

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA**

EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN SINTÉTICO *Lac2* DE *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* EN *Escherichia coli* Y *Pichia pastoris*

POR:

Q.B.P. ARLETT FABIOLA LOYA HERNANDEZ

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

MAYO 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., 28 de abril de 2022.

Oficio: 14/CA/SIP/22

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P R E S E N T E

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **“EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN SINTÉTICO *Lac2* DE *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* EN *Escherichia coli* Y *Pichia pastoris*”**, presentada por la **Q.B.P. Arlett Fabiola Loya Hernández**, alumna del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

A t e n t a m e n t e
“Por la ciencia para bien del hombre”

M.C. Tania Samantha Siqueiros Cendón
Asesora de tesis

Dr. Sigifredo Arévalo Gallegos
Asesor de tesis

Dr. Quintín Rascón Cruz
Asesor de tesis

Dra. Blanca Flor Iglesias Figueroa
Asesora de tesis



FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS
SECRETARÍA
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Dr. Edward Alexander Espinoza Sánchez
Director de tesis

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado

*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>

Chihuahua, Chih. a 26 de abril de 2022

DR. ILDEBRANDO PÉREZ REYES
SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
P R E S E N T E

Por medio de la presente, el que suscribe, Dr. Edward Alexander Espinoza Sánchez, profesor investigador adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, y Director de tesis de la alumna **Arlett Fabiola Loya Hernandez**, del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología, hago constar que su trabajo de tesis de maestría “**Expresión del transgén sintético *Lac2* de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*” se encuentra concluido y liberado por un servidor; por lo cual, está lista para proceder con los trámites necesarios para su proceso de titulación.**

Agradeciendo de antemano las atenciones brindadas, quedo de usted.

Cordialmente,



Dr. Edward A. Espinoza Sánchez

Director de tesis

DEDICATORIA

Sentada aquí frente a la pantalla observando el fruto de mi esfuerzo y dedicación quiero dedicar este trabajo a lo más importante que tengo en mi vida.

Para mis papas, Julio Loya y Mayra Hernandez, por ser los principales motores de mis sueños y siempre impulsarme a lograr cualquier cosa que me proponga. Nunca me cansare de decirles que todo lo que soy es gracias a ustedes y a su amor incondicional.

Para mis hermanos, Betzy Loya y Cesar Loya, ustedes son la razón de que me esfuerce día con día por ser una mejor persona y un buen ejemplo a seguir.

Para mi papi Lupe, mi prenda del alma, tengo la certeza que desde el cielo me mando la fuerza para culminar esta meta y estar orgulloso de mi. Y aunque ya no lo tengo más aquí a mi lado, lo llevo por siempre en mi corazón.

Para mi mami Vange, sus palabras de sabiduría y consejos me han traído hasta aquí, espero me sea eterna y me alcance la vida para regresar todo el amor incondicional que me da.

Para mi mejor amigo, mi novio, Alonso Dimas, sin ti no lo hubiera logrado. Creíste en mi cuando ni siquiera yo lo hacía, cada día estuviste aquí, haciéndome fuerte, sosteniéndome. No me alcanzan las palabras para agradecer tu presencia en mi vida.

Para mis pequeños, Molly y Odie, mi motivación para levantarme cada día, mis rayitos de luz en la oscuridad, gracias por regresarle la alegría a mi vida.

Para mi Toby, yo sé que estas en un mejor lugar ahora, pero como le haces falta a mi vida, gracias por tantos años de felicidad, todos mis triunfos son para ti, por siempre vivirás en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser la fuerza que me motiva, la mano que me sustenta, el amor que me alienta y la gracia que me protege. “Todo lo puedo en aquel que me fortalece” Fil 4:13

A mis papas, Julio Loya y Mayra Hernandez, porque cuando se trata de agradecer no alcanzan las palabras, gracias a ustedes estoy donde estoy ahora, este triunfo es más suyo que mío. Gracias por su apoyo incondicional, los amo con todo mi ser.

A mi hermana y mejor amiga, Betzy Loya, y a mi hermano, Cesar Loya, gracias por hacer mi vida más feliz y siempre alentarme a seguir mis sueños.

A mi novio, Alonso Dimas, gracias infinitas por motivarme día a día, por estar conmigo en mis mejores y peores momentos, por no dejarme sola, gracias por compartir tu vida conmigo y darme los dos regalos más bonitos. Te amo y este logro también lleva tu nombre.

