquinolonas en presencia de ABTS como mediador (Prieto *et al.*, 2011).

Tabla 4.7. Porcentajes de degradación de las dos fluoroquinolonas obtenidos con SilA y distintas concentraciones de acetosiringona durante 24 h a 35 °C y pH 8.

Concentración de AS (mM)	Porcentajes de degradación	
	Ciprofloxacina	Norfloxacina
0.1	14.4	15.04
0.3	61.31	64.41
0.5	92.99	93.22

Los resultados obtenidos tras los ensayos llevados a cabo con el sistema SilA-mediador, mostraron que a medida que se incrementa la concentración del mediador se produce una mayor degradación de la fluoroquinolona, obteniéndose porcentajes de degradación del 90 % con la máxima concentración de AS ensayada (Tabla 4.7).

Tabla 4.8. Porcentajes de degradación de las dos fluoroquinolonas obtenidos con SilA y distintas concentraciones de siringato de metilo durante 24 h a 35 °C y pH 8.

Concentración de MeS (mM)	Porcentajes de degradación	
	Ciprofloxacina	Norfloxacina
0.1	1.15	0
0.3	2.19	8.93
0.5	19.04	21.91

Sin embargo, cuando se utilizó como mediador el siringato de metilo, aunque se observó que al aumentar la concentración del mismo aumentaba la tasa de degradación de la quinolona, los porcentajes máximos de degradación alcanzados, estuvieron en torno al 20 % (Tabla 4.8), a pesar de que este compuesto ha demostrado ser especialmente efectivo en la oxidación de las unidades no fenólicas de la lignina con tasas de conversión en torno al 60 % (Rosado *et al.*, 2012).

Las diferencias en el comportamiento de los mediadores pudieran estar condicionadas por el potencial redox de los compuestos a degradar, como ya se han mencionado anteriormente.

Una vez seleccionada la AS como el mejor mediador y 500 μ M como la concentración óptima para degradar ambas fluoroquinolonas,

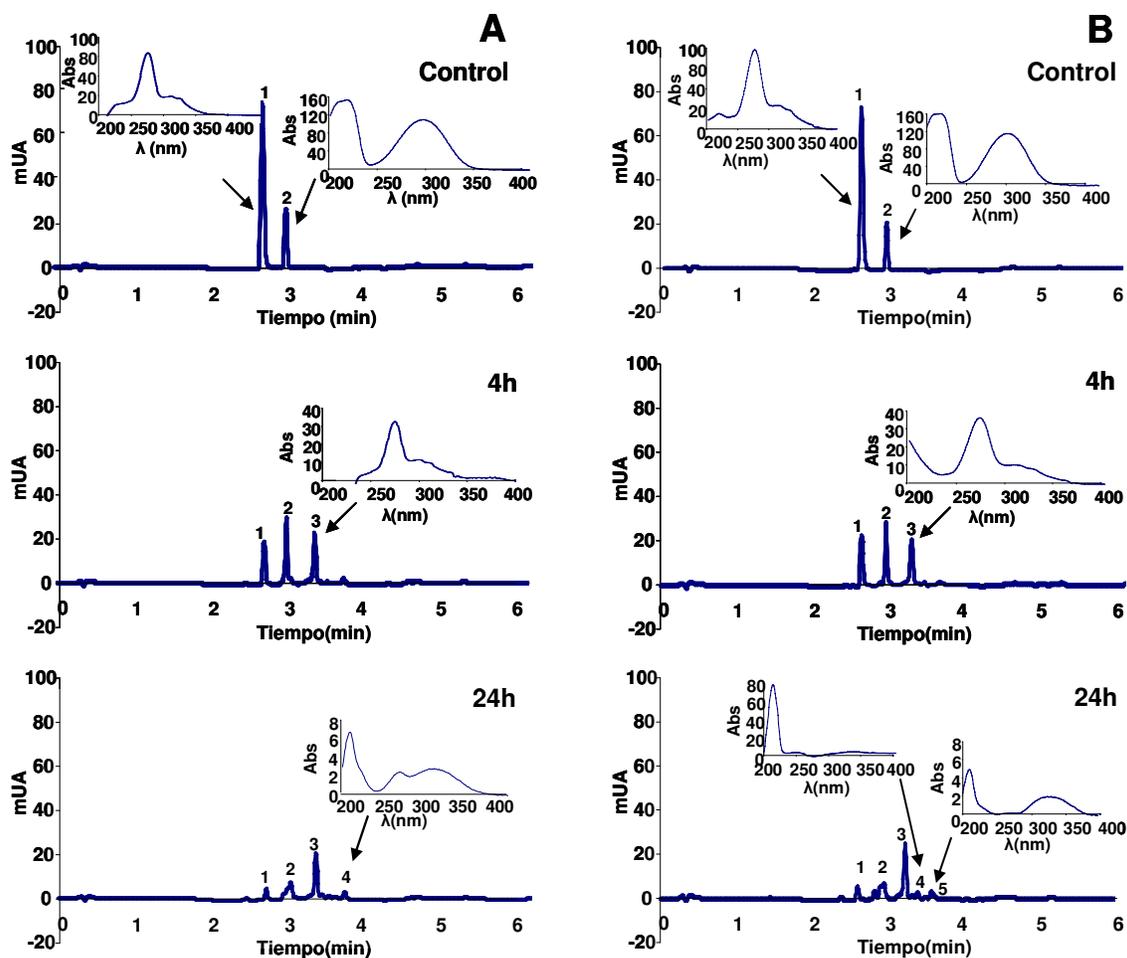


Figura 4.15. Perfiles cromatográficos de los controles y de los productos de degradación obtenidos tras 24 h de tratamiento de Ciprofloxacina (A) y Norfloxacina (B) con el sistema SilA-AS. Los cromatogramas se obtuvieron a los tiempos 0 (control), 4 y 24 h. Gráfica A, pico 1: Ciprofloxacina; pico 2: AS; pico 3: producto de degradación de la Ciprofloxacina; pico 4: productos de degradación. Gráfica B, pico 1: Norfloxacina; pico 2: AS; pico 3: producto de degradación de Norfloxacina; picos 4 y 5: productos de degradación.

se llevó a cabo un estudio para conocer los perfiles de degradación de la Ciprofloxacina y Norfloxacina. Los perfiles cromatográficos de elución obtenidos a 270 nm de ambas fluoroquinolonas, antes y después del tratamiento con el sistema SilA-AS, se muestran en la Figura 4.15. Ciprofloxacina y Norfloxacina eluyeron a 2.6 y 2.7 minutos, respectivamente, y la AS a 2.9 min. En todos los casos, las mayores tasas de degradación se obtuvieron durante las primeras 4 horas. Al final de este periodo, los porcentajes de degradación alcanzados fueron del 76.1 % y 71.3 % para la Ciprofloxacina y la Norfloxacina, respectivamente (Figura 4.15, 4 h, A y B). De hecho, la velocidad de las reacciones de degradación de ambos antimicrobianos durante las primeras 4 h de tratamiento se

estimaron en $5.76 \mu\text{M h}^{-1}$ para la Ciprofloxacina y $4.69 \mu\text{M h}^{-1}$ para la Norfloxacina. A partir de este punto, la velocidad de reacción sufrió una notable reducción hasta $0.45 \mu\text{M h}^{-1}$ para ambas fluoroquinolonas.

Los análisis mediante HPLC-DAD mostraron la aparición de nuevos picos cromatográficos tras 24 h de tratamiento enzimático de las dos fluoroquinolonas (Figura 4.15, 24 h, A y B). El pico 3 con un tiempo de retención de 3.2 min presentaba un espectro de absorción UV/Vis muy similar al de las fluoroquinolonas sin tratar. También se detectaron otros picos cromatográficos con tiempos de retención de 3.7 min (pico 4) en el perfil cromatográfico de la Ciprofloxacina (Figura 4.15, A, 24 h) y de 3.4

(pico 4) y 3.7 min (pico 5) en los perfiles de la Norfloxacin (Figura 4.15, B, 24 h). Los picos que presentaron espectros diferentes de los compuestos de partida, podrían corresponderse con productos de degradación de los antimicrobianos y/o del mediador. Los otros picos cromatográficos que presentaban espectros de absorción UV/Vis bastante similares a los de los compuestos antimicrobianos originales, podrían deberse a la oxidación del sustituyente piperazinil de las fluoroquinolonas, lo cual ha sido previamente descrito en otros estudios como uno de los primeros pasos en la degradación de estos compuestos (Maia *et al.*, 2014; Prieto *et al.*, 2011). De los resultados obtenidos, se podría concluir por tanto, que las fluoroquinolonas podrían haber sido degradadas tras 24 h de tratamiento. Sin embargo, en todos los casos, las mayores tasas de degradación se obtuvieron durante las primeras 4 h cuando la velocidad de degradación era máxima. La cinética de reacción es un factor importante a tener en cuenta para la implementación de sistemas biológicos en las industrias. El hecho de conseguir las tasas máximas de degradación en sólo 4 h podría suponer una ventaja comparado con otros procesos de biodegradación ya descritos. No obstante, algunos estudios llevados a cabo con otros modelos microbianos lograron también buenos resultados. Así por ejemplo, la lacasa fúngica producida por *Pestalotiopsis guepini* o el consorcio bacteriano formado por *Labrys portucalensis*, *Rhodococcus* sp FP1 y *Rhodococcus* sp S2 consiguió degradar la Ciprofloxacina en un 68 y 96 % tras 18 y 19 días de tratamiento, respectivamente (Maia *et al.*, 2014; Parshikov *et al.*, 2001).

Mediante la utilización de técnicas fisicoquímicas es posible alcanzar tasas de degradación más rápidas entre 20 minutos y 2 h. Por ejemplo, se ha demostrado que la Ciprofloxacina puede ser degradada en un 53 % en 30 min mediante técnicas de fotodegradación, en un 80 % a través de procesos de adsorción e incluso se han obtenido tasas del 95 % de degradación del mismo compuesto en tan solo 60 min mediante ozonización (Homem y Santos, 2011; Wammer *et al.*, 2013). No obstante, el alto coste, la cantidad de energía requerida para algunas de estas técnicas y la generación de nuevos residuos

por parte de otras, suponen grandes inconvenientes. Estos problemas podrían ser solventados mediante la aplicación de nuevas estrategias biotecnológicas, tales como el sistema SilA-mediador seleccionado en este trabajo, el cual es capaz de conseguir grandes porcentajes de degradación de las fluoroquinolonas Ciprofloxacina y Norfloxacin en cortos periodos de tiempo.

Cabe señalar que mientras las fluoroquinolonas se degradaron en un 75 % tras 4 h de tratamiento, en ese tiempo la concentración del mediador permaneció constante (Figura 4.16). No obstante, tras 24 h fue posible observar la degradación completa de las fluoroquinolonas, así como la del mediador, con una aparición paralela de nuevos picos cromatográficos cuyos espectros de absorción fueron diferentes de los de la Ciprofloxacina, Norfloxacin y AS. Estos resultados se pusieron también de manifiesto en los ensayos de degradación de los tintes textiles, tanto con el sistema SilA-AS como con la lacasa de *S. cyaneus* en presencia de AS (Moya *et al.*, 2010). El hecho de que la AS se degrade una vez que la fluoroquinolona se ha degradado completamente, pudiera ser debido a que como el mediador no pudo ser reducido por el antimicrobiano podría haberlo sido por acción de la lacasa, y sea este hecho la consecuencia de la aparición de nuevos picos cromatográficos en el cromatograma (resultados no mostrados).

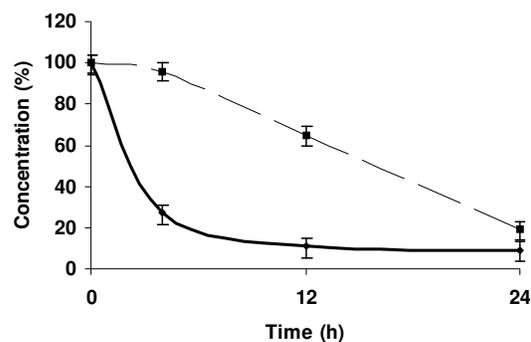


Figura 4.16. Variación en las concentraciones de Ciprofloxacina (línea sólida) y AS (línea discontinua) durante el tratamiento con el sistema SilA-AS. Las concentraciones fueron calculadas a partir del área de los picos cromatográficos a 270 nm de muestras incubadas durante 4, 12 y 24 horas.

Por otro lado, la eficacia del sistema lacasa-acetosiringona quedó igualmente probada en la degradación de la Carbamazepina. Este fármaco

antiepiléptico presenta un pKa neutro y una solubilidad en agua de aproximadamente 18 mg L⁻¹ a 25 °C. En torno a un 72 % del fármaco es metabolizado y excretado por vía urinaria mientras que un 28 % permanece inalterado y es excretado por vía fecal (RxList, 2006). En las plantas de tratamiento de aguas residuales tan solo se consigue eliminar un 10 % de la Carbamazepina, el resto del fármaco continúa su trayecto hasta alcanzar cursos de aguas naturales como ríos, lagos o incluso acuíferos (Heberer, 2002). Debido a la elevada persistencia de la Carbamazepina en aguas (Tixier *et al.*, 2003), se ha sugerido su utilización como marcador antropogénico en aguas (Clara *et al.*, 2004).

La capacidad de los hongos para eliminar o incluso mineralizar contaminantes recalcitrantes se ha demostrado también en la degradación de la Carbamazepina. Son varios los estudios llevados a cabo con hongos ligninolíticos para la degradación de fármacos. Así, en un estudio de degradación de Carbamazepina llevado a cabo con dos cepas de *Pleurotus* y un hongo basidiomiceto denominado BNI, se observó la capacidad tan sólo de esta última cepa para degradar dicho fármaco en un 47 % tras 28 días de incubación (Santos *et al.*, 2012). También se ha demostrado la eficacia de un sistema constituido por una lacasa de *Trametes versicolor* y HBT como mediador en la degradación de este fármaco, alcanzándose niveles de degradación del 60 % tras 48 h de tratamiento, añadiendo el mediador cada 8 h (Hata *et al.*, 2010).

La aplicación de especies bacterianas en el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de contaminantes recalcitrantes presenta ciertas ventajas con respecto a los hongos, tales como, su mayor tolerancia a condiciones extremas y su rápido crecimiento sobre una gran variedad de sustratos. Sin embargo, en la mayoría de las bacterias utilizadas, las enzimas ligninolíticas relevantes para dichos procesos de biorremediación, como es el caso de las lacasas, se localizan intracelularmente, lo que supone un gran impedimento en la degradación de contaminantes. No obstante, bacterias del género *Streptomyces* entre las que destacan *S.*

cyaneus, *S. psammoticus*, *S. griseus* y principalmente *S. ipomoea*, microorganismo de nuestro estudio, producen lacasas extracelulares. Este hecho, junto con la tolerancia de SilA a elevadas concentraciones de sales como NaCl, y la estabilidad de su actividad en rangos de pH alcalinos (7-8), similares a los que presentan las aguas residuales, dotan a este microorganismo de una serie de ventajas con vistas a su utilización en procesos de biorremediación (Arias *et al.*, 2003; Endo *et al.*, 2002; Molina-Guijarro *et al.*, 2009; Niladevi *et al.*, 2008; Margot *et al.*, 2013).

La aplicación del sistema SilA-AS en la degradación de Carbamazepina ha demostrado ser eficaz consiguiéndose rendimientos de degradación superiores al 50 % de la concentración inicial del fármaco en 24 h, con la ventaja adicional que supone utilizar un mediador natural de bajo coste y carente de toxicidad. Sin embargo, se pudo observar que tras dos horas de tratamiento, ya se alcanzaron prácticamente los niveles máximos de degradación (45%), tiempo en el que la velocidad enzimática de reacción era también máxima (Figura 4.17).

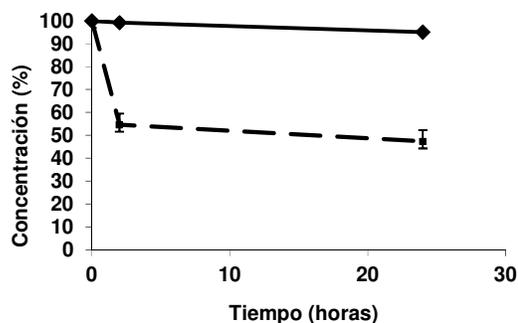


Figura 4.17. Cinética de degradación de la Carbamazepina durante su tratamiento con el sistema SilA-acetosiringona 0.1 mM. (línea continua: Carbamazepina; línea discontinua: control con enzima inactivada por calor).

Cabe por último señalar que, aunque se han descrito otras lacasas alcalinas, es la primera vez que se pone de manifiesto la efectividad de este tipo de enzimas producidas por *Streptomyces* en la degradación de contaminantes emergentes. El análisis mediante cromatografía de HPLC-DAD de los productos obtenidos a partir de la

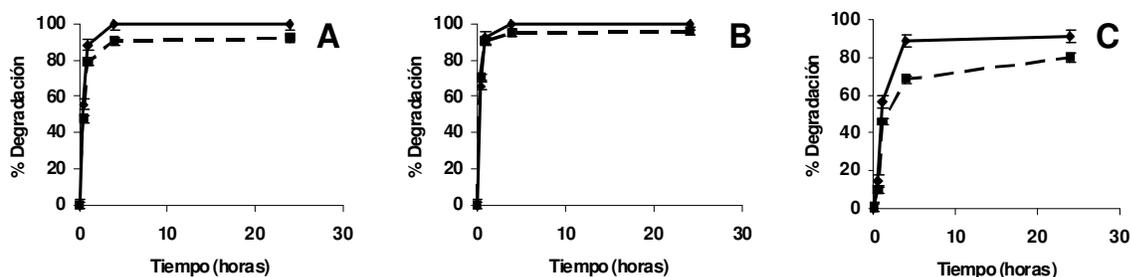


Figura 4.18. Cinética de degradación de la Ciprofloxacina (A), Norfloxacina (B) y Carbamazepina (C) tras su tratamiento con los radicales $\cdot\text{OH}$ (línea continua: fármaco; línea discontinua: 2,6-DBQ).

degradación del fármaco con el sistema SilA-AS, reveló la aparición de nuevos picos cromatográficos probablemente resultantes de su degradación (datos no mostrados).

Este estudio permite deducir que para obtener el máximo beneficio de la capacidad oxidativa de los sistemas lacasa-mediador, se hace necesaria la búsqueda de un equilibrio entre las principales variables implicadas en la degradación de los distintos contaminantes, como, el tiempo de reacción, la concentración de enzima, la concentración de mediador, etc.

4.6.2.2. Ensayos *in vivo* con los radicales $\cdot\text{OH}$

Al igual que en el caso de los tintes textiles, la aplicación de sistemas de oxidación avanzada también ha demostrado ser eficaz en la degradación de un amplio rango de fármacos presentes en aguas residuales. La eliminación de contaminantes emergentes como las fluoroquinolonas y la Carbamazepina supone un reto en la investigación actual. Se ha demostrado que durante los tratamientos biológicos convencionales estos fármacos son eliminados solo parcialmente, con eficiencias inferiores al 20 % (Zhang *et al.*, 2008). Por otro lado, procesos fisicoquímicos, tales como, coagulación-floculación o flotación, aunque consiguen aumentar los porcentajes de eliminación de estos compuestos, siguen siendo insuficientes para eliminarlos completamente (Carballa *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2008). Sin embargo, los procesos de oxidación avanzada tales como, la degradación mediante UV/H₂O₂, la degradación fotocatalítica con TiO₂ o la ozonización han mostrado su capacidad para eliminar grandes cantidades de Carbamazepina (> 90 %) (Doll y Frimmel, 2005; Esplugas *et al.*, 2007; Ternes *et*

al., 2002; Vogna *et al.*, 2004) y de fluoroquinolonas (Balcioglu *et al.*, 2003; de Witte *et al.*, 2010). Ahmed y Chiron llegaron a conseguir la mineralización de la Carbamazepina en 30 min mediante fotofenton en combinación con persulfato como oxidante (PS/Fe(II)/UV-Vis). No obstante, como ya se ha mencionado con anterioridad, estos procesos oxidativos presentan ciertos inconvenientes, entre los que cabe destacar, principalmente, la formación de productos de degradación más tóxicos que los compuestos de partida (Negrón-Encarnación y Arce, 2007). La combinación de procesos de oxidación avanzada junto con microorganismos ligninolíticos capaces de inducir la producción de radicales $\cdot\text{OH}$ ha demostrado su eficacia también en la degradación de contaminantes emergentes como los fármacos. Marco-Urrea *et al.* (2010c) demostraron la posibilidad de oxidar y degradar la Carbamazepina en un 80 % mediante la utilización de enzimas ligninolíticas (lacasas y peroxidasas) en combinación con la 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DBQ) y Fe³⁺-oxalato.

El ensayo de degradación de las dos fluoroquinolonas y la Carbamazepina mediante radicales $\cdot\text{OH}$, demostró la capacidad del sistema para degradar los tres fármacos. Sin embargo, la concentración inicial del compuesto a degradar hubo de ser 8 veces inferior a la concentración que se pretendía elucidar en un principio, debido a que las fluoroquinolonas a una concentración de 400 μM presentaban una toxicidad que afectaba a la viabilidad de *S. ipomoea* y por tanto, al establecimiento de ciclos redox. Por este motivo se decidió realizar el ensayo de degradación con una concentración final de los fármacos de 50 μM , obteniéndose porcentajes

de degradación del 100 % para las dos fluoroquinolonas y del 90 % para la Carbamazepina (Figura 4.18). Ambas fluoroquinolonas fueron degradadas en más de un 80 % tras 1 hora de tratamiento, siendo totalmente eliminadas tras 4 h. En el caso de la Carbamazepina, se necesitaron 24 h para conseguir degradar el fármaco casi por completo. Como se puede apreciar en la figura, se produjo una desaparición de la quinona paralela a la degradación de los compuestos contaminantes. La alta reactividad de los radicales $\cdot\text{OH}$ aumenta el rango de compuestos susceptibles de ser degradados. Esta reactividad se traduce también en un aumento en los porcentajes de degradación de los contaminantes pero, debido a la baja selectividad de estos radicales, las quinonas también sufren el ataque de los mismos pudiendo llegar a ser eliminadas por completo. Como resultado de la desaparición de la quinona, se interrumpe la producción de radicales $\cdot\text{OH}$ ralentizándose o incluso llegando a detenerse también la degradación del compuesto contaminante.

Al igual que en el ensayo de degradación de las fluoroquinolonas Ciprofloxacina y Norfloxacina mediante el sistema lacasa-mediador, en el análisis mediante cromatografía de HPLC-DAD de los productos de degradación tras su tratamiento con los radicales $\cdot\text{OH}$, se pudo observar la desaparición del pico cromatográfico correspondiente al compuesto de partida y la aparición de nuevos picos con espectros similares a los compuestos originales o al de la quinona utilizada (datos no mostrados).

En el caso de la Carbamazepina también aparece algún pico cromatográfico nuevo, pero con un espectro que difiere bastante del correspondiente al compuesto de partida. Diferentes estudios sobre la degradación de la Carbamazepina han llegado a detectar más de 15 intermediarios diferentes del fármaco, tras ser sometido a procesos de oxidación avanzada. Se ha descrito que inicialmente tiene lugar una oxidación mediante la transferencia de un electrón seguido de un proceso de hidroxilación dando lugar a las formas hidroxiladas 2-, 3-, 4- y 7- de la Carbamazepina

(Ahmed y Chiron, 2014; Mandrioli *et al.*, 2001; Marco-Urrea *et al.*, 2010c; Pearce *et al.*, 2002).

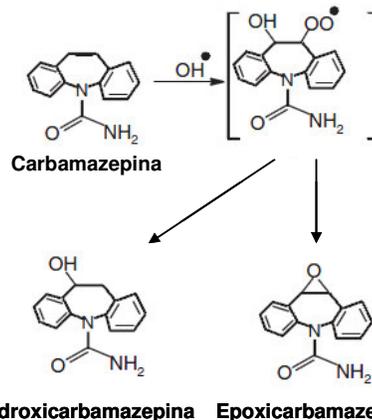


Figura 4.19. Posibles rutas de degradación de la Carbamazepina por acción de los radicales $\cdot\text{OH}$ generados mediante la reacción de Fenton (Mohapatra *et al.*, 2013).

En la Figura 4.19 se muestra una posible ruta de degradación de la Carbamazepina tras ser sometida a la acción de los radicales $\cdot\text{OH}$ generados por el mecanismo de Fenton (Mohapatra *et al.*, 2013). No obstante, algunos autores sugieren que los intermediarios hidroxicarbamazepina y epoxicarbamazepina desaparecerían al final del tratamiento oxidativo (Ghauch *et al.*, 2011).

4.7. Análisis de la toxicidad de los contaminantes antes y después del tratamiento oxidativo

En la búsqueda de sistemas enzimáticos o métodos biológicos para su aplicación en procesos de biorremediación frente a contaminantes persistentes, no sólo interesa la capacidad de dichos sistemas para degradar los compuestos contaminantes, sino también su efectividad en la destoxificación de los mismos. Por tanto, el tratamiento de contaminantes con el sistema lacasa-mediador o con procesos microbianos de oxidación avanzada debe llevar implícito un análisis de la toxicidad, tanto de los compuestos originales de partida como de los productos de degradación. Este análisis se llevó a cabo por un lado, con el sistema Microtox® basado en la utilización de la bacteria marina

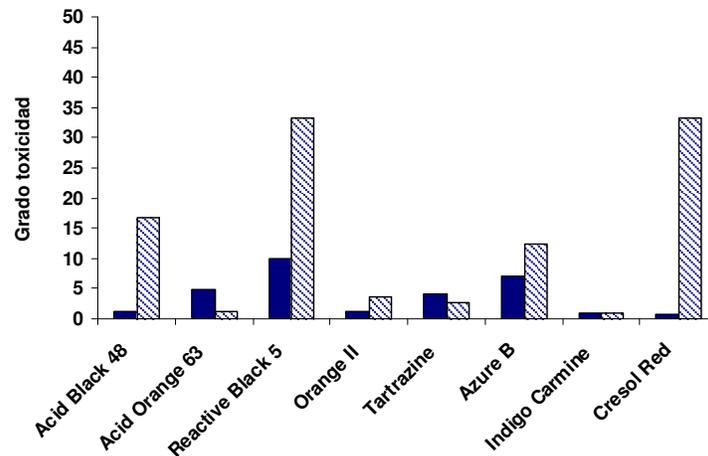


Figura 4.20. Grado de toxicidad determinado con el sistema Microtox y expresado como $(1/EC_{50}) \cdot 100$ de los tintes textiles antes (azul) y después (azul rayado) del tratamiento con el sistema SilA-acetosiringona.

bioluminiscente *Vibrio fischeri* y por otro, con el alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

4.7.1. Análisis de la toxicidad de los tintes textiles tras el tratamiento con el sistema SilA-mediador

Los resultados del análisis de toxicidad de los tintes llevado a cabo con el sistema Microtox®, antes y después del tratamiento con el sistema SilA-AS, se muestran en la Figura 4.20. Como se puede observar, los productos de decoloración mostraron una mayor toxicidad que los controles, excepto en el caso de los tintes Acid Orange 63 y Tartrazine. Estos resultados ponen de manifiesto que un proceso de degradación de un compuesto no siempre va acompañado de la destoxicación del mismo. Este hecho fue anteriormente demostrado por otros autores en ensayos de degradación de tintes textiles (Abadulla *et al.*, 2000; Gottlieb *et al.*, 2003; Tauber *et al.*, 2005). El aumento del grado de toxicidad de algunos tintes tras el tratamiento con el sistema enzimático, podría ser atribuido a los productos de degradación de los tintes o del mediador, la acetosiringona. Asimismo, se ha visto que este aumento de la toxicidad varía en función de la enzima utilizada y del mediador. Así, en el caso del Orange II, mientras que se ha conseguido una disminución en el grado de toxicidad tras el tratamiento con SilA-AS, en estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio con el mismo tinte y el mismo mediador, pero en presencia de la lacasa de *S. cyaneus*, se observó un aumento del grado de toxicidad tras el

tratamiento enzimático (Moya *et al.*, 2010), probablemente debido a la formación del compuesto 1-amino-2-naftol, como ocurre tras la hidrólisis de ciertos colorantes (Gottlieb *et al.*, 2003).

Para el análisis de toxicidad mediante el alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, se seleccionaron los colorantes Acid Orange 63 y Tartrazine que fueron los que mejores resultados mostraron tras el análisis con el sistema Microtox®. Esta alga verde puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos y representa un modelo idóneo para la evaluación de la toxicidad de contaminantes en aguas continentales. Los resultados de este segundo ensayo confirmaron los obtenidos mediante el sistema Microtox®, al observarse de igual modo una disminución en el grado de toxicidad de los colorantes Acid Orange 63 y Tartrazine tras su tratamiento con el sistema SilA-AS (Figura 4.21).

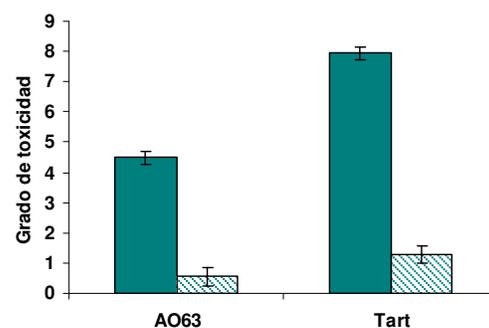


Figura 4.21. Grado de toxicidad determinado frente al alga *P. subcapitata* y expresado como $(1/EC_{50}) \cdot 100$ de los colorantes Acid Orange 63 (AO63) y Tartrazine (Tart) antes (verde sólido) y después (verde rayado) de 24h de tratamiento con el sistema SilA-acetosiringona.

4.7.2. Análisis de la toxicidad de los fármacos tras el tratamiento con el sistema SilA-mediador

El análisis de la toxicidad de las dos fluoroquinolonas tratadas con el sistema SilA-acetosiringona llevado a cabo con el sistema Microtox®, puso de manifiesto la destoxicación de la Norfloxacinina tras el tratamiento, pero no así la de la Ciprofloxacina (Figura 4.22). Por otro lado, el análisis de la toxicidad de la Carbamazepina antes y después del tratamiento, mostró que tanto el fármaco de partida como los productos de degradación del mismo presentan una toxicidad aguda muy baja para *Vibrio* (Figura 4.22), aunque cabe destacar un ligero aumento del grado de toxicidad tras el tratamiento enzimático.

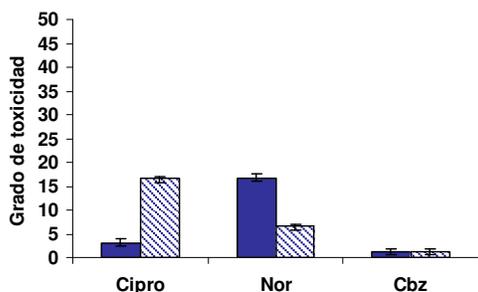


Figura 4.22. Grado de toxicidad determinado con el sistema Microtox y expresado como $(1/EC_{50}) \cdot 100$ de las dos fluoroquinolonas y la Carbamazepina antes (azul sólido) y después (azul rayado) de 24 h de tratamiento con el sistema SilA-acetosiringona.

De este análisis se pudo deducir que el grado de toxicidad aguda de estos tres fármacos, tanto antes como después del tratamiento, determinado por el sistema Microtox® resultó, en general, muy bajo.

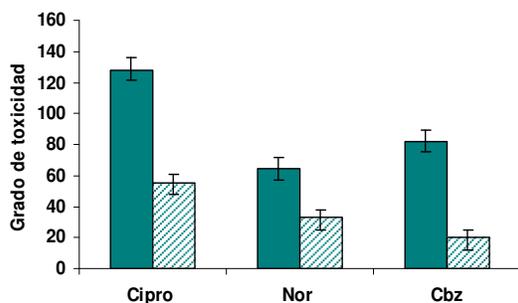


Figura 4.23. Grado de toxicidad determinado frente al alga *P. subcapitata* y expresado como $(1/EC_{50}) \cdot 100$ de la Ciprofloxacina, Norfloxacinina y Carbamazepina antes (verde sólido) y después (verde rayado) de 24 h de tratamiento con el sistema SilA-acetosiringona 0.5 mM.

Como se puede observar en la Figura 4.23, el análisis de toxicidad crónica de las mismas muestras frente al alga *P. subcapitata*, mostró en primer lugar, unos niveles de toxicidad de los compuestos de partida mucho mayores que los obtenidos mediante el sistema Microtox®.

También se pudo observar que tras el tratamiento enzimático se consiguió reducir los niveles de toxicidad de la Norfloxacinina y la Carbamazepina, siendo esta disminución mucho más acusada en el primer caso, donde el grado de toxicidad se redujo en un 90 %. No obstante, el patrón de destoxicación no fue el mismo para ambas fluoroquinolonas. Así, mientras que en el caso de la Norfloxacinina el proceso de destoxicación tuvo lugar a lo largo de las 24 h del tratamiento enzimático, la toxicidad de la Ciprofloxacina disminuyó sólo durante las primeras 4 h (dato no mostrado), aumentado posteriormente. Aún así, se observó que el grado de toxicidad de los productos de degradación de la Ciprofloxacina tras 24 h de tratamiento fue menor que el correspondiente al producto de partida. Esta diferencia podría atribuirse al menor grado de toxicidad de los productos de degradación del fármaco, generados durante el tratamiento enzimático. En la bibliografía también se han descrito otros casos de oxidación enzimática de contaminantes fenólicos y tintes textiles de tipo azo cuyos productos de degradación presentaban una toxicidad mayor que los compuestos originales (Gottlieb *et al.*, 2003; Molina-Guijarro *et al.*, 2009; Moya *et al.*, 2010).

Un dato importante a tener en cuenta es que a pesar de no conseguir una destoxicación completa de las fluoroquinolonas tras su tratamiento con el sistema SilA-AS, el grado de destoxicación alcanzado es mucho mayor que el obtenido tras tratamientos físico-químicos. De hecho, Homem y Santos (2011) comprobaron que a pesar de la eficacia de la ozonización como método para eliminar las fluoroquinolonas, los efluentes generados tras este proceso presentaban una toxicidad igual o mayor a la de los compuestos de partida.

4.7.3. Análisis de la toxicidad de los tintes textiles tras el tratamiento con radicales $\cdot\text{OH}$

El análisis de la toxicidad mediante el sistema Microtox® de los colorantes Orange II y Tartrazine tras ser sometidos al efecto de los radicales $\cdot\text{OH}$, mostró una disminución del grado de toxicidad de los dos tintes seleccionados. En el caso del Tartrazine, se observó al igual que ocurrió tras el tratamiento con el sistema SilA-AS una reducción de la toxicidad del compuesto.

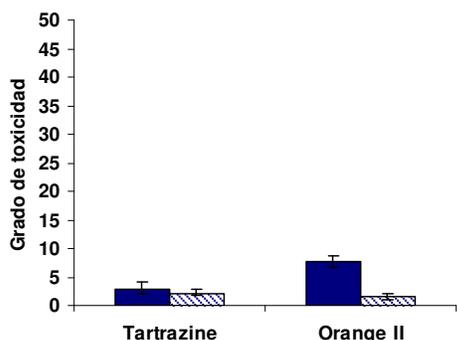


Figura 4.24. Grado de toxicidad determinado con el sistema Microtox t expresado como $(1/EC_{50}) \cdot 100$, de los tintes textiles Tartrazine y Orange II antes (azul sólido) y después (azul rayado) de 24 h de tratamiento con radicales hidroxilo generados mediante redox de quinonas.