A mi amiga Tanhia, sabes lo mucho que significa tu amistad para mí, gracias por ser un apoyo tan enorme durante este último año, por estar al pie del cañón, te quiero muchísimo.

A mi amigo y compañero de generación, Alejandro Velarde, tu amistad es uno de los mejores regalos que me trajo la maestría, gracias por tu apoyo incondicional, tus consejos y por darle alegría a mi vida.

A mi amiga, Nayely Robles, gracias por alumbrarme el camino cuando solo veía oscuridad y por levantar la toalla cada vez que la tiraba, gracias por ser uno de los más grandes apoyos que tuve durante esta etapa.

A mi compañero y amigo, Amado Sardiña, gracias por tu tiempo, tu apoyo y sobre todo gracias por tu paciencia.

Al Dr. Edward Alexander Espinoza Sánchez por una vez más depositar su confianza en mí, por siempre impulsarme a ser una mejor investigadora, por brindarme su tiempo y sus conocimientos. Mil gracias por ayudarme a culminar una meta más.

A la Dra. Blanca Flor Iglesias por motivarme a formar parte del equipo, por siempre estar dispuesta a ayudar y compartir su gran conocimiento, pero sobre todo por brindarme su confianza y su amistad.

A la M.C. Tania Siqueiros, el Dr. Quintín Rascón y el Dr. Sigifredo Arévalo por darme la oportunidad de trabajar nuevamente en el equipo, por su tiempo, dedicación y sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio Yaneiry, Rodrigo, Dalia, Carlos, Mario, Noé y Brenda por su apoyo y por todas las bellas experiencias que pasamos juntos.

A la Facultad de Ciencias Químicas por haberme permitido culminar mis estudios de maestría.

A CONACYT porque gracias a la beca otorgada logre un grado más en mis estudios profesionales.



CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. ANTECEDENTES	5
4.1 Enzimas lacasa	5
4.1.1 Organismos productores de lacasas	6
4.1.1.1 <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i>	8
4.1.2 Estructura y mecanismo de acción de las lacasas	9
4.1.3 Sistema lacasa mediador (LMS)	12
4.1.4 Aplicaciones de las lacasas	14
4.1.4.1 Biorremediación.....	16
4.1.4.2 Degradación de verde de malaquita (MG).....	18
4.1.5 Producción heteróloga de lacasas.....	19
4.2 <i>Escherichia coli</i> como sistema de expresión	22
4.2.1 Acumulación de proteínas en cuerpos de inclusión.....	25
4.3 <i>Pichia Pastoris</i> como sistema de expresión	26
4.3.1 Excreción de proteínas al medio de cultivo	27
4.3.2 Glicosilación de proteínas	27
V. JUSTIFICACIÓN	28
VI. HIPÓTESIS	30
VII. OBJETIVOS	31
Objetivo general:.....	31
Objetivos específicos:.....	31
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	32
8.1 Materiales	32
8.1.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	32
8.1.2 Plásmidos y gen de interés.....	32



8.2	Métodos	33
8.2.2	Análisis de la secuencia y clonación del transgén <i>Lac2</i> en el vector pPICZαA®	33
8.2.3	Comparación <i>in silico</i> de la lacasa codificada por el transgén <i>Lac2</i> con otras lacasas	33
8.2.4	Modelación de ligando y Docking molecular	34
8.2.5	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	35
8.2.6	Transformación genética de <i>E. coli</i> para la conservación y propagación de plásmidos	35
8.2.7	Extracción de ADN plasmídico	36
8.2.8	Caracterización de clonas transformantes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3): mapa parcial y amplificación del transgén de interés mediante PCR	37
8.2.9	Preparación de ADN para la transformación genética de <i>P. pastoris</i> X33	37
8.2.10	Preparación de células electro competentes de <i>P. pastoris</i> para su transformación genética	38
8.2.11	Transformación genética de <i>P. pastoris</i> X33	38
8.2.12	Extracción de ADN genómico y amplificación del gen de interés mediante PCR en <i>P. pastoris</i> X33	39
8.2.13	Inducción de la expresión y recuperación de proteínas recombinantes de <i>E. coli</i>	40
8.2.14	Inducción de la expresión y obtención de proteínas recombinantes de <i>P. pastoris</i>	41
8.2.15	Cuantificación de proteínas totales	42
8.2.16	Análisis de proteínas en gel de acrilamida SDS-PAGE	42
8.2.17	Identificación de glicoproteínas en SDS-PAGE	44
8.2.18	Análisis enzimático de <i>Lac2</i> recombinante	44
8.2.19	Decoloración de verde de malaquita por <i>Lac2</i> recombinante	46
8.2.20	Análisis de varianza (ANOVA) de un factor	46
IX.	RESULTADOS	47
9.1	Análisis y clonación de la secuencia del transgén <i>Lac2</i> en el vector pPICZαA®	47
9.2	Comparación <i>in silico</i> de la lacasa codificada por el transgén <i>Lac2</i> con otras lacasas	50
9.3	Modelación de ligando y Docking molecular	54