Sin embargo, en el caso del Orange II mientras que el sistema SilA-AS no permitió la destoxicación del tinte, el tratamiento con radicales $\cdot\text{OH}$ demostró su capacidad no sólo para degradarlo en igual o mayor medida que el otro sistema, sino también para conseguir su destoxicación. No obstante, cabe señalar que la disminución de la toxicidad fue mucho más significativa en el caso del colorante Orange II, cuyo producto de decoloración presentó una toxicidad 5 veces inferior a la del colorante sin tratar (Figura 4.24).

El análisis de toxicidad llevado a cabo con el alga verde, puso de manifiesto una disminución muy significativa de la misma en los dos tintes tratados con los radicales $\cdot\text{OH}$, tal como se puede observar en la Figura 4.25. Sin embargo, aunque la toxicidad de los productos de degradación de ambos tintes industriales obtenidos tras el tratamiento con radicales $\cdot\text{OH}$ y determinados tanto con el sistema Microtox®

como con el alga *P. subcapitata*, fue menor que la de los productos de partida, cabe destacar que la toxicidad de estos compuestos no afecta de igual manera a los dos microorganismos utilizados en ambos ensayos. Así, se pudo observar una especial sensibilidad del alga verde frente a los tintes de partida que presentaban elevados niveles de toxicidad.

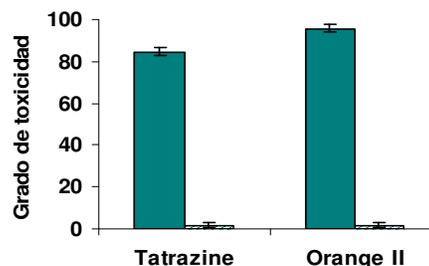


Figura 4.25. Grado de toxicidad determinado frente al alga *P. subcapitata* y expresado como $(1/EC_{50}) \cdot 100$ de los colorantes Tartrazine y Orange II antes (verde sólido) y después (verde rayado) de 24 h de tratamiento con el proceso microbiano de oxidación avanzada.

Sin embargo, en el caso de *Vibrio fischeri*, la toxicidad de estos tintes no le afectará en mayor medida, pudiendo ser considerados, con este sistema de medida, compuestos con una baja toxicidad aguda en agua. En estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio se puso de manifiesto la capacidad de los radicales $\cdot\text{OH}$ generados a través de ciclos redox de quinonas para decolorar y destoxicar varios tintes textiles de tipo azo (Moya, 2011). A pesar de la falta de estudios sobre decoloración y destoxicación de tintes a través de procesos de oxidación avanzada mediados por microorganismos, se ha podido demostrar la capacidad de los radicales hidroxilo generados mediante métodos físico-químicos, para destoxicar tintes textiles (Ledakowicz *et al.*, 2001; Selcuk, 2005). Asimismo, se ha demostrado la capacidad de los radicales hidroxilo para mineralizar distintos compuestos, lo cual podría explicar a su vez la disminución del grado de toxicidad tras el tratamiento oxidativo (Marco-Urrea *et al.*, 2009).

En cualquier caso, se puede concluir que el tratamiento microbiano de oxidación avanzada es capaz no solo de degradar los contaminantes

ensayados, sino también de producir su destoxificación en la mayor parte de los casos.

4.7.4. Análisis de la toxicidad de los fármacos tras el tratamiento con radicales $\cdot\text{OH}$

Por último, el análisis de la toxicidad a través del sistema Microtox® de los productos de degradación de ambas fluoroquinolonas y de la Carbamazepina, obtenidos mediante el tratamiento con radicales $\cdot\text{OH}$ producidos a través de ciclos redox de quinonas, puso de manifiesto un pronunciado aumento de la toxicidad de los productos de degradación de los tres fármacos, respecto de los controles. De hecho, el grado de toxicidad de estos productos respecto a sus respectivos controles llegó a duplicarse o incluso a triplicarse (Figura 4.26).

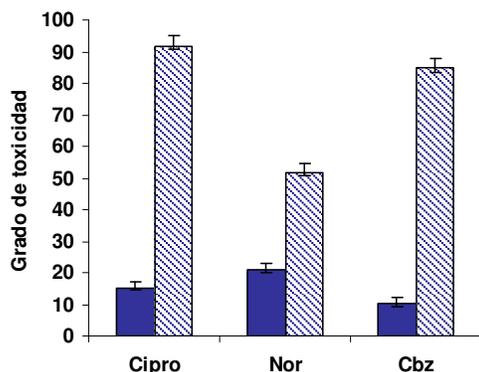


Figura 4.26. Grado de toxicidad determinado con el sistema Microtox® y expresado como $(1/EC_{50}) \cdot 100$ de las dos fluoroquinolonas y la Carbamazepina antes (azul sólido) y después (azul rayado) de 24 h de tratamiento con los radicales $\cdot\text{OH}$.

La baja toxicidad aguda de los compuestos de partida ya se observó en otros estudios, como el llevado a cabo por Mohapatra *et al.* (2013) donde la Carbamazepina mostró un grado de toxicidad muy inferior al de los productos de degradación de la misma (Mohapatra *et al.*, 2013). Asimismo, Joss *et al.* (2003) tras un estudio ecotoxicológico con 6 modelos diferentes concluyeron que no era esperable que la Carbamazepina presentara toxicidad aguda para la biota acuática. Una posible explicación del elevado grado de toxicidad de los productos de degradación de la Carbamazepina podría ser atribuido a que en procesos de oxidación avanzada se ha observado que tiene lugar la formación de

acridina y acridona, dos subproductos de la degradación de dicho fármaco, los cuales presentan una toxicidad superior a la del compuesto de partida (Vogna *et al.*, 2004; Chiron *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012; Donner *et al.*, 2013). No obstante, Ahmed y Chiron llegaron a conseguir la completa destoxificación de la Carbamazepina y sus subproductos tóxicos mediante el proceso de oxidación avanzada PS/Fe(II)/UV-Vis, que combina persulfato con foto-Fenton.

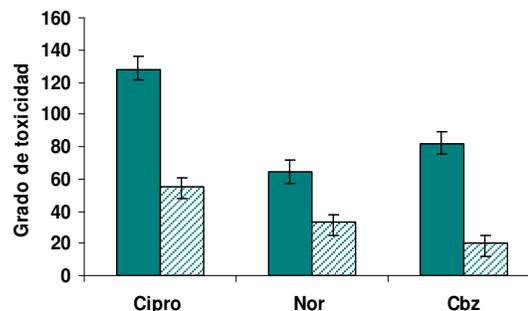


Figura 4.27. Grado de toxicidad determinado frente a la alga *P. subcapitata* y expresado como $(1/EC_{50}) \cdot 100$ de las dos fluoroquinolonas y la Carbamazepina antes (verde sólido) y después (verde rayado) de 24 h de tratamiento con los radicales $\cdot\text{OH}$.

El estudio toxicológico realizado con el alga *P. subcapitata* puso de manifiesto una toxicidad crónica de los compuestos de partida superior a la obtenida con *Vibrio*. Estos mismos resultados fueron obtenidos por Ferrari *et al.* (2003), quienes observaron una relativa limitada ecotoxicidad aguda de la Carbamazepina en comparación con los análisis de toxicidad crónica, donde se observaba un grado de toxicidad mayor para el mismo compuesto.

Se pudo comprobar que aunque la toxicidad de los compuestos de partida resultó más elevada en el ensayo realizado frente a la alga, la toxicidad de los productos de degradación de los tres fármacos determinada por este sistema, resultó muy inferior a sus controles respectivos (Figura 4.27). De hecho, en otros estudios toxicológicos realizados con diferentes algas, observaron una disminución en la concentración de la Carbamazepina debido a su interacción con el microorganismo (Andreozzi *et al.*, 2002), lo que podría contribuir en cierta medida a la disminución de la toxicidad de los productos de degradación de dicho fármaco. Se

podría concluir por tanto que el proceso microbiano de oxidación avanzada con *S. ipomoea* mediante ciclos redox de quinonas, resulta muy efectivo para la degradación de contaminantes recalcitrantes. A esto hay que añadir otras ventajas como el bajo coste del tratamiento, así como la rapidez del mismo consiguiéndose elevados porcentajes de degradación en 24 h o incluso menos. No obstante, habría que profundizar en el estudio de la toxicidad de estos fármacos y de los productos derivados de los mismos mediante la utilización de otros sistemas de análisis de toxicidad.

4.8. Aproximaciones al estudio de la función de la lacasa en la cepa productora

El conocimiento que se tiene sobre la función biológica de las lacasas es, en general, escaso. Se han atribuido a las lacasas funciones específicas en procesos de resistencia a metales pesados, biosíntesis de lignina en plantas, degradación de lignina en hongos y bacterias, procesos de pigmentación, formación de cuerpos fructíferos así como patogénesis en hongos, formación de melanina y síntesis de proteínas de la cubierta de la endospora en bacterias, etc. Si atendemos a las funciones que se han descrito para las lacasas en bacterias, cabe mencionar los casos de *Azospirillum lipoferum* cuya lacasa se ha implicado en la producción de melanina (Faure *et al.*, 1995), *Bacillus subtilis* cuya lacasa CotA se ha implicado en la producción de un pigmento pardo en la cubierta de la endospora (Martins *et al.*, 2002), *Streptomyces cyaneus*, cuya lacasa se ha

implicado en la degradación de la lignina (Arias *et al.*, 2003), *Bacillus pumilus* cuya lacasa se ha relacionado con procesos de pigmentación de esporas, resistencia a la luz UV y al peróxido de hidrógeno (Reiss *et al.*, 2011), *Myxococcus xanthus* productor de las proteínas CuoA, CuoB y CuoC implicadas en la resistencia al cobre (Sánchez-Sutil *et al.*, 2007) o la lacasa Epo A producida por *Streptomyces griseus*, la cual se la ha relacionado con procesos de morfogénesis y esporulación que tienen lugar durante el ciclo de vida del microorganismo (Endo *et al.*, 2003).

Dado el interés suscitado a lo largo de este trabajo por la lacasa Sil A de *S. ipomoea* y la escasez de estudios llevados a cabo con lacasas bacterianas, se planteó, a efectos comparativos, analizar la función o funciones desempeñadas por este enzima en la cepa productora. Para ello, se abordó en primer lugar, la obtención de un mutante no productor de actividad lacasa y el estudio de las posibles diferencias morfológicas, bioquímicas y/o moleculares con la cepa silvestre.

4.8.1. Obtención de un mutante no productor de lacasa de *S. ipomoea*

El mutante no productor de lacasa se obtuvo mediante la técnica de interrupción génica, tal como se ha indicado en el apartado 3.11.1. En la Figura 4.28 (A) se presenta la construcción del plásmido pOJ260-Sipo500, resultante de la clonación del producto de amplificación Sipo500 obtenido a partir de una fracción interna de la secuencia del gen de SilA de 500 pb (Figura 4.29 A).

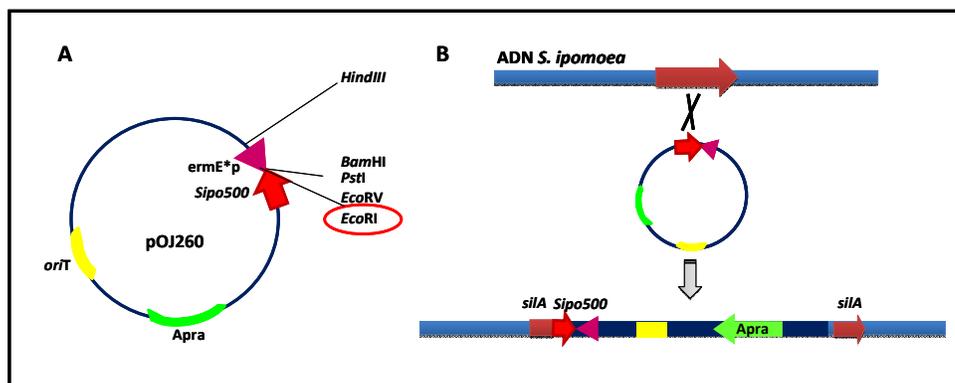


Figura 4.28. Construcción de pOJ260-Sipo500 (A) y esquema del proceso de inserción de la construcción en el genoma de *Streptomyces* mediante sobrecruzamiento sencillo (B).

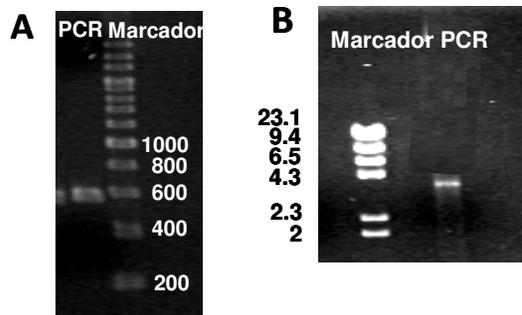


Figura 4.29. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de Sipo500 por PCR a partir del gen de la lacasa, para su clonación en el vector pOJ260 (A) y de la construcción pOJ260+Sipo500 (B).

En la Figura 4.28 (B) se presenta un esquema del proceso de obtención de la construcción plasmídica obtenida en el genoma de *S. ipomoea* mediante sobrecruzamiento sencillo.

A continuación, una vez comprobada la correcta inserción del fragmento Sipo500 en el vector pOJ260 (Figura 4.29 B), se utilizó éste para transformar mediante electroporación las células electrocompetentes de la cepa ET12567 (pUB307) de *E. coli*. Tras la transformación, se utilizaron esporas de *S. ipomoea* para llevar a cabo la conjugación con *E. coli*, seleccionándose posteriormente aquellas esporas portadoras de la mutación, gracias al gen de resistencia a la Apramicina presente en el plásmido pOJ260.

4.8.1.1. Comprobación de la obtención del mutante no productor de lacasa

Para comprobar que el proceso de mutación del gen de la lacasa SilA de *S. ipomoea* se había realizado de manera correcta, se llevaron a cabo ensayos a nivel molecular y bioquímico.

4.8.1.1.1. Ensayo a nivel molecular

La electroforesis en gels de agarosa de los productos de amplificación obtenidos mediante PCR a partir del ADN cromosómico de las cepas silvestre y mutante con los cebadores universales M13, puso de manifiesto la presencia de una banda de unas 1500 pb en las muestras de ADN de la cepa mutante y no así en las correspondientes a la cepa silvestre (Figura 4.30).

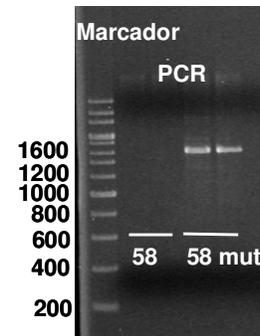


Figura 4.30. Gel de agarosa de la amplificación llevada a cabo con los cebadores M13 tanto en la cepa silvestre (SilA) como en la mutante (SilA⁻).

Este resultado permitió confirmar que el fragmento Sipo500 se había insertado en el medio de la secuencia del gen codificante de la lacasa SilA, produciendo la disrupción del mismo.

4.8.1.1.2. Ensayo a nivel bioquímico

Asimismo, la confirmación de la obtención del mutante SilA⁻ se llevó a cabo mediante la determinación de actividad lacasa en dicha cepa, en comparación con la cepa silvestre, tanto en medio sólido como en medio líquido.

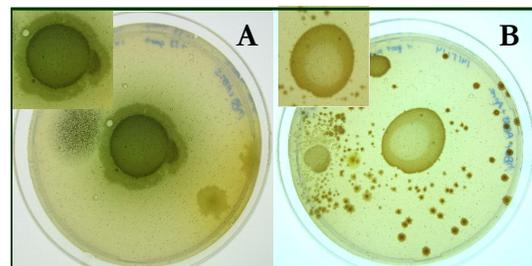


Figura 4.31. Actividad lacasa detectada mediante la oxidación de ABTS en medio sólido MBS de las cepas silvestre (A) y mutante (B).

Los resultados obtenidos en medio sólido pusieron de manifiesto la aparición de una coloración verde alrededor de las colonias de la cepa silvestre, debido a la oxidación del sustrato cromogénico ABTS presente en el medio, por la lacasa. Sin embargo, esta coloración no se observó en la cepa mutante (Figura 4.31). Los ensayos de actividad lacasa asociada al micelio en medio líquido, corroboraron los resultados anteriores (Figura 4.32)

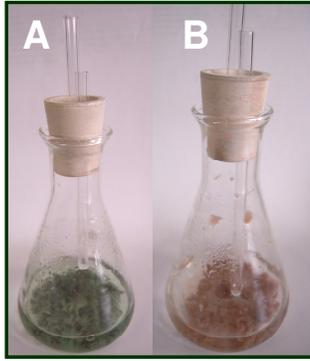


Figura 4.32. Actividad lacasa asociada al micelio detectada mediante la oxidación de ABTS de las cepas silvestre (A) y mutante (B).

Tras la obtención del mutante no productor de lacasa, se pudo observar que la mutación de SilA no afectó a la viabilidad del microorganismo. Sin embargo, la cepa mutante SilA⁻ presentó un crecimiento en el medio de cultivo MBS suplementado con manano mucho más reducido con respecto a la cepa silvestre, observándose una gran limitación para usar el manano como fuente de carbono.

Para detectar la posible presencia de actividad mananasa en medio líquido, se realizaron zimogramas con los sobrenadantes de cultivo de las cepas silvestre y mutante obtenidas a partir del medio MBS suplementado con manano y asparagina. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que en el zimograma correspondiente a la cepa silvestre se detectó la presencia de actividad mananasa, mientras que en el de la cepa mutante no se detectó dicha actividad (Figura 4.33). Este resultado parece indicar, al igual que se había sugerido previamente por nuestro grupo de investigación, que el gen codificante de la lacasa y el de la mananasa podrían estar relacionados. De hecho, en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio con la cepa *S. ipomoea*, se puso de manifiesto que usando galactomanano como fuente de carbono, no sólo se obtenía el máximo de producción de lacasa, sino que también se inducía la producción de mananasa (Montiel *et al.*, 1999). Este resultado sugirió la existencia de una posible regulación conjunta de ambos genes ya que se observó una dinámica de producción prácticamente idéntica de ambas enzimas (Montiel, 2000). Este hecho podría estar relacionado con la capacidad que tienen algunos productos de degradación de la mananasa para inducir la expresión de la lacasa en *Streptomyces*, al

igual que se demostró que ocurría con otras enzimas extracelulares cuando se producen sobre sustratos complejos (Hodgson, 2000).