9.4	Caracterización de clonas transformantes de <i>E. coli</i> BL21(DE3) con el plásmido pMBO2.....	58
9.5	Caracterización de clonas transformantes de <i>E. coli</i> BL21(DE3) con el plásmido pALH1	60
9.6	Caracterización de clonas transformantes de <i>P. pastoris</i> X33 con el plásmido pALH1	63
9.7	Cuantificación y análisis SDS-PAGE de proteínas totales en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	66
9.8	Cuantificación y análisis SDS-PAGE de proteínas totales en <i>P. pastoris</i> X33	68
9.9	Análisis enzimático de eLac2 y pLac2 recombinante	71
9.9.1	Efecto del pH en la actividad enzimática.....	72
9.9.2	Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.....	75
9.9.3	Efecto de iones metálicos en la actividad enzimática	77
9.9.4	Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max}	79
9.10	Decoloración de verde de malaquita por Lac2 recombinante.....	81
X.	CONCLUSIONES.....	84
XI.	PERSPECTIVAS.....	85
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	86
XIII.	APÉNDICE I: CONSTRUCCIÓN pMBO2	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología microscópica de las macrohifas e hifopódios de <i>Gaeumannomyces graminis</i> var <i>graminis</i>	9
Figura 2. Representación del sitio activo de la lacasa CotA de <i>Bacillus subtilis</i> con los tres tipos de cobre y la distancia en angstroms entre los átomos relevantes	10
Figura 3. Ciclo catalítico de las lacasas	11
Figura 4. Estructura cristalográfica de enzimas lacasa de distintas fuentes.....	12
Figura 5. Representación esquemática del LMS	13
Figura 6. Mapa <i>in silico</i> de la construcción pMBO2 visualizado en SnapGene®	47
Figura 7. Secuencia de la región codificante del transgén <i>Lac2</i> de <i>G. graminis</i> var <i>graminis</i>	48
Figura 8. Mapa <i>in silico</i> de la construcción pALH1 visualizado en SnapGene®	49
Figura 9. Modelado tridimensional de las proteínas lacasa	51
Figura 10. Comparación de proteínas lacasa.....	52
Figura 11. Alineamiento múltiple con Clustal Omega	54
Figura 12. Centro activo de la proteína Lac2	55
Figura 13. Acoplamiento molecular del ligando ABTS en el centro activo del modelo de la proteína Lac2	56
Figura 14. Acoplamiento molecular del ligando ABTS con otras lacasas.....	57
Figura 15. Caracterización del ADN plasmídico de pMBO2 por enzimas de restricción	59
Figura 16. Caracterización del ADN plasmídico de pMBO2 por PCR	60
Figura 17. Caracterización del ADN plasmídico de pALH1 con enzimas de restricción	61
Figura 18. Caracterización del ADN plasmídico de pALH1 por PCR.....	62
Figura 19. Caracterización del ADN genómico de <i>P. pastoris</i> para verificar la integración del transgén <i>Lac2</i>	64
Figura 20. Caracterización del ADN genómico de <i>P. pastoris</i> para verificar la integración del transgén <i>Lac2</i> en el promotor AOX1	65
Figura 21. Análisis SDS-PAGE de las proteínas de <i>E. coli</i> BL21(DE3)	67
Figura 22. Análisis SDS-PAGE de las proteínas de <i>P. pastoris</i> X33.....	69
Figura 23. Determinación de los sitios de glicosilación de la proteína Lac2 con NetNGlyc.	70