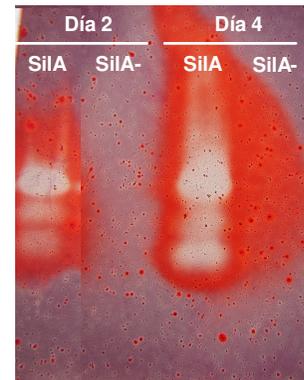


Figura 4.33. Zimograma para detectar la presencia de actividad mananasa en la cepa silvestre (SilA) y mutante (SilA⁻) de *S. ipomoea*.

4.8.2. Estudio del papel de SilA en la morfogénesis y pigmentación de las esporas de *S. ipomoea*

Teniendo en cuenta los resultados anteriores en los que el proceso seguido para la mutación del gen de la lacasa parece haber afectado también a la expresión de otros genes como el codificante de mananasa, así como al crecimiento del microorganismo en cierta medida, se plantearon una serie de estudios para tratar de establecer si las diferencias a nivel genético entre las cepas mutante y silvestre, se reflejaban también a nivel fenotípico durante el ciclo de desarrollo del microorganismo.

Con este objetivo, se realizaron observaciones al microscopio óptico y electrónico de barrido de las distintas fases del ciclo de desarrollo de ambas cepas.

4.8.2.1. Observaciones al microscopio óptico

La observación al microscopio óptico de las muestras correspondientes a distintos tiempos de incubación, que se corresponden a su vez con las fases de germinación de las conidiosporas, formación del micelio sustrato, desarrollo del micelio aéreo y formación de conidióforos no mostró aparentemente ninguna diferencia en las distintas fases entre la cepa silvestre y la mutante (Figura 4.34).

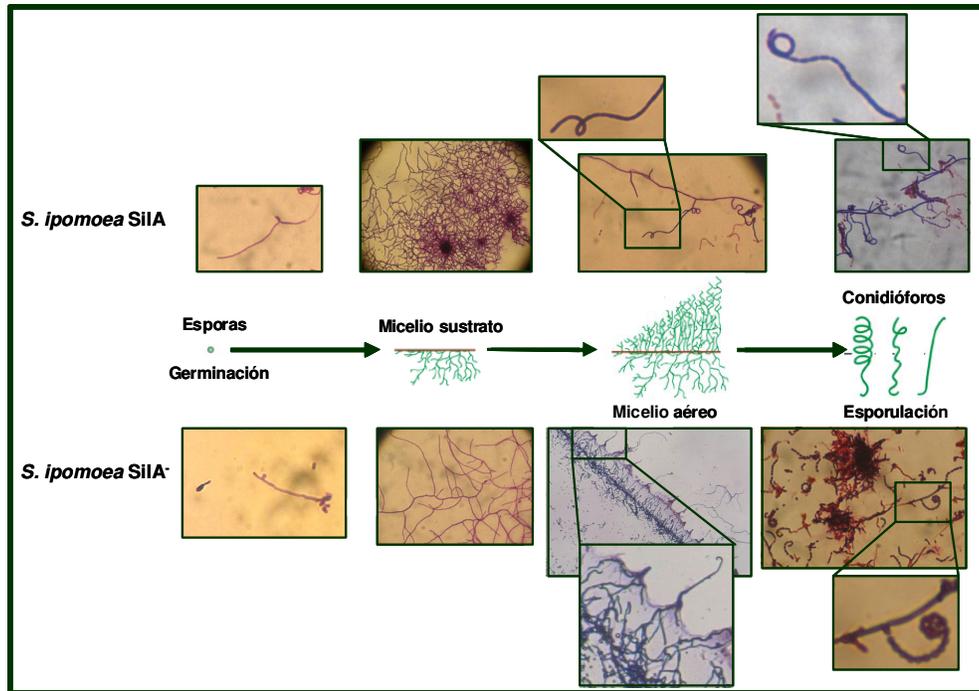


Figura 4.34. Fotografías al microscopio óptico de las distintas fases del ciclo de desarrollo de las cepas silvestre y mutante, observadas mediante tinción de Gram.

4.8.2.2. Observaciones al microscopio electrónico

Las observaciones al microscopio electrónico de barrido de las distintas fases del ciclo de desarrollo de las cepas silvestre y mutante tampoco permitieron apreciar diferencias significativas entre ambas cepas, tal como se muestra en la Figura 4.35.

4.8.2.3. Pigmentación de las esporas

Tal como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado la implicación de algunas lacasas en el proceso de pigmentación de las esporas, como es el caso de la lacasa CotA producida por *Bacillus subtilis* (Hullo *et al.*, 2001). En relación con este hecho, Hullo *et al.* (2001) observaron una pérdida de la coloración parda característica de las esporas de este microorganismo en una cepa mutante no productora de lacasa, lo que a su vez repercutía en la capacidad de protección frente a la radiación UV o al peróxido de hidrógeno. Asimismo, se ha descrito la relación de la lacasa de *Cryptococcus neoformans* con la formación de pigmentos de tipo flavonoide que protegen al hongo frente a la radiación (Casadevall *et al.*, 2000; Fowler *et al.*, 2011).

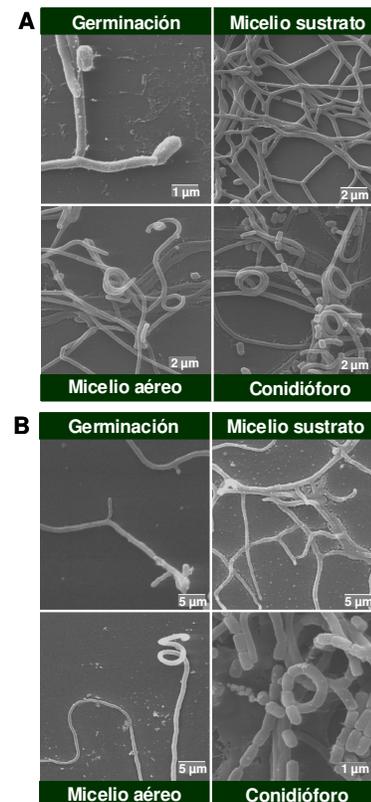


Figura 4.35. Fases del ciclo de desarrollo de las cepas silvestre (A) y mutante (B) observadas al microscopio electrónico de barrido.

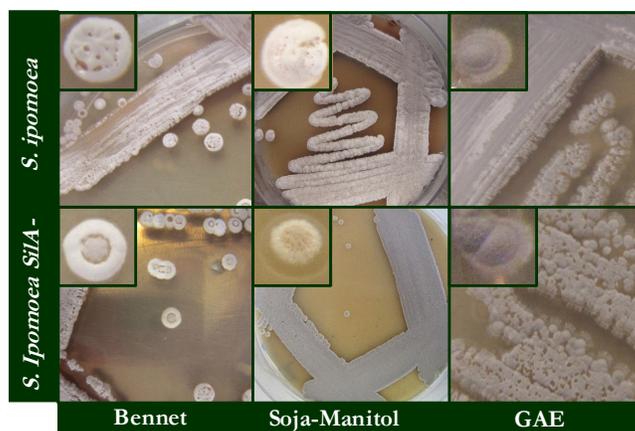


Figura 4.36. Aspecto de las colonias de las cepas silvestre y mutante en los medios de cultivo agar Bennet, SM y GAE.

El estudio de la posible implicación de la lacasa en el proceso de pigmentación de las esporas de *S. ipomoea*, se realizó en distintos medios de cultivo sólidos inoculados con suspensiones de esporas de las cepas silvestre y mutante. Los cultivos de la cepa silvestre en medio sólido presentan normalmente una coloración blanco-grisácea.

La observación macroscópica de los cultivos de ambas cepas, tanto en el medio agar Benett como en GAE, solamente mostró ligeras diferencias morfológicas entre ambas, no observándose cambios en la pigmentación de las colonias. Las diferencias observadas no se consideraron significativas debido a la variabilidad observada en la morfología de las colonias de una misma cepa en el mismo medio de cultivo. En todos los casos se observó un aspecto algodónoso de las colonias y una misma pigmentación en ambas cepas (Figura 4.36).

4.8.3. Implicación de SilA en la resistencia al cobre

Otra de las funciones características de las lacasas es su implicación en la resistencia al cobre, tal como se ha descrito para algunos microorganismos. El cobre es un micronutriente esencial para el funcionamiento de enzimas fisiológicamente importantes tanto de eucariotas como procariontes. No obstante, un exceso de dicho metal puede resultar tóxico debido a la participación de iones cobre en la formación de especies reactivas del oxígeno a través de reacciones Fenton (Persichini *et al.*, 2012). En distintos estudios se ha comprobado que

determinadas lacasas bacterianas están implicadas en la homeostasis del cobre. Así, la lacasa CueO de *Escherichia coli*, localizada en el espacio periplásmico, se ha relacionado con procesos de tolerancia al cobre (Li *et al.*, 2007). Otras oxidasas multicobre que se han asociado con el fenómeno de resistencia al cobre son la enzima PcoA de *E. coli* (Huffman *et al.*, 2002) o las lacasas de *Xanthomonas campestris* (Lee *et al.*, 1994) y *Rhodobacter capsulatus* (Wiethaus *et al.*, 2006).

Para comprobar la posible implicación de la lacasa SilA en la resistencia al cobre en el microorganismo productor, se cultivaron las cepas silvestre y mutante en presencia y ausencia de este metal, según se ha descrito en el apartado 3.12.3.

4.8.3.1. Crecimiento en cultivos no inducidos con cobre

El crecimiento de las cepas silvestre y mutante en los medios de cultivo sólidos no inducidos con cobre, específicos para cada cepa, fue similar en ambos casos. Sin embargo, el peso seco correspondiente al crecimiento de ambas cepas en medio líquido en presencia de distintas concentraciones de sulfato de cobre, mostró diferencias significativas. Así, la cepa silvestre presentó crecimiento a las tres concentraciones de cobre ensayadas, aunque se produjo una reducción del peso seco a lo largo del tiempo de incubación en todos los casos, tal como se observa en la Figura 4.37. En el caso de la cepa mutante, el crecimiento del micelio fue muy escaso o nulo a las tres concentraciones de cobre ensayadas (datos no mostrados).

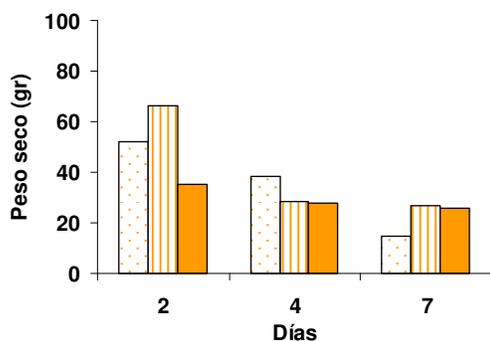


Figura 4.37. Peso seco de la cepa silvestre a los 2, 4 y 7 días de incubación en presencia de distintas concentraciones de sulfato de cobre: 50 μM (barra con puntos), 200 μM (barra con rayas) y 500 μM (barra sólida).

4.8.3.2. Crecimiento en cultivos inducidos con cobre

En los medios de cultivos sólidos inducidos con cobre se observó un crecimiento muy pobre de ambas cepas tras una semana de incubación, siendo menor en el caso de la cepa mutante. Sin embargo, la incubación posterior de estos cultivos durante una semana más permitió a la cepa silvestre desarrollar un micelio normal en césped, mientras que la cepa mutante no alcanzó un crecimiento normal.

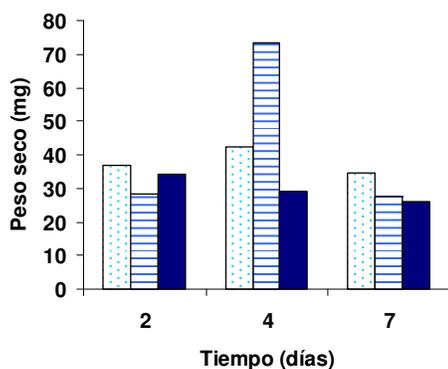


Figura 4.38. Peso seco de la cepa silvestre durante 2, 4 y 7 días de incubación en presencia de distintas concentraciones de sulfato de cobre: 300 μM (barra con puntos), 600 μM (barra con rayas) y 1000 μM (barra sólida).

En la Figura 4.38 se muestran los resultados de la estimación del peso seco alcanzado por la cepa silvestre a los 2, 4 y 7 días de incubación en presencia de distintas concentraciones de cobre. Como se puede observar, se produjo un aumento en el peso seco del microorganismo al cuarto día de incubación en presencia de concentraciones de cobre de 300 y 600 μM .

Cuando la concentración de cobre utilizada fue de 1000 μM , se pudo apreciar una disminución paulatina del peso seco de la cepa silvestre a lo largo del periodo de incubación. En la cepa mutante, al igual que en el caso anterior, no se observó apenas crecimiento a ninguna de las tres concentraciones ensayadas.

Aunque se observó que para alcanzar un desarrollo óptimo de la cepa en medios de cultivo suplementados con sulfato de cobre se requería un tiempo de incubación de dos semanas, se pudo apreciar que los cultivos obtenidos en estas condiciones presentaban una mayor resistencia a dicho metal cuando se cultivaban posteriormente en medios suplementados con cobre. Resultados similares se obtuvieron en otros trabajos en los que se observó un aumento en la producción de la lacasa y una mayor resistencia al cobre en cultivos del hongo *Pleurotus pulmonarius*, (Tychanowicz *et al.*, 2006) cuando se partía de un inóculo procedente de medios de cultivo suplementados con cobre. La comparación de los resultados obtenidos en este estudio para las cepas silvestre y mutante permite deducir que la lacasa SilA podría estar implicada en la resistencia y homeostasis del cobre del microorganismo productor. Resultados similares se obtuvieron con mutantes de *Myxococcus xanthus* carentes de tres oxidasas multicobre implicadas en la homeostasis del, en las cuales se demostró una menor sensibilidad al cobre que la presentada por la cepa silvestre cobre (Sánchez-Sutil *et al.*, 2007).

4.8.4. Implicación de SilA en la degradación de lignina

Se ha descrito que un gran número de lacasas, principalmente las producidas por hongos de la podredumbre blanca, participan en la degradación de la lignina. Sin embargo, la utilización de enzimas ligninolíticas de origen fúngico con fines industriales presenta una serie de inconvenientes, entre los que cabe señalar, la baja estabilidad que muchas de ellas presentan en las condiciones extremas en que se han de aplicar y un pH ácido de actuación. En los últimos años la investigación se ha extendido a las enzimas ligninolíticas de origen

bacteriano que están siendo consideradas como una alternativa interesante a las enzimas fúngicas. De hecho, existen numerosos trabajos que hacen referencia a la importancia de las enzimas ligninolíticas producidas por *Streptomyces* en la degradación de la lignina. Algunos de los trabajos pioneros relacionados con este tema permitieron poner de manifiesto la implicación de distintas cepas de *Streptomyces* en el proceso de degradación de la lignina mediante la producción de enzimas de tipo peroxidada (Ramachandra *et al.*, 1988; Thomas y Crawford, 1998). Asimismo, en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado la implicación de la lacasa de *Streptomyces cyaneus* en la degradación de residuos lignocelulósicos, en procesos de fermentación en estado sólido (SSF) (Arias *et al.*, 2003). Posteriormente se demostró la capacidad de esta enzima, junto con ABTS para deslignificar pasta Kraft de papel (Arias *et al.*, 2003).

Por otro lado, teniendo en cuenta que el galactomanano es uno de los componentes de la lignocelulosa, el hecho de una posible regulación conjunta de los genes de la lacasa y la mananasa, como se ha mencionado previamente, apunta hacia una posible relación de la lacasa de *S. ipomoea* con la degradación de este polímero natural. Una posible hipótesis que podría justificar este papel sugerido para la lacasa, estaría fundamentada en que los productos de degradación generados por la actividad mananasa podrían inducir la producción de lacasa, como ya se ha observado en determinadas cepas de *Streptomyces* (Hodgson, 2000).

Con objeto de comprobar la posible implicación de la lacasa SilA en la degradación de lignina, se realizó una fermentación en estado sólido (SSF) sobre paja de trigo con las cepas silvestre y mutante. La fermentación en estado sólido presenta ciertas ventajas frente a la del cultivo sumergido, entre las que cabe señalar, una acción más efectiva de las enzimas sobre el sustrato, un aumento de su producción e incluso, la posibilidad de recrear en cierto modo la transformación microbiológica que tendría lugar en la naturaleza (Hofrichter *et al.*, 1999; Tengerdy, 1985; Vares *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que en las condiciones de fermentación descritas en el apartado 3.12.4.1, la cepa silvestre presentaba un crecimiento normal con el consiguiente desarrollo de micelio sustrato y aéreo.

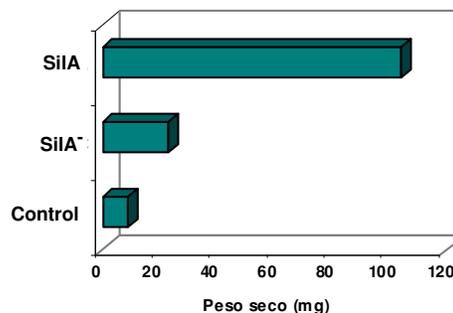


Figura 4.39. Peso seco en mg de la álcali-lignina obtenida de paja de trigo sin tratar (control) y paja de trigo fermentada con la cepa silvestre (SilA) y mutante (SilA⁻) de *S. ipomoea*.

Sin embargo, en el caso de la cepa mutante aunque se observó crecimiento, no se apreció la formación del micelio aéreo. Para evaluar en qué medida la presencia de lacasa contribuye a la degradación de la lignina, se llevó a cabo la estimación del peso seco de la álcali-lignina extraída de los cultivos SSF sobre paja de trigo de las cepas silvestre y mutante, en comparación con un control sin inocular (Figura 4.39). Estos resultados pusieron de manifiesto que el grado de solubilización de la lignina y el rendimiento en álcali-lignina fue muy superior en el caso de la cepa silvestre (hasta 11 veces más tras 7 días de incubación).

La cepa mutante fue capaz de solubilizar la lignina, pero en menor proporción que la cepa silvestre. Las diferencias de ambas cepas en su capacidad para solubilizar la lignina ponen de manifiesto que el gen de la lacasa podría estar implicado en cierta medida en este proceso, puesto que la capacidad de la cepa mutante para solubilizar la lignina se redujo 5 veces con respecto a la cepa silvestre. Resultados muy parecidos se obtuvieron recientemente en un estudio similar llevado a cabo con la lacasa de dos dominios de *S. coelicolor*, donde pudieron observar que la cepa mutante, con el gen de la lacasa interrumpido, producía una menor cantidad de APPL (álcali-lignina) con respecto a la cepa silvestre (Majumdar *et al.*, 2014).

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La caracterización físico-química y cinética de la lacasa recombinante SilA de *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 puso de manifiesto su elevada estabilidad a pHs alcalinos y a temperaturas moderadamente elevadas. Asimismo, mediante estudios potenciométricos se comprobó que se trata de una lacasa de bajo potencial redox, al igual que la mayoría de las lacasas bacterianas descritas.
2. Los ensayos conducentes a la elucidación de la estructura tridimensional de SilA no resultaron concluyentes debido a la imposibilidad de cristalizar la proteína por la presencia, probablemente, de dominios hidrofóbicos en el exterior de su estructura, lo que causó interferencias con el procedimiento analítico utilizado. No obstante, el uso de herramientas informáticas permitió comparar la secuencia genética de la lacasa SilA con la correspondiente a otras lacasas bacterianas ya cristalizadas y deducir la estructura tridimensional putativa de dicha lacasa, en la que se pudo comprobar la existencia de dos dominios cupredoxina, como ocurre en las lacasas de otras cepas de estreptomicetos.
3. La evaluación de la capacidad de distintos compuestos naturales relacionados con la estructura de la lignina para actuar como mediadores de oxidación de SilA, mostró la idoneidad de la acetosiringona, el siringaldehído, el alcohol siringílico, el ácido siringico y el siringato de metilo para potenciar el poder oxidativo de la enzima.
4. Para la degradación de los contaminantes industriales y emergentes ensayados fue necesaria la acción sinérgica de la lacasa SilA y un mediador de oxidación.
5. El ensayo de decoloración de tintes textiles de tipo azo con el sistema SilA-mediador puso de manifiesto que el siringato de metilo y la acetosiringona fueron los mediadores que permitieron alcanzar los niveles más altos de decoloración, siendo la concentración del mediador y la temperatura factores condicionantes para la eficacia del sistema.
6. Los resultados obtenidos en el ensayo de degradación de las fluoroquinolonas y la Carbamazepina mediante el sistema SilA-mediador, permitieron seleccionar la acetosiringona como mediador más eficaz.
7. Se ha demostrado la capacidad de *Streptomyces ipomoea* para generar radicales hidroxilo mediante ciclos redox de quinonas, merced a la presencia en el microorganismo de la lacasa SilA y de actividad quinona reductasa. Asimismo, se ha comprobado la viabilidad del microorganismo tras 24 horas de inducción de radicales hidroxilo, lo que avala la idoneidad de este microorganismo para ser utilizado en procesos de biorremediación.
8. La producción de radicales hidroxilo resultó muy eficaz para la degradación de los tintes textiles y los contaminantes emergentes ensayados, alcanzándose niveles de degradación incluso superiores a los obtenidos con el sistema SilA-mediador.
9. Del estudio de degradación de contaminantes por ambos sistemas oxidativos se deduce que es importante tener en cuenta que la degradación del compuesto no implica necesariamente su destoxificación, siendo necesario examinar la toxicidad de los productos de degradación mediante la utilización de varios sistemas de análisis para validar el resultado.
10. La obtención de un mutante no productor de lacasa mediante interrupción génica permitió conocer la implicación de dicha enzima en la tolerancia al cobre y en la solubilización de lignina de paja de trigo, funciones que corroboran el interés biotecnológico de *Streptomyces ipomoea*.

CONCLUSIONS

1. The physico-chemical and kinetic characterization of the recombinant laccase SilA from the strain *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 demonstrated its high stability at alkaline pH and at moderate temperatures. By redox titration, SilA was classified as a low redox potential laccase as the most bacterial laccases already described.
2. Assays addressed to elucidate the three-dimensional structure of SilA were not successful because the impossibility to crystallize the protein. This was probably due to the presence of hydrophobic residues in the surface of the protein which could interfere with the analytical procedure used. However, through the comparison of SilA sequence with other sequences from bacterial laccases previously crystallized it could be obtained a putative three-dimensional structure with two cupredoxin domains, just as the most *Streptomyces* laccases.
3. The evaluation of the ability of different natural compounds related to the lignin structure to act as redox mediators of SilA revealed that acetosyringone, syringaldehyde and methyl syringate were the best compounds to enhance the redox potential of the enzyme.
4. To degrade the industrial and emerging pollutants, a synergic action of the SilA laccase and a redox mediator was mandatory.
5. Decolorization assays of the textile azo dyes with the SilA-mediator system showed that the highest decoloration yields were obtained by using methyl syringate and acetosyringone as mediators. Mediator concentration and temperature are key factors for the effectiveness of the system.
6. Acetosyringone was the most effective mediator to degrade fluoroquinolones and Carbamazepine through the SilA-mediator system.
7. *Streptomyces ipomoea* was able to produce hydroxyl radicals through quinone redox cycling due to the presence of SilA laccase and quinone reductase activity. In addition, after 24 hours of hydroxyl radical's induction, the viability of the microorganism was confirmed. This fact supports the suitability of this strain to be used for bioremediation purposes.
8. The production of hydroxyl radicals was very efficient to degrade textile dyes and emerging pollutants being the degradation yields even higher than those obtained with the SilA-mediator system.
9. Pollutants degradation obtained with both oxidative systems does not always involve its detoxification being necessary to evaluate the toxicity of the degradation products by different analytical methods to validate the results.
10. The obtention of a non-laccase producing mutant by gene disruption allowed knowing the involvement of this enzyme in copper tolerance as well as in the solubilisation of lignin wheat straw, functions both which confirm the biotechnological interest of *Streptomyces ipomoea*.

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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 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. *Journal of Bacteriology*, 169: 1279-1285.
- Adler, E. 1977. Lignin Chemistry - Past, Present and Future. *Wood Science and Technology*, 11: 169-218.
- Agematu, H., Kominato, K., Shibamoto, N., Yoshioka, T., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T. y Murao, S. 1993a. Transformation of 7-(4-hydroxyphenylacetamido)cephalosporanic acid into a new Cephalosporin antibiotic, 7-[1-oxaspiro(2.5)octa-6-oxo-4,7-diene-2-carboxamido] cephalosporanic acid, by laccase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57: 1387-1388.
- Agematu, H., Tsuchida, T., Kominato, K., Shibamoto, N., Yoshioka, T., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T. y Murao, S. 1993b. Enzymatic dimerization of Penicillin-X. *Journal of Antibiotics*, 46: 141-148.
- Ahmed, M.M. y Chiron, S. 2014. Solar photo-Fenton like using persulphate for carbamazepine removal from domestic wastewater. *Water Research*, 48: 229-236.
- Alexandre, G. y Zhulin, I.B., 2000. Laccases are widespread in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 18: 41-42.
- Almansa, E., Kandelbauer, A., Pereira, L., Cavaco-Paulo, A. y Guebitz, G.M., 2004. Influence of structure on dye degradation with laccase mediator systems. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22: 315-324.
- Alnaizy, R. y Akgerman, A. 2000. Advanced oxidation of phenolic compounds. *Advances in Environmental Research*, 4: 233-244.
- Alper, N. y Acar, J., 2004. Removal of phenolic compounds in pomegranate juices using ultrafiltration and laccase-ultrafiltration combinations. *Nahrung-Food*, 48: 184-187.
- Ander, P. y Eriksson, K.E. 1976. Importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Archives of Microbiology*, 109: 1-8.
- Andersen, S.O., Peter, M.G. y Roepstorff, P. 1996. Cuticular sclerotization in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry and Molecular Biology*, 113: 689-705.
- Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A. y Marotta, R. 1999. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*, 53: 51-59.
- Andreozzi, R. y Marotta, R. 1999. Ozonation of p-chlorophenol in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 69: 303-317.
- Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G. y Pollio, A. 2002. Carbamazepine in water persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research*, 36: 2869-2877.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 92-97.
- 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 Technology*, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 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*. *Journal of Hazardous Materials*, 181: 181-186.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1953-1958.
- Askwith, C., Eide, D., Vanho, A., Bernard, P.S., Li, L.T., Daviskaplan, S., Sipe, D.M. y Kaplan, J. 1994. The *Fel3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell*, 76: 403-410.
- B**
- Bains, J., Capalash, N. y Sharma, P. 2003. Laccase from a non-melanogenic, alkalotolerant gamma-proteobacterium JB isolated from industrial wastewater drained soil. *Biotechnology Letters*, 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. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 1: 191-197.
- Bajpai, P., Anand, A., Sharma, N., Mishra, S.P., Bajpai, P.K. y Lachenal, D. 2006. Enzymes improve ECF bleaching of pulp. *Bioresources*, 1: 34-44.
- Balakshin, M.Y., Capanema, E.A., Chang, H.M., Jameel, H. y Chiang, V.L. 2009. Changes in lignin and lignin-carbohydrate complex structures during wood saccharification. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 237.
- Balcioglu, I.A., Alaton, I.A., Otker, M., Bahar, R., Bakar, N. y Ikiz, M. 2003. Application of advanced oxidation processes to different industrial wastewaters. *Journal of Environmental Science and Health*, 38: 1587-1596.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 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.
- Barr, D.P., Shah, M.M., Grover, T.A. y Aust, S.D. 1992. Production of hydroxyl radical by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 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. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 364: 179-183.
- Béguin, P. 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using Congo Red-stained agar replicas. *Analytical Biochemistry*, 131: 333-336.
- Ben Younes, S. y Sayadi, S. 2013. Detoxification of Indigo Carmine using a combined treatment via a novel trimeric thermostable laccase and microbial consortium. *Journal of Molecular Catalysis*, 87: 62-68.

- Bennett, P.M., Grinstead, J. y Richmond, M.H. 1977. Transposition of *Tna* does not generate deletions. *Molecular Genetics and Genomics*, 154: 205-211.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdano-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., Lopes, G.G., Carrondo, M.A. y Lindley, P.F. 2005. Dioxigen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Transactions*, 3507-3513.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites - A personal view. *Journal of Antibiotics*, 58: 1-26.
- Bernati, G. 1951. Studies on lysogenesis 1. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62: 293-300.
- Berrocal, M.M., Rodríguez, J., Ball, A.S., Pérez-Leblic, M.I. y Arias, M.E. 1997. Solubilisation and mineralisation of [C^{14}]lignocellulose from wheat straw by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 during growth in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 379-384.
- 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*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 764-771.
- Bertrand, G. 1896. Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Comptes Rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*, 123: 463-465.
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C. y Mougin, C. 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*, 41: 7325-7333.
- Bibb, M.J., Domonkos, A., Chandra, G. y Buttner, M.J. 2012. Expression of the chaplin and rodlin hydrophobic sheath proteins in *Streptomyces venezuelae* is controlled by σ^{BldN} and a cognate anti-sigma factor, RsbN. *Molecular Microbiology*, 84: 1033-1049.
- 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.
- Bibi, I., Bhatti, H.N. y Asgher, M. 2011. Comparative study of natural and synthetic phenolic compounds as efficient laccase mediators for the transformation of cationic dye. *Biochemical Engineering Journal*, 56: 225-231.
- Böhmer, S., Messner, K. y Srebotnik, E. 1998. Oxidation of phenanthrene by a fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244: 233-238.
- Bokhari, T.H., Kashif, M., Bhatti, I.A., Zubair, M., Adeel, S., Yousaf, M., Ahmad, M., Iqbal, M., Usman, M., Zuber, M. y Mansha, A. 2013. Degradation study of C.I. Reactive Yellow 145 by advanced oxidation process. *Asian Journal of Chemistry*, 25: 8668-8672.

- Bollag, J.M. 1992. Decontaminating soil with enzymes. *Environmental Science and Technology*, 26: 1876-1881.
- Bollag, J.M., Chu, H.L., Rao, M.A. y Gianfreda, L. 2003. Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. *Journal of Environmental Quality*, 32: 63-69.
- Bourbonnais, R. y Paice, M.G. 1990. Oxidation of nonphenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, 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. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bressler, D.C., Fedorak, P.M. y Pickard, M.A. 2000. Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Corioloopsis gallica*. *Biotechnology Letters*, 22: 1119-1125.
- Brijwani, K., Rigdon, A., Vadlani, P.V. 2010. Fungal laccases: production, function and applications in food processing. *Enzyme Research*, 2010: 1-10.
- Brissos, V., Goncalves, N., Melo, E.P. y Martins, L.O. 2014. Improving kinetic or thermodynamic stability of an azoreductase by directed evolution. *Plos One*, 9(1): 1-12.
- Brouwers, G.J., de Vrind, J.P.M., Corstjens, P.L.A.M., Cornelis, P., Baysse, C. y Dejong, E.W.D.V. 1999. *cumA*, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn²⁺ oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1762-1768.
- Brown, N.L., Barrett, S.R., Camakaris, J., Lee, B.T.O. y Rouch, D.A. 1995. Molecular-genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*Pco*) from *Escherichia coli* plasmid Prj1004. *Molecular Microbiology*, 17: 1153-1166.
- Brown, M.E. y Chang, M.C.Y. 2014. Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 19: 1-7.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 987-995.
- ### C
- Call, H.P. y Mucke, I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym(R)-process). *Journal of Biotechnology*, 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 and Microbial Technology*, 35: 113-120.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1775-1784.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, A.T., Romero, J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. 2007. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1264-1271.
- Cañas, A.I. y Camarero, S. 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*, 28: 694-705.
- Caparrós-Ruiz, D., Fornale, S., Civardi, L., Puigdomenech, P. y Rigau, J. 2006. Isolation and characterisation of a family of laccases in maize. *Plant Science*, 171: 217-225.

- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llompart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M. y Ternes, T. 2004. Behaviour of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, 38: 2918-2926.
- Casadevall, A., Rosas, A.L. y Nosanchuk, J.D. 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 354-358.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 14555-14561.
- Champness, W. 2000. Actinomycete development, antibiotic production, and phylogeny: questions and challenges. En "Prokaryotic development". Editores: Brun, Y. y Shimkets, L.J. ASM Press, Washington DC, pp. 11-32.
- Chaphalkar, S.R. y Dey, S. 1998. Thermostable alkaline metalloprotease from newly isolated alkalophilic *Streptomyces diastaticus* strain SS1. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 35: 34-40.
- Chater, K.F. 1993. Genetics of Differentiation in *Streptomyces*. *Annual Review of Microbiology*, 47: 685-713.
- Chater, K.F., Biro, S., Lee, K.J., Palmer, T. y Schrepf, H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34: 171-198.
- Chen, S., Ge, W. y Buswell, J.A. 2004. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *European Journal of Biochemistry*, 271: 318-328.
- Chiacchierini, E., Restuccia, D. y Vinci, G. 2004. Bioremediation of food industry effluents: Recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases. *Food Science and Technology International*, 10: 373-382.
- Chiron, S., Minero, C. y Vione, D. 2006. Photodegradation processes of the Antiepileptic drug carbamazepine, relevant to estuarine waters. *Environmental Science and Technology*, 40: 5977-5983.
- Cho, N.S., Shin, W., Jeong, S.W. y Leonowicz, A. 2004. Degradation of lignosulfonate by fungal laccase with low molecular mediators. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 25: 1551-1554.
- Ciullini, I., Tilli, 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 Technology*, 99: 7003-7010.
- Clara, M., Strenn, B. y Kreuzinger, N. 2004. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Research*, 38: 947-954.
- Claus, H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology* 179: 145-150.
- Claus, H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35: 93-96.
- Claus, H., Faber, G. y König, H. 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes

- by fungal laccases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 672-678.
- Claus, H. y Filip, Z. 1997. The evidence of a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiological Research*, 152: 209-216.
- Clutterbuck, A.J. 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 70: 423-435.
- Crawford, D.L. 1978. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 35: 1041-1045.
- D**
- Daâssi, D., Rodríguez-Couto, S., Nasri, M., Mechichi, T. 2013. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Corioloopsis gallica* into Ca-alginate beads. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 90: 71-78.
- d'Acunzo, F. y Galli, C. 2003. First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. *European Journal of Biochemistry*, 270: 3634-3640.
- Dalfard, A.B., Khajeh, K., Soudi, M.R., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B. y Sajedi, R.H. 2006. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 1409-1416.
- 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*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26: 158-163.
- De Risi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278:680-686.
- de Witte, B., Van Langenhove, H., Demeestere, K., Saerens, K., De Wispelaere, P. y Dewulf, J. 2010. Ciprofloxacin ozonation in hospital wastewater treatment plant effluent: Effect of pH and H₂O₂. *Chemosphere*, 78: 1142-1147.
- Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H.B., 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 Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 29-41.
- Doll, T.E. y Frimmel, F.H. 2005. Removal of selected persistent organic pollutants by heterogeneous photocatalysis in water. *Catalysis Today*, 101: 195-202.
- Donner, E., Kosjek, T., Qualmann, S., Kusk, K.O., Heath, E., Revitt, D.M., Ledin, A. y Andersen, H.R. 2013. Ecotoxicity of Carbamazepine and its UV photolysis transformation products. *Science of the Total Environment*, 443: 870-876.
- 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. *Bioresource Technology*, 98: 2369-2385.