Figura 24. Identificación de glicoproteínas en SDS-PAGE.....	71
Figura 25. Efectos del pH en la actividad enzimática de la proteína Lac2.....	73
Figura 26. Efectos de la temperatura en la actividad enzimática de la proteína Lac2.....	76
Figura 27. Efectos de los iones metálicos en la actividad enzimática de la proteína Lac2.....	78
Figura 28. Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la proteína Lac2.....	80
Figura 29. Aplicación de la proteína Lac2 para la degradación de MG.....	83
Figura 30. Secuencia de la region codificante del gen <i>Lac2</i> de <i>G. graminis</i> var <i>graminis</i>.....	101
Figura 31. Secuencia original del gen <i>Lac2</i> y los sitios que codifican para las enzimas de restricción <i>SacI</i>, <i>NcoI</i> y <i>SmaI/XmaI</i>.....	103



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Expresión heteróloga de lacasas en diferentes organismos huésped. 20

Tabla 2. Principales proteínas de uso terapéutico producidas por *E. coli* 24

I. RESUMEN

La búsqueda de nuevas tecnologías ecológicas y eficientes para reemplazar los métodos convencionales no sostenibles de degradación de contaminantes en efluentes de aguas residuales ha aumentado el interés en la investigación enzimática. En este contexto, las enzimas lacasa (EC1.10.3.2) son agentes catalizadores biológicos y benignos útiles para la biorremediación al degradar los compuestos tóxicos como compuestos fenólicos y no fenólicos, utilizando oxígeno molecular mediante un mecanismo catalizado por radicales, en otros metabolitos intermedios menos tóxicos o inocuos. Dado que la búsqueda de fuentes de enzimas lacasa con actividad eficiente se torna apremiante, en este estudio titulado: “Expresión del transgén sintético *Lac2* de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*”, se realizó la clonación del transgén *Lac2* que codifica la enzima lacasa mediante herramientas de ingeniería genética en el vector pET32a(+)[®] y pPICZαA[®] para su expresión en *E. coli* y *P. pastoris*, respectivamente. Se determinó que la lacasa recombinante *Lac2* expresada en *E. coli* y *P. pastoris* con un peso molecular aparente de 64 kDa y 73 kDa, debido a las glicosilaciones, exhibe la actividad enzimática más alta en pH de 5.0 y 5.5 a una temperatura de 60 y 30 °C, respectivamente, con ABTS (ácido 2,2-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) como sustrato. El análisis en presencia de iones metálicos muestra que la actividad de *Lac2* recombinante aumentó con 10 mM de Cu²⁺ y Fe³⁺. Además, *Lac2* recombinante presentó la capacidad de degradar más del 70% de colorante verde de malaquita sin la adición de algún mediador redox, lo que reduce la probabilidad de producir metabolitos que puedan ser más tóxicos que el mismo colorante. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de expresión de la proteína lacasa de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* en *E. coli* y *P. pastoris*; por lo que los resultados obtenidos en la presente investigación se suman a resultados obtenidos con lacasas de otros organismos, las cuales pueden ser optimizadas para utilizarse en la industria bioenergética o en bioremediación; además, estos resultados permitirán escalar la producción de lacasas en plantas para evaluar disminuciones de lignina en paredes celulares.



II. ABSTRACT

The search for new eco-friendly and efficient technologies to replace unsustainable conventional methods of degradation of pollutants in wastewater effluents has increased interest in enzymatic research. In this context, laccase enzymes (EC1.10.3.2) are benign and biological catalytic agents useful for bioremediation by degrading toxic compounds such as phenolic and non-phenolic compounds, using molecular oxygen through a radical-catalyzed mechanism, in other intermediate metabolites. less toxic or harmless. Since the search for sources of laccase enzymes with efficient activity becomes urgent, in this study entitled: "Expression of the synthetic transgene *Lac2* from *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*", the *Lac2* transgene encoding the laccase enzyme was cloned using genetic engineering tools in the vector pET32a (+)® and pPICZαA® for its expression in *E. coli* and *P. pastoris*, respectively. It was determined that the recombinant laccase Lac2 expressed in *E. coli* and *P. pastoris* with an apparent molecular weight of 64 kDa and 73 kDa, due to glycosylations, exhibits the highest enzymatic activity at pH 5.0 and 5.5 at a temperature of 60 and 30 °C, respectively, with ABTS (2,2-azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) as substrate. Analysis in the presence of metal ions shows that the activity of the recombinant laccase increased with 10 mM of Cu²⁺ and Fe³⁺. In addition, recombinant Lac2 presented the ability to degrade more than 70% of malachite green dye without the addition of any redox mediator, which represents a great advantage compared to other reported laccases because the probability is reduced to produce metabolites that may be more toxic than the same dye. As far as we know, this is the first report of expression of the laccase protein of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* in *E. coli* and *P. pastoris*; therefore, the results obtained in the present investigation they are added to the results obtained with laccases from other organisms, which can be optimized for use in the bioenergy industry or in bioremediation; furthermore, these results will make it possible to scale the production of laccases in plants to evaluate decreases of lignin in cell walls.