- Driks, A. 2004. The *Bacillus* spore coat. *Phytopathology*, 94: 1249-1251.
- Dsouza, T.M., Boominathan, K. y Reddy, C.A. 1996. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3739-3744.
- Dubé, E., Shareck, F., Hurtubise, Y., Daneault, C. y Beaugard, M. 2008. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 597-603.
- Durán, N. y Espósito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B-Environmental*, 28: 83-99.
- Durão, P., Bento, I., Fernandes, A.T., Melo, E.P., Lindley, P.F. y Martins, L.O. 2006. Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11: 514-526.
- Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P. y Kumar, A. 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 68: 117-128.
- E**
- Eggert, C., Temp, U. y Eriksson, K.E.L., 1996a. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1151-1158.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D. y Eriksson, K.E.L. 1996b. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters*, 391: 144-148.
- 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*. *Journal of Biochemistry*, 133: 671-677.
- Endo, K., Hosono, K., Beppu, T. y Ueda, K. 2002. A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces* and its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology*, 148: 1767-1776.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 19416-19425.
- Ensign, J.C. 1978. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annual Review of Microbiology*, 32: 185-219.
- Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., DeTitta, G.T., Dekker, N. y Nordlund, P. 2006. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical Biochemistry*, 357: 289-298.
- 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. *Journal of Hazardous Materials*, 149: 631-642.
- Eugenio, M.E., Hernández, M., Moya, R., Martín-Sampedro, R., Villar, J.C. y Arias, M.E. 2011. Evaluation of a new laccase produced by *Streptomyces ipomoea* on biobleaching and ageing of kraft pulps. *Bioresources*, 6: 3231-3241.
- Evans, C.S. 1985. Laccase activity in lignin degradation by *Coriolus versicolor* *in vivo* and *in vitro* studies. *FEMS Microbiology Letters*, 27: 339-343.

F

- Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P. y Macchitella, D. 2001. An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO. *Tetrahedron Letters*, 42: 7551-7553.
- Faraco, V., Giardina, P. y Sannia, G. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology*, 149: 2155-2162.
- Faravelli, T., Frassoldati, A., Migliavacca, G. y Ranzi, E. 2010. Detailed kinetic modeling of the thermal degradation of lignins. *Biomass and Bioenergy*, 34: 290-301.
- Faure, D., Bouillant, M.L. y Bally, R. 1995. Comparative study of substrates and inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* laccases. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1144-1146.
- Fernandes, T.A.R., da Silveira, W.B., Passos, F.M.L. y Zucchi, T.D. 2014. Characterization of a thermotolerant laccase produced by *Streptomyces* sp SB086. *Annals of Microbiology*, 64: 1363-1369.
- Ferrari, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. y Garric, J. 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of Carbamazepine, Clofibrac acid, and Diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 359-370.
- Fillat, A., Colom, J.F. y Vidal, T. 2010. A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. *Bioresource Technology*, 101: 4104-4110.
- Fillat, U., Prieto, A., Camarero, S., Martinez, A.T. y Martinez, M.J. 2012. Biodeinking of flexographic inks by fungal laccases using synthetic and natural mediators. *Biochemical Engineering Journal*, 67: 97-103.
- Fink, L., Dror, I. y Berkowitz, B. 2012. Enrofloxacin oxidative degradation facilitated by metal oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 86: 144-149.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 984-989.
- Fjaervik, E. y Zotchev, S.B. 2005. Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 436-443.
- 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 Microbiology Letters*, 155: 223-229.
- Forootanfar, H., Moezzi, A., ghaie-Khozani, M., Mahmoudjanlou, Y., Ameri, A., Niknejad, F. y Faramarzi, M.A.. 2012. Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 9:27.
- Fowler, Z.L., Baron, C.M., Panepinto, J.C. y Koffas, M.A.G. 2011. Melanization of flavonoids by fungal and bacterial laccases. *Yeast*, 28: 181-188.
- Francis, C.A., Co, E.M. y Tebo, B.M. 2001. Enzymatic manganese(II) oxidation by a marine alpha-proteobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4272-4278.
- Freeman, J.C., Nayar, P.G., Begley, T.P. y Villafranca, J.J. 1993. Stoichiometry and spectroscopic identity of copper centers in phenoxazinone synthase: A new addition to the blue copper oxidase family. *Biochemistry*, 32: 4826-4830.
- Freire, R.S., Thongngamdee, S., Duran, N., Wang, J., Kubota, L.T. 2002. Mixed

- enzyme (laccase/tyrosinase)-based remote electrochemical biosensor for monitoring phenolic compounds. *Analyst*, 127: 258-261.
- Freudenberg, K., 1959. Biosynthesis and constitution of lignin. *Nature* 183: 1152-1155.
- G**
- 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.
- Gamelas, J.A.F., Pontes, A.S.N., Evtuguin, D.V., Xavier, A.M.R.B., Esculcas, A.P. 2007. New polyoxometalate-laccase integrated system for kraft pulp delignification. *Biochemical Engineering Journal*, 33: 141-147.
- 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.
- Gardiol, A.E., Hernández, R.J., Reinhammar, B., Harte, B.R. 1996. Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 347-352.
- Gavnholt, B., Larsen, K. y Rasmussen, S.K. 2002. Isolation and characterisation of laccase cDNAs from meristematic and stem tissues of ryegrass (*Lolium perenne*). *Plant Science*, 162: 873-885.
- Gerber, N.N. y Lechevalier, H.A. 1965. Geosmin an earthy-smelling substance isolated from Actinomycetes. *Applied Microbiology*, 13: 935-938.
- Germann, U.A. y Lerch, K. 1986. Isolation and partial nucleotide-sequence of the laccase gene from *Neurospora crassa* and amino-acid-sequence homology of the protein to human ceruloplasmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 8854-8858.
- Ghauch, A., Baydoun, H. y Dermesropian, P. 2011. Degradation of aqueous Carbamazepine in ultrasonic/Fe-0/H₂O₂ systems. *Chemical Engineering Journal*, 172: 18-27.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.M. 1999. Laccases: A useful group of oxido-reductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3: 1-26.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. y Sannia, G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 369-385.
- Giovanelli, G. y Ravasini, G. 1993. Apple juice stabilization by combined enzyme membrane filtration process. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft and 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 nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters*, 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-Science and Engineering*. 9: 335-352.
- Goerke, C., Koller, J. y Wolz, C. 2006. Ciprofloxacin and Trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50: 171-177.
- Gogate, P.R. y Pandit, A.B. 2004. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, 8: 501-551.

- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 3944-3953.
- Goodfellow, M. y Williams, S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37: 189-216.
- Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A. y Forsythe, S. 2003. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *Journal of Biotechnology*, 101: 49-56.
- 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.
- Guan, Z.B., Zhang, N., Song, C.M., Zhou, W., Zhou, L.X., Zhao, H., Xu, C.W., Cai, Y.J. y Liao, X.R. 2014. Molecular cloning, characterization, and dye-decolorizing ability of a temperature- and pH-stable laccase from *Bacillus subtilis* X1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172: 1147-1157.
- 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. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339: 190-199.
- 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. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383: 142-147.
- Guillén, F., Muñoz, C., Gómez-Toribio, V., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. 2000b. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 170-175.
- Gummadi, S.N. 2003. What is the role of thermodynamics on protein stability? *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8: 9-18.
- Gunne, M. y Urlacher, V.B. 2012. Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces svicens* with unusual properties discovered by genome mining. *Plos One*, 7.
- Gunne, M., Hoppner, A., Hagedoorn, P.L. y Urlacher, V.B. 2014. Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from *Streptomyces svicens*. *FEBS Journal*, 281: 4307-4318.
- Guo, M.Q., Wang, H.F., Huang, D., Han, Z.J., Li, Q., Wang, X.J. y Chen, J. 2014. Amperometric catechol biosensor based on laccase immobilized on nitrogen-doped ordered mesoporous carbon (N-OMC)/PVA matrix. *Science and Technology of Advanced Materials*, 15.
- Gupta, N., Lee, F.S. y Farinas, E.T. 2010. Laboratory evolution of laccase for substrate specificity. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 62: 230-234.

H

- Haars, A. y Huttermann, A. 1980. Function of laccase in the white-rot fungus *Fomes annosus*. *Archives of Microbiology*, 125: 233-237.
- Haibo, Z., Yinglong, Z., Feng, H., Peiji, G. y Jiachuan, C. 2009. Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from

- Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters*, 31: 837-843.
- Halliwell, B., 1981. The biological effects of the superoxide radical and its products. *Clinical Respiratory Physiology-Bulletin European de Physiopathologie Respiratoire*, 17: 21-28.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press Inc.*, New York.
- 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 and Microbial Technology*, 30: 445-453.
- Hanahan, D. 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166: 557-580.
- 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 Letters*, 195: 242-246.
- Hata, T., Shintate, H., Kawai, S., Okamura, H. y Nishida, T. 2010. Elimination of Carbamazepine by repeated treatment with laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Journal of Hazardous Materials*, 181: 1175-1178.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 331-338.
- Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131: 5-17.
- Heller, A. 2004. Miniature biofuel cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6: 209-216.
- Hernández, M., Rodríguez, J., Pérez, M.I., Ball, A.S. y Arias, M.E. 1997. C¹³ 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 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 50 *Streptomyces* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 3909-3913.
- 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 Communications in Mass Spectrometry*, 12: 1744-1748.
- Hernández-Romero, D., Solano, F. y Sánchez-Amat, A. 2005. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6808-6815.
- Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A. y Oliver, S.G. 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31: 272-277.
- Hodgson, D.A. 2000. Primary metabolism and its control in streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 42: 47-238.
- 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 C¹⁴-labelled lignin (C¹⁴-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1864-1870.
- Homem, V. y Santos, L. 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices: A review. *Journal of Environmental Management*, 92: 2304-2347.
- Hoopes, J.T. y Dean, J.F.D. 2004. Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 27-33.
- Hopwood, D.A. 2007. How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Molecular Microbiology*, 63: 937-940.
- Hoshida, H., Nakao, M., Kanazawa, H., Kubo, K., Hakukawa, T., Morimasa, K., Akada, R. y Nishizawa, Y. 2001. Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92: 372-380.
- Hsieh, C.J. y Jones, G.H. 1995. Nucleotide-sequence, transcriptional analysis, and glucose regulation of the phenoxazinone synthase gene (*PbsA*) from *Streptomyces antibioticus*. *Journal of Bacteriology*, 177: 5740-5747.
- Hsueh, C.C., Chen, B.Y. y Yen, C.Y. 2009. Understanding effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Hazardous Materials*, 167: 995-1001.
- 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. *Journal of Bacteriology*, 183: 5426-5430.
- ## I
- Ibarra, D., Camarero, S., Romero, J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. 2006. Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81: 1159-1165.
- Iffland, A., Tafelmeyer, P., Saudan, C. y Johnsson, K. 2000. Directed molecular evolution of cytochrome c peroxidase. *Biochemistry*, 39: 10790-10798.
- Ikai, H., Nakamura, K., Shirato, M., Kanno, T., Iwasawa, A., Sasaki, K., Niwano, Y. y Kohno, M. 2010. Photolysis of hydrogen peroxide, an effective disinfection system via hydroxyl radical formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 5086-5091.
- 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*. *Nature Biotechnology*, 21: 526-531.
- Ingrey, K.T., Ren, J. y Prescott, J.F. 2003. A fluoroquinolone induces a novel mitogen-encoding bacteriophage in *Streptococcus canis*. *Infection and Immunity*, 71: 3028-3033.
- Isono, Y., Sudo, T. y Hoshino, M. 1989. Properties of a new enzyme, nucleoside oxidase, from *Pseudomonas maltophilia* Lb-86. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 1671-1677.
- Ivanov, I., Vidakovic-Koch, T. y Sundmacher, K. 2010. Recent advances in enzymatic fuel

- cells: Experiments and modeling. *Energies*, 3: 803-846.
- Ivnitski, D. y Atanassov, P. 2007. Electrochemical studies of intramolecular electron transfer in laccase from *Trametes versicolor*. *Electroanalysis*, 19: 2307-2313.
- Iyer, G. y Chattoo, B.B. 2003. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiology Letters*, 227: 121-126.
- J**
- 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. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 524-528.
- Jones, G.H. 2000. Actinomycin production persists in a strain of *Streptomyces antibioticus* lacking phenoxazinone synthase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 1322-1327.
- Joseleau, J.P., Gharibian, S., Comtat, J., Lefebvre, A. y Ruel, K. 1994. Indirect involvement of ligninolytic enzyme-systems in cell-wall degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 255-264.
- Joss, A., Repetto, G., Rios, J.C., Hazen, N., Molero, M.L., del Peso, A., Salguero, M., Fernández-Freire, P., Pérez-Martín, J.M. y Camen, A. 2003. Ecotoxicological evaluation of Carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. *Toxicology in Vitro*, 17: 525-532.
- K**
- Kagi, J.H.R. y Schaffer, A. 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27: 8509-8515.
- Karhunen, P., Rummakko, P., Sipila, J., Brunow, G., Kilpelainen, I. 1995. The formation of dibenzodioxocin structures by oxidative coupling: A model reaction for lignin biosynthesis. *Tetrahedron Letters*, 36: 4501-4504.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M. y Guwy, A.J. 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*, 43: 363-380.
- Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T., Koide, K., Nishida, T., Morohoshi, N. y Haraguchi, T. 1987. C- α -C- β Cleavage of phenolic β -1 lignin substructure model-compound by laccase of *Coriolus versicolor*. *Mokuzai Gakkaishi*, 33: 792-797.
- 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). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70: 988-998.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*: John Innes Foundation, Norwich. 2nd Edición.
- Kieser, H.M., Kieser, T. y Hopwood, D.A. 1992. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Journal of Bacteriology*, 174: 5496-5507.
- Kim, C., Lorenz, W.W., Hoopes, J.T. y Dean, J.F.D. 2001. Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* *yacK* gene. *Journal of Bacteriology*, 183: 4866-4875.

- Kirk, T.K. y Farrell, R.L. 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41: 465-505.
- Klonowska, A., Gaudin, C., Fournel, A., Asso, M., Le Petit, J., Giorgi, M. y Tron, T. 2002. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. *European Journal of Biochemistry*, 269: 6119-6125.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. y Buxton, H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36: 1202-1211.
- Kos, L. y Perkowski, J. 2000. Advanced oxidation process in the technology of textile wastewater treatment. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 8: 66-70.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 217-224.
- Kosman, D.J. 2010. Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15: 15-28.
- Kraft, A., Stadelmann, M. y Blaschke, M. 2003. Anodic oxidation with doped diamond electrodes: a new advanced oxidation process. *Journal of Hazardous Materials*, 103: 247-261.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F.J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. 2008. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, 7.
- L**
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LaFayette, P.R., Eriksson, K.E.L. y Dean, J.F.D. 1999. Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). *Plant Molecular Biology*, 40: 23-35.
- Lakowicz, J.R., Gryczynski, I., Tolosa, L., Dattelbaum, J.D., Castellano, F.N., Li, L. y Rao, G. 1999. Advances in fluorescence spectroscopy: Multi-photon excitation, engineered proteins, modulation sensing and microsecond rhenium metal-ligand complexes. *Acta Physica Polonica A*, 95: 179-196.
- Larrondo, L.F., Salas, L., Melo, F., Vicuna, R. y Cullen, D. 2003. A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6257-6263.
- Larsson, D.G.J., de Pedro, C. y Paxeus, N. 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148: 751-755.
- Law, D.J. y Timberlake, W.E. 1980. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 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. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 10174-10180.
- Ledakowicz, S., Solecka, M. y Zylla, R. 2001. Biodegradation, decolourisation and detoxification of textile wastewater enhanced by advanced oxidation processes. *Journal of Biotechnology*, 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*. *Journal of Wood Science*, 50: 281-284.
- Lee, Y.A., Henderson, 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. *Journal of Bacteriology*, 176: 173-188.
- Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N. y Golovleva, L. 1997a. 'Yellow' laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. *FEBS Letters*, 413: 446-448.
- Leontievsky, A.A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J.K., Pozdnyakova, N.N., Myasoedova, N.M., Kalkkinen, N., Golovleva, L.A., Cammack, R., Thurston, C.F. y Hatakka, A. 1997b. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 156: 9-14.
- Li, K.C., Helm, R.F. y Eriksson, K.E.L. 1998. Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/l-hydroxybenzotriazole redox system. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 27: 239-243.
- 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. *Journal of the American Chemical Society*, 126: 8010-8019.
- Li, X., Wei, Z.Y., Zhang, M., Peng, X.H., Yu, G.Z., Teng, M.K. y Gong, W.M. 2007. Crystal structures of *E. coli* laccase CueO at different copper concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354: 21-26.
- Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A. y Chen, C.W. 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Molecular Microbiology*, 10: 923-933.
- Lisov, A., Zavarzina, A., Zavarzin, A., Demin, V. y Leontievsky, A. 2012. Dimeric and monomeric laccases of soil-stabilizing lichen *Solorina crocea*. Purification, properties and reactions with humic acids. *Soil Biology and Biochemistry*, 45: 161-167.
- Litthauer, D., van Vuuren, M.J., van Tonder, A. y Wolfaardt, F.W. 2007. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 563-568.
- Litvintseva, A.P. y Henson, J.M. 2002. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1305-1311.
- Liu, L., Tewari, R.P. y Williamson, P.R. 1999. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, 67: 6034-6039.
- Lloret, L., Eibes, G., Lu-Chau, T.A., Moreira, M.T., Feijoo, G. y Lema, J.M. 2010. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochemical Engineering Journal*, 51: 124-131.
- Locci, R., Baldacci, E., Baldan, B.P. 1969. Genus *Streptoverticillium*: A taxonomic study. *Giornale di Microbiologia*, 17: 1-60.
- Locci, R. y Sharples, G.P. 1983. Morphology of Actinomycetes. Editado por Goodfellow, M., Mordarski, M., Williams, S.T. eds. In: The biology of the Actinomycetes. Academic Press, London. England. pp. 165-199.
- López, C.L. 1995. Caracterización del complejo xilanolítico producido por *Streptomyces chatanoogensis* UAH 23. Aplicación en el blanqueo de pasta de papel. *Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá de Henares*.

- Lorenzo, M., Moldes, D., Couto, S.R. y Sanromán, M.A. 2005. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere*, 60: 1124-1128.
- Lu, L.H., Zeng, G.M., Fan, C.Z., Zhang, J.C., Chen, A.W., Chen, M., Jiang, M., Yuan, Y.J., Wu, H.P., Lai, M.Y. y He, Y.B. 2014. Diversity of two-domain laccase-like multicopper oxidase genes in *Streptomyces* spp.: Identification of genes potentially involved in extracellular activities and lignocellulose degradation during composting of agricultural waste. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 3305-3314.
- 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.
- Lund, M. y Ragauskas, A.J. 2001. Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 699-703.
- M**
- Machczynski, M.C., Vijgenboom, E., Samyn, B., Canters, G.W. 2004. Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science*, 13: 2388-2397.
- Madzak, C., Jolival, C., Mimmi, M.C., Brault, A., Caminade, E., Mougin, C. y Beckerich, J.M. 2005. *Yarrowia lipolytica*, a yeast expression system adapted to the genetic engineering of complex proteins: directed mutagenesis of a fungal laccase. *FEBS Journal*, 272: 513-514.
- Maia, A.S., Ribeiro, A.R., Amorim, C.L., Barreiro, J.C., Cass, Q.B., Castro, P.M.L. y Tiritan, M.E. 2014. Degradation of fluoroquinolone antibiotics and identification of metabolites/transformation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1333: 87-98.
- Majeau, J.A., Brar, S.K. y Tyagi, R.D. 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 101: 2331-2350.
- Majumdar, S., Lukk, T., Solbiati, J.O., Bauer, S., Nair, S.K., Cronan, J.E. y Gerlt, J.A. 2014. Roles of small laccases from *Streptomyces* in lignin degradation. *Biochemistry*, 53: 4047-4058.
- Mandrioli, R., Albani, F., Casamenti, G., Sabbioni, C. y Raggi, M.A. 2001. Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of Carbamazepine and five of its metabolites in plasma of epileptic patients. *Journal of Chromatography B*, 762: 109-116.
- Manteca, A., Claessen, D., López-Iglesias, C. y Sánchez, J. 2007. Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiology Letters*, 274: 118-125.
- Manteca, A., Fernández, M. y Sánchez, J. 2005. Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves. *BMC Microbiology*, 5.
- 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 Technology*, 100: 5757-5762.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morato, C., Caminal, G. y Vicent, T. 2010a. 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., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morato, C., Caminal, G. y Vicent, T. 2010b. Degradation of the drug sodium Diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*, 176: 836-842.
- Marco-Urrea, E., Radjenovic, J., Caminal, G., Petrovic, M., Vicent, T. y Barceló, D. 2010c. Oxidation of atenolol, propranolol, Carbamazepine and clofibrac acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Water Research*, 44: 521-532.
- Margot, J., Bennati-Granier, C., Maillard, J., Blanquez, P., Barry, D., and Holliger, C. 2013. Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology Express*, 3 (63): 1-14.
- Martens, R., Wetzstein, H.G., Zadrazil, F., Capelari, M., Hoffmann, P. y Schmeer, N. 1996. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by wood-rotting fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4206-4209.
- Martínez, A.T. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin- degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 425-444.
- Martínez V, Hormigo D, del Cerro C, Gómez de Santos P, García-Hidalgo J, Arroyo M, Prieto A, García JL, de la Mata I. 2014. Genome sequence of *Streptomyces exfoliatus* DSMZ 41693, a source of poly(3-hydroxyalkanoate)-degrading enzymes. *Genome Announcements*, 2:1-2.
- 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 that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 18849-18859.
- 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 in Biochemistry*, 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 Letters*, 518: 29-32.
- Mate, D., García-Burgos, C., García-Ruiz, E., Ballesteros, A.O., Camarero, S. y Alcalde, M. 2010. Laboratory evolution of high-redox potential laccases. *Chemistry and Biology*, 17: 1030-1041.
- Matera, I., Gullotto, A., Tilli, S., Ferraroni, M., Scozzafava, A. y Briganti, F. 2008. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate. *Inorganica Chimica Acta*, 361: 4129-4137.
- Mazodier, P., Petter, R. y Thompson, C. 1989. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *Journal of Bacteriology*, 171: 3583-3585.
- Mccaig, B.C., Meagher, R.B. y Dean, J.F.D. 2005. Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 221: 619-636.
- Mccarthy, A.J. y Williams, S.T. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment: A review. *Gene*, 115: 189-192.
- Mellano, M.A. y Cooksey, D.A. 1988. Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, 170: 4399-4401.
- Mendes, S., Farinha, A., Ramos, C.G., Leitao, J.H., Viegas, C.A. y Martins, L.O. 2011. Synergistic action of azoreductase and laccase leads to maximal decolourization and detoxification of model dye-containing wastewaters. *Bioresource Technology*, 102: 9852-9859.

- Méndez, C., Brana, A.F., Manzanal, M.B. y Hardisson, C. 1985. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Canadian Journal of Microbiology*, 31: 446-450.
- Messerschmidt, A. 1992. Structural studies on copper-containing plant oxidases. *Biochemical Society Transactions*, 20: 364-368.
- Messerschmidt, A., Einsle, O. y Kroneck, P.M.H. 2001. Bacterial dissimilatory multiheme cytochrome c nitrite reductase: 3D structure, heme packing and reaction mechanism. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 86: 74.
- Messerschmidt, A. y Huber, R. 1990. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin: Modeling and structural relationships. *European Journal of Biochemistry*, 187: 341-352.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M. y Duran, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 13: 205-216.
- Miyazaki, K. 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles*, 9: 415-425.
- Mohapatra, D.P., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Picard, P. y Surampalli, R.Y. 2013. A comparative study of ultrasonication, Fenton's oxidation and ferro-sonication treatment for degradation of Carbamazepine from wastewater and toxicity test by Yeast Estrogen Screen (YES) assay. *Science of the Total Environment*, 447: 280-285.
- Moldes, D., Díaz, 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 Technology*, 99: 7959-7965.
- Molina-Guijarro, J.M. 2006. Caracterización físico-química y molecular de la lacasa producida por *Streptomyces ipomoea*. Evaluación de su potencial biotecnológico. *Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá de Henares*.
- 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*. *International Microbiology*, 12: 13-21.
- Montiel, M.D., Rodríguez, J., Pérez-Leblic, M.I., Hernández, M., Arias, M.E. y Copapatiño, J.L. 1999. Screening of mannanases in actinomycetes and their potential application in the biobleaching of pine kraft pulps. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 240-245.
- Montiel, M.D. 2000. Purificación y caracterización de β -endomananasas producidas por *Streptomyces ipomoea* CECT 3341. Aplicación en el blanqueo de pastas de papel. *Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá de Henares*.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 67-72.
- Mordukhova, E.A., Lee, H.S. y Pan, J.G. 2008. Improved thermostability and acetic acid tolerance of *Escherichia coli* via directed evolution of homoserine o-succinyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 7660-7668.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V. y Yaropolov, A.I. 2007a. "Blue" laccases. *Biochemistry-Moscow*, 72: 1136-1150.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V. y Yaropolov, Y.I. 2007b. Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43: 523-535.

- Moya, R., Hernández, M., García-Martín, A.B., Ball, A.S. y 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 Technology*, 101: 2224-2229.
- Moya, R. 2011. Caracterización de la lacasa de *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 y aproximación al estudio de su potencial oxidativo y función biológica. *Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá de Henares*.
- Moya, R., Saastamoinen, P., Hernández, M., Suurnakki, A., Arias, E. y Mattinen, M.L. 2011. Reactivity of bacterial and fungal laccases with lignin under alkaline conditions. *Bioresource Technology*, 102: 10006-10012.
- Murphy, M.E.P., Lindley, P.F. y Adman, E.T. 1997. Structural comparison of cupredoxin domains: Domain recycling to construct proteins with novel functions. *Protein Science*, 6: 761-770.
- 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 Research International*, 38: 995-1000.
- N**
- Naclerio, G., Falasca, A., Petrella, E., Nerone, V., Cocco, F., and Celico, F. 2010. Potential role of *Bacillus* endospores in soil amended by olive mill wastewater. *Water Science and Technology*, 61:2873-2879.
- Nakamura, K. y Go, N. 2005. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 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 Letters*, 553: 239-244.
- Negrón-Encarnación, I. y Arce, R. 2007. Light-induced transformations of aza-aromatic pollutants adsorbed on models of atmospheric particulate matter: Acridine and 9(10-H) acridone. *Atmospheric Environment*, 41: 6771-6783.
- Nerud, F., Baldrian, P., Eichlerova, I., Merhautova, V., Gabriel, J. y Homolka, L. 2004. Decolorization of dyes using white-root fungi and radical-generating reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22: 325-330.
- 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., Jacob, N. y Prema, P. 2008. Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 43: 654-660.
- Niladevi, K.N., Sukumaran, R.K. y Prema, P. 2007. Utilization of rice straw for laccase production by *Streptomyces psammoticus* in solid-state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34: 665-674.
- Nimz, H. 1974. Beech lignin: Proposal of a constitutional scheme. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 13: 313-321.
- Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Guebitz, G.M., Zvaunya, R., Read, J. y Steiner, W. 2002. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research*, 36: 1449-1456.
- Nyanhongo, G.S., Prasetyo, E.N., Acero, E.H. y Guebitz, G.M. 2012. Engineering strategies for successful development of functional polymers using oxidative enzymes. *Chemical Engineering and Technology*, 35: 1359-1372.

O

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. *Journal of Bacteriology*, 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4793-4799.

Osipov, E., Polyakov, K., Kittl, R., Shleev, S., Dorovatovsky, P., Tikhonova, T., Hann, S., Ludwig, R. y Popov, V. 2014. Effect of the L499M mutation of the ascomycetous *Botrytis aclada* laccase on redox potential and catalytic properties. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 70: 2913-2923.

Osma, J.F. Toca-Herrea, J.L. y Rodríguez-Couto, S. 2010. Uses of laccases in the food industry. *Enzyme Research*, 2010:1-8.

Otto, B. y Schlosser, D. 2014. First laccase in green algae: purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from *Tetracystis aeria*. *Planta*, 240: 1225-1236.

P

Pace, C.N. 1990. Measuring and increasing protein stability. *Trends in Biotechnology*, 8 (1990) 93-98.

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. *Journal of the American Chemical Society*, 123: 6591-6599.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. y Sanna, G. 2000. Copper

induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 920-924.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. y Sanna, G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 31301-31307.

Palmore, G.T.R. y Kim, H.H. 1999. Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 464: 110-117.

Pan, J.B., Zhao, M., Lu, L., Du, M.H., Li, G.F., Li, J., Wang T.N., Tang, X.L. 2011. Isolation and characterization of laccase activity in a novel *Bacillus amyloliquefaciens* LC02. *Advanced Materials Research*, 183: 773-777.

Parshikov, I.A., Heinze, T.M., Moody, J.D., Freeman, J.P., Williams, A.J. y Sutherland, J.B. 2001. The fungus *Pestalotiopsis guepini* as a model for biotransformation of Ciprofloxacin and Norfloxacin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 474-477.

Pearce, R.E., Vakkalagadda, G.R. y Leeder, J.S. 2002. Pathways of Carbamazepine bioactivation in vitro I. Characterization of human cytochromes P450 responsible for the formation of 2- and 3-hydroxylated metabolites. *Drug Metabolism and Disposition*, 30: 1170-1179.

Pereira, L., Coelho, A.V., Viegas, C.A., dos Santos, M.M.C., Robalo, M.P. y Martins, L.O. 2009. Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase. *Journal of Biotechnology*, 139: 68-77.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Brana, A.F., Shimkets, L.J., Sevillano, L. y Santamaría, R.I. 2011. *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microbial Biotechnology*, 4: 175-183.

- Persichini, T., De Francesco, G., Capone, C., Cutone, A., di Patti, M.C.B., Colasanti, M. y Musci, G. 2012. Reactive oxygen species are involved in ferroportin degradation induced by ceruloplasmin mutant Arg701Trp. *Neurochemistry International*, 60: 360-364.
- Pignatello, J.J., Oliveros, E. y MacKay, A. 2006. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36: 1-84.
- Piontek, K. 2002. New insights into lignin peroxidase. *Indian Journal of Chemistry*, 41: 46-53.
- Piontek, K., Antorini, M. y Choinowski, T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 37663-37669.
- Pointing, S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 20-33.
- Pokhrel, D. y Viraraghavan, T. 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater - a review. *Science of the Total Environment*, 333: 37-58.
- 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., Turkovskaya, O.V., Yudina, E.N. y Rodakiewicz-Nowak, Y. 2006. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: Purification and characterization. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42: 56-61.
- Prieto, A., Moder, M., Rodil, R., Adrián, L. y Marco-Urrea, E. 2011. Degradation of the antibiotics Norfloxacin and Ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation products. *Bioresource Technology*, 102: 10987-10995.
- Q**
- Quintanar, L., Stoj, C., Wang, T.P., Kosman, D.J. y Solomon, E.J. 2005. Role of aspartate 94 in the decay of the peroxide intermediate in the multicopper oxidase Fet3p. *Biochemistry*, 44: 6081-6091.
- R**
- Raghukumar, C. 2000. Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. *Mycological Research*, 104: 1222-1226.
- Ramachandra, M., Crawford, D.L. y Hertel, G. 1988. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 3057-3063.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A.M. y Goffner, D. 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - a divergent gene family - in poplar. *European Journal of Biochemistry*, 259: 485-495.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. y Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 597-635.
- Rasalingam, S., Peng, R. y Koodali, R.T., 2014. Removal of hazardous pollutants from wastewaters: Applications of TiO₂-SiO₂ mixed oxide materials. *Journal of Nanomaterials*, 2014: 1-42.
- Ray, L., Mishra, S.R., Panda, A.N., Rastogi, G., Pattanaik, A.K., Adhya, T.K., Suar, M. y Raina, V. 2014. *Streptomyces barkulensis* sp nov., isolated from an estuarine lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64: 1365-1372.

- 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*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 388-390.
- Reinhammar, B.R. y Vanngard, T.I. 1971. Electron-accepting sites in *Rhus vernicifera* laccase as studied by anaerobic oxidation-reduction titrations. *European Journal of Biochemistry*, 18: 463-468.
- Reinhammar, B.R. 1972. Oxidation-reduction potentials of electron acceptors in laccases and stellacyanin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 275: 245-259.
- Reinhammar, B. y Malmström, B.G. 1981. "Blue" copper-containing oxidases. In "Copper proteins" (Spiro, T.G. Ediciones), Wiley, New York, pp. 109-149.
- Reiss, R., Ihssen, J. y Thony-Meyer, L. 2011. *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnology*, 11.
- Renzetti, S., Courtin, C.M., Delcour, J.A. y Arendt, E.K. 2010. Oxidative and proteolytic enzyme preparations as promising improvers for oat bread formulations: Rheological, biochemical and microstructural background. *Food Chemistry*, 119: 1465-1473.
- Richardson, A. y McDougall, G.J. 1997. A laccase-type polyphenol oxidase from lignifying xylem of tobacco. *Phytochemistry*, 44: 229-235.
- Rigol, A., Latorre, A., Lacorte, S. y Barceló, D. 2002. Determination of toxic compounds in paper-recycling process waters by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 963: 265-275.
- Riva, S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24: 219-226.
- Rivera-Hoyos, C.M., Morales-Álvarez, E.D., Poutou-Pinales, R.A., Pedroza-Rodríguez, A.M., Rodríguez-Vázquez, R. y Gado-Boada, J.M. 2013. Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27: 67-82.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 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 Technology*, 77: 247-255.
- Rodríguez, E., Pickard, M.A. y Vázquez-Duhalt, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*, 38: 27-32.
- Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M. y Santamaría, R.I. 2013. Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways. *Microbial Cell Factories*, 12: 127
- Rodríguez-Couto, S.R. y Herrera, J.L.T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24: 500-513.
- Rojas, J.D., Starcevic, A., Baranašić, D., Ferreira-Torres, M.A., Contreras, C.A., Garrido, L.M., Araújo, W.L., de Souza, R.F., Zucko, J., Hranueli, D., Long, P.F., Cullum, J., Padilla, G. 2014. Genome sequence of *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622, producer of the antitumoral anthracycline cosmomycin D. *Genome Announcements*, 2(3):1-2.

- Rosado, T., Bernardo, P., Koci, K., Coelho, A.V., Robalo, M.P. y Martins, L.O. 2012. Methyl syringate: An efficient phenolic mediator for bacterial and fungal laccases. *Bioresource Technology*, 124: 371-378.
- Rosconi, F., Fraguas, L.F., Martínez-Drets, G. y Castro-Sowinski, S. 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium mehloti*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 800-807.
- Ruijsenaars, H.J. y Hartmans, S. 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 177-182.
- RxList, 2006. The Internet Drug Index. (<http://www.rxlist.com>).
- Ryden, L.G. y Hunt, L.T., 1993. Evolution of protein complexity - the blue copper-containing oxidases and related proteins. *Journal of Molecular Evolution*, 36: 41-66.
- S**
- Salas, S.D., Bennett, J.E., KwonChung, K.J., Perfect, J.R. y Williamson, P.R., 1996. Effect of the laccase gene, *Cnlac1*, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Experimental Medicine*, 184: 377-386.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. Molecular cloning. *CSHL Press*, Cold Spring Harbor, New York, 3ª Edición.
- Sánchez, L. 2009. Caracterización químico-física de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), una enzima con elevada estabilidad. *Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca*.
- 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*. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 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*. *Journal of Bacteriology*, 189: 4887-4898.
- Santos, I.J.S., Grossman, M., Sartoratto, A., Ponezi, A., Durrant, L. 2012. Degradation of the recalcitrant pharmaceuticals carbamazepine and 17-ethinylestradiol by ligninolytic fungi. *Chemical Engineering transactions*, 27, 169-174.
- Sárközy, G. 2001. Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Veterinarni Medicina*, 46: 257-274.
- Sato, Y., Bao, W.L., Sederoff, R. y Whetten, R. 2001. Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Journal of Plant Research*, 114: 147-155.
- Schoemaker, H.E. 1990. On the chemistry of lignin biodegradation. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society*, 109: 255-272.
- Schmid, R.D. and Urlacher, V. 2007. Modern biooxidation: enzymes, reactions and applications. Wiley-VCH, Weinheim, 318 pages.
- Schwartz, D., Grammel, N., Heinzemann, E., Keller, U. y Wohlleben, W. 2005. Phosphinothricin tripeptide synthetases in *Streptomyces viridochromogenes* Tu494. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 4598-4607.

- Seipke, R.F., Kaltenpoth, M. y Hutchings, M.I. 2012. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 862-876.
- Selcuk, H. 2005. Decolorization and detoxification of textile wastewater by ozonation and coagulation processes. *Dyes and Pigments*, 64: 217-222
- 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. *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 1137-1141.
- Servili, M., De Stefano, G., Piacquadio, P. y Sciancalepore, V. 2000. A novel method for removing phenols from grape must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51: 357-361.
- Shah, A.D., Dai, N. y Mitch, W.A. 2013. Application of ultraviolet, ozone, and advanced oxidation treatments to washwaters to destroy nitrosamines, nitramines, amines, and aldehydes formed during amine-based carbon capture. *Environmental Science and Technology*, 47: 2799-2808.
- Sharma, P., Goel, R. y Capalash, N. 2007. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 823-832.
- Sharma, K.K. y Kuhad, R.C. 2009. An evidence of laccases in archaea. *Indian Journal of Microbiology*, 49: 142-150.
- Sharma, K.K., Shrivastava, B., Sastry, V.R.B., Sehgal, N. y Kuhad, R.C. 2013. Middle-redox potential laccase from *Ganoderma* sp.: its application in improvement of feed for monogastric animals. *Scientific Reports*, 3.
- Sherif, M., Waung, D., Korbeci, B., Mavisakalyan, V., Flick, R., Brown, G., bou-Zaid, M., Yakunin, A.F. y Master, E.R. 2013. Biochemical studies of the multicopper oxidase (small laccase) from *Streptomyces coelicolor* using bioactive phytochemicals and site-directed mutagenesis. *Microbial Biotechnology*, 6: 588-597.
- 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. *Journal of the American Chemical Society*, 118: 3202-3215.
- Shleev, S., 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. *Biochemical Journal*, 385: 745-754.
- Shleev, S.V., Morozova, O., Nikitina, O., Gorshina, E.S., Rusinova, T., Serezhenkov, V.A., Burbaev, D.S., Gazaryan, I.G. y Yaropolov, A.I. 2004. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie*, 86: 693-703.
- Sitthisak, S., Howieson, K., Amezola, C. y Jayaswal, R.K. 2005. Characterization of a multicopper oxidase gene from *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 5650-5653.
- Skálová, T., Dohnalek, J., Ostergaard, L.H., Osteryaard, P.R., Kolenko, P., Duskova, J., Stepankova, A. y Hasek, J. 2009. The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases. *Journal of Molecular Biology*, 385: 1165-1178.
- Skálová, T., Duskova, J., Hasek, J., Stepankova, A., Koval, T., Ostergaard, L.H. y Dohnakle, J. 2011. Structure of laccase from *Streptomyces coelicolor* after soaking with potassium hexacyanoferrate and at an improved resolution of 2.3 angstrom. *Acta Crystallographica Section F*, 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. *Journal of Biotechnology*, 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.
- Solomon, E.I., Baldwin, M.J. y Lowery, M.D. 1992. Electronic-structures of active-sites in copper proteins: Contributions to reactivity. *Chemical Reviews*, 92: 521-542.
- 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. *Angewandte Chemie-International Edition*, 40: 4570-4590.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M. y Machonkin, T.E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96: 2563-2605.
- Sosna, M., Chretien, J.M., Kilburn, J.D. y Bartlett, P.N. 2010. Monolayer anthracene and anthraquinone modified electrodes as platforms for *Trametes hirsuta* laccase immobilisation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12: 10018-10026.
- Srebotnik, E. y Hammel, K.E. 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *Journal of Biotechnology*, 81: 179-188.
- Sterjiades, R., Dean, J.F.D. y Eriksson, K.E.L. 1992. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiology*, 99: 1162-1168.
- Strakova, E., Bobek, J., Zikova, A., Rehulka, P., Benada, O., Rehulkova, H., Kofronova, O., Vohradsky, J. 2013. Systems insight into the spore germination of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Proteome Research*, 12: 525-536.
- Strong, P.J. y Claus, H. 2011. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41: 373-434.
- Suárez, S., Carballa, M., Omil, F., Lema, J. 2008. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7: 125-138.
- Suty, H., De Traversay, C. y Cost, M. 2004. Applications of advanced oxidation processes: present and future. *Water Science and Technology*, 49: 227-233.
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K. y Inamori, Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67: 2167-2175.

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. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 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. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 11: 729-731.
- Takami, H., Takaki, Y. y Uchiyama, I. 2002. Genome sequence of *Oceanobacillus iheyensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments. *Nucleic Acids Research*, 30: 3927-3935.
- Talbot, N.J. 2003. Aerial morphogenesis: Enter the chaplins. *Current Biology*, 13: R696-R698.
- Tanaka, H., Itakura, S. y Enoki, A. 1999a. 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, H., Itakura, S. y Enoki, A. 1999b. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 75: 57-70.
- 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. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92: 312-316.
- Tauber, M.M., Guebitz, G.M. y Rehorek, A. 2005. Degradation of azo dyes by laccase and ultrasound treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2600-2607.
- Tavares Fernandes, A.J. 2011. Insight into the multicopper oxidases stability. *Doctoral Thesis. Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Portugal*.
- Tengerdy, R.P. 1985. Solid substrate fermentation. *Trends in Biotechnology*, 3: 96-99.
- Teather, R.M. y Wood, P.J. 1982. Use of Congo Red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 777-780.
- Ternes, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H.J., Gulde, B.H., Preuss, G., Wilme, U. y Seibert, N.Z. 2002. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental Science and Technology*, 36: 3855-3863.
- Thomas, L. y Crawford, D.L. 1998. Cloning of clustered *Streptomyces viridosporus* T7A lignocellulose catabolism genes encoding peroxidase and endoglucanase and their extracellular expression in *Pichia pastoris*. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 364-372.
- Thomas, S., Sreekanth, R., Sijumon, V.A., Aravind, U.K. y Aravindakumar, C.T. 2014. Oxidative degradation of Acid Red 1 in aqueous medium. *Chemical Engineering Journal*, 244: 473-482.
- Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140: 19-26.
- Tixier, C., Singer, H.P., Oellers, S. y Muller, S.R. 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology*, 37: 1061-1068.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I. y Le Borgne, S. 2003. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B-Environmental*, 46: 1-15.
- Tran, N.H., Hu, J.Y. y Urase, T. 2013. Removal of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) by laccase-mediated systems. *Bioresource Technology*, 147: 667-671.
- Tychanowicz, G.K., de Souza, D.F., Souza, C.G.M., Kadowaki, M.K. y Peralta, R.M. 2006. Copper improves the production of laccase by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49: 699-704.

U

- Uthandi, S., Saad, B., Humbard, M.A. y Maupin-Furrow, J.A. 2010. LccA, an archaeal laccase secreted as a highly stable glycoprotein into the extracellular medium by *Haloferax volcanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 733-743.

Uyama, H. y Kobayashi, S. 2002. Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 19: 117-127.

V

van Keulen, G., Jonkers, H.M., Claessen, D., Dijkhuizen, L. y Wosten, H.A.B. 2003. Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 185: 1455-1458.

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. *Journal of Bacteriology*, 3517-3530.

Vares, T., Kalsi, M. y Hatakka, A., 1995. Lignin peroxidases, manganese peroxidases and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat-straw. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3515-3520.

Verma, A. y Shikot, P. 2014. Purification and characterization of thermostable laccase from thermophilic *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 and its applications in removal of textile dyes. *Scholars Academic Journal of Biosciences* 2(8): 479-485

Vilaplana, M., García, A.B., Caminal, G., Guillén, F. y Sarra, M. 2012. Optimisation of the operational conditions of trichloroethylene degradation using *Trametes versicolor* under quinone redox cycling conditions using central composite design methodology. *Biodegradation*, 23: 333-341.

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. *Research on Chemical Intermediates*, 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.

Vogna, D., Marotta, R., Andreozzi, R., Napolitano, A. y d'Ischia, M. 2004. Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of antiepileptic drug carbamazepine. *Chemosphere*, 54: 497-505.

Volkin, D.B. y Klibanov, A.M. 1989. Mechanism of thermoinactivation of immobilized glucose-isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 1104-1111.

Vries, O.M.H.D., Kooistra, W.H.C.F. y Wessels, J.G.H. 1986. Formation of an extracellular laccase by a *Schizophyllum commune* dikaryon. *Journal of General Microbiology* 132: 2817-2826.

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. *Nature Genetics*, 21: 195-199.

W

Wallemacq, P.E. y Reding, R. 1993. Fk506 (Tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ-transplantation: Clinical, biomedical, and analytical aspects. *Clinical Chemistry*, 39: 2219-2228.

Walter, R.L., Ealick, S.E., Friedman, A.M., Blake, R.C., Proctor, P. y Shoham, M. 1996. Multiple wavelength anomalous diffraction (MAD) crystal structure of rusticyanin: A highly oxidizing cupredoxin with extreme acid stability. *Journal of Molecular Biology*, 263: 730-751.

Wammer, K.H., Korte, A.R., Lundeen, R.A., Sundberg, J.E., McNeill, K. y Arnold, W.A. 2013. Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials:

- Norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin. *Water Research*, 47: 439-448.
- Wang, C.L., Zhao, M., Li, D.B., Cui, D.Z., Lu, L. y Wei, X.D. 2010. Isolation and characterization of a novel *Bacillus subtilis* WD23 exhibiting laccase activity from forest soil. *African Journal of Biotechnology*, 9: 5496-5502.
- 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. *Nature Biotechnology*, 22: 893-897.
- Wang, H.X. y Ng, T.B. 2004. Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315: 450-454.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. y Bhole, B.D., 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176: 386-390.
- Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A. y Wohlleben, W. 2003. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *Journal of Biotechnology*, 106: 221-232.
- Webster, J.M., Li, J., Chen, G. 2000. Anticancer properties of dithiopyrrolones. US Patent 6020360.
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 2091-2097.
- Weinstock, I.A., Atalla, R.H., Reiner, R.S., Moen, M.A., Hammel, K.E., Houtman, C.J. y Hill, C.L. 1996. A new environmentally benign technology and approach to bleaching kraft pulp. Polyoxometalates for selective delignification and waste mineralization. *New Journal of Chemistry*, 20: 269-275.
- Werner, W., Rey, H.G. y Wielinger, H. 1970. Über die eigenschaften eines neuen chromogens für die blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-methode. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 252: 224-228.
- Wetzstein, H.G., Stadler, M., Tichy, H.V., Dalhoff, A. y Karl, W. 1999. Degradation of ciprofloxacin by basidiomycetes and identification of metabolites generated by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1556-1563.
- Widsten, P. y Kandelbauer, A., 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 293-307.
- Wiethaus, J., Wirsing, A., Narberhaus, F. y Masepohl, B., 2006. Overlapping and specialized functions of the molybdenum-dependent regulators *MopA* and *MopB* in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 188: 8441-8451.
- Williams, S.T. y Flowers, T.H. 1978. The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic streptomycetes. *Microbios*, 20:99- 106.
- Worrall, J.J., Chet, I. y Huttermann, A. 1986. Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria* Spp. *Journal of General Microbiology*, 132: 2527-2533.
- Wright, F. y Bibb, M.J. 1992. Codon Usage in the G+C-Rich *Streptomyces* Genome. *Gene*, 113: 55-65.
- Wu, J., Kim, K.S., Lee, J.H. y Lee, Y.C. 2010. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and enzymatic properties of laccase from *Aeromonas hydrophila* WL-11. *Journal of Environmental Sciences-China*, 22: 635-640.

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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 493-501.

Xu, F. 1996. 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. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 924-928.

Xu, F. 2005. Applications of oxidoreductases: recent progress. *Industrial Biotechnology*, 1: 38-50.

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. *Biochemical Journal*, 334: 63-70.

Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K.C., Krikstopaitis, K., Deussen, H.J.W., Abbate, E., Galinyte, V. y Schneider, P. 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2052-2056.

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. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 12372-12375.

Y

Yagüe, S., Terrón, M.C., González, T., Zapico, E., Bocchini, P., Galletti, G.C. y González, A.E. 2000. Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot

basidiomycete *Corioloopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14: 905-910.

Yan, X., Sims, J., Wang, B. y Hamann, M.T. 2014. Marine actinomycete *Streptomyces* sp ISP2-49E, a new source of Rhamnolipid. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55: 292-295.

Yang, S., Hai, F.I., Nghiem, L.D., Price, W.E., Roddick, F., Moreira, M.T. y Magram, S.F. 2013. Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: A critical review. *Bioresource Technology*, 141: 97-108.

Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. y Varfolomeyev, S.D. 1994. Laccase - properties, catalytic mechanism and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 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 Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 254-262.

Yin, X.H., Gagnat, J., Gerbaud, C., Guérineau, M. y Virolle, M.J. 1997. Cloning and characterization of a new α -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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 626-634.

Yoshida, H. 1883. Chemistry of lacquer (urishi) part 1. *Journal of the Chemical Society (Tokyo)* 43: 472-486.

Z

- Zhang, Y.J., Geissen, S.U. y Gal, C. 2008. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73: 1151-1161.
- Zhang, X., Stebbing, D.W., Soong, G., Saddler, J.N. y Beatson, R.P. 2002. A combined fungal and enzyme treatment system to remove TMP/newsprint mill white water substances. *Tappi Journal*, 1: 26-32.
- Zhu, X.D., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A. y Williamson, P.R. 2001. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infection and Immunity*, 69: 5589-5596.

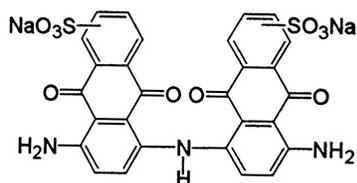
Anexos

ANEXO I

Estructura de los tintes utilizados en este estudio

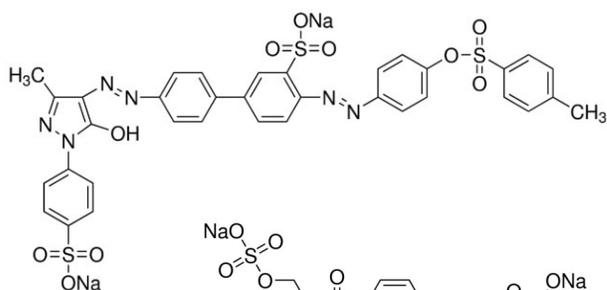
ANTRAQUINONA

Acid Black 48

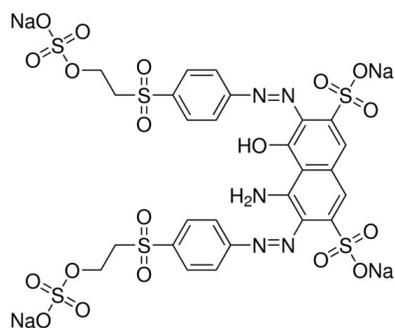


DIAZO

Acid Orange 63

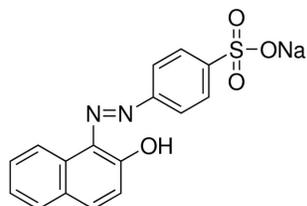


Reactive Black 5

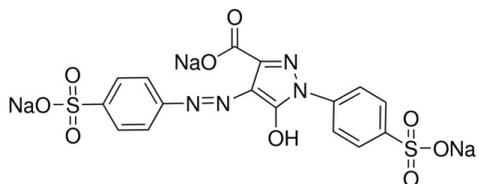


AZO

Orange II

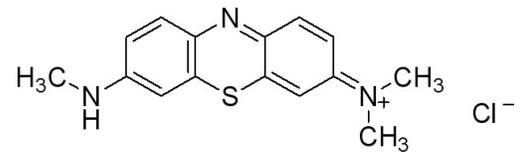


Tartrazine



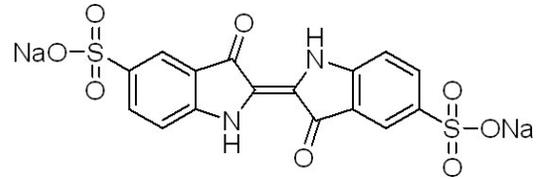
HETEROCICLO

Azure B



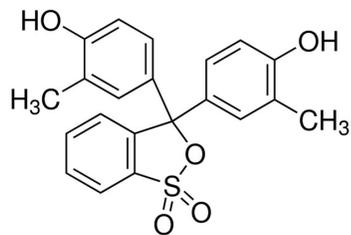
INDIGO

Indigo Carmine



TRIARILMETANO

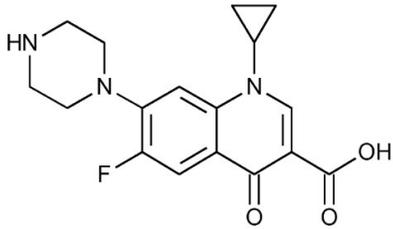
Triarilmetano



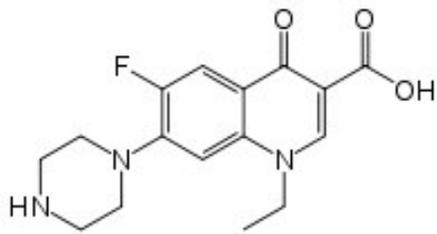
ANEXO II

Estructura de los fármacos utilizados en este estudio

Ciprofloxacina



Norfloxacin



Carbamazepina