III. INTRODUCCIÓN

Las lacasas o fenol oxidasas (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxigenoreductasa) son enzimas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de compuestos orgánicos aromáticos (orto y para-difenoles, fenoles sustituidos con metoxi, polifenoles, aminas aromáticas, bencenetioles, hidroxindoles, 1-naftol, siringaldazina y algunos otros compuestos no fenólicos) para producir radicales con la ayuda de cuatro átomos de cobre, que forman el núcleo catalítico principal de la enzima y promueven la reducción del oxígeno molecular a agua (Hilgers *et al.*, 2018). Están compuestas por tres motivos parecidos a la cupredoxina y tienen dos centros de cobre. Cerca de la superficie de la proteína hay un centro mononuclear llamado sitio T1, que está coordinado por dos histidinas y una cisteína. El cobre tipo I es el que le da a la enzima su típico color azul y es ahí donde se produce la oxidación monoeléctrica del sustrato y por tanto es el primer aceptor de electrones. Internalizado en la proteína hay un grupo trinuclear, llamado sitio T2-T3, que tiene dos cobres T3 coordinados por tres histidinas cada uno y un centro T2 coordinado por dos residuos de histidina, al cual se transfieren los electrones y donde se lleva a cabo la oxidación del oxígeno molecular a agua (Baldrian, 2006; Bento *et al.*, 2005). Las enzimas lacasa tienen una alta variación en el potencial redox (E_0), es decir, el tipo de sustrato puede cambiar de una lacasa a otra; esto provoca que exista una amplia gama de compuestos que pueden ser oxidados por ellas y que sea difícil clasificarlas según el sustrato reductor (More *et al.*, 2011; Viswanath *et al.*, 2014).

Estas enzimas son casi ubicuas, es decir, están ampliamente distribuidas en varias plantas, insectos, un gran número de hongos, algunas bacterias y, más recientemente, en algas (Otto *et al.*, 2010). La primera descripción de la lacasa la hizo Yoshida (1883) cuando la extrajo de los exudados del árbol de laca japonés *Rhus vernicifera*; posteriormente Bertrand (1885) la aisló y purificó (Thurston, 1994). Las lacasas fúngicas participan en la deslignificación, la esporulación, la producción de pigmentos, la formación de cuerpos fructíferos y la patogénesis en las plantas. Gracias a su alto potencial redox, han sido de gran interés en diversas aplicaciones industriales



y biotecnológicas que incluyen, mejoramiento de fibras, biosíntesis, aprovechamiento energético, protección ambiental, biodetección, degradación de tintes sintéticos, industria de impresión y teñido, pulpa de papel y biorremediación de algunos desechos químicos tóxicos (compuestos aromáticos clorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitroaromáticos y plaguicidas) en las aguas residuales (Agrawal *et al.*, 2018; Upadhyay *et al.*, 2016). En este contexto, las lacasas tienen varias ventajas sobre otras enzimas; requerimientos de catálisis simple (presencia de sustrato y O₂), alta estabilidad, ausencia de inhibición (como se observa con H₂O₂ para peroxidasa), y la posibilidad de utilizarlas en forma inmovilizada, utilizando diferentes tipos de soportes orgánicos o inorgánicos (Fortes *et al.*, 2017).

La obtención de lacasas de fuentes nativas no satisface las necesidades de los procesos industriales, además, los costos en los procedimientos de cultivo y depuración son muy elevados. Por esta razón, la expresión heteróloga de las lacasas se muestra como una alternativa prometedora, donde el uso de organismos hospedantes que son fáciles de cultivar y manipular genéticamente aumenta la productividad y disminuye el tiempo y costo de producción (Brijwani *et al.*, 2010; Kunamneni *et al.*, 2008). Bajo esta premisa, *Escherichia coli* es ampliamente utilizada como organismo huésped para la expresión de proteínas heterólogas; esto se debe a que es un sistema más económico y escalable, está caracterizado genéticamente y tiene altos niveles de producción, pero la expresión de proteínas recombinantes de alto nivel a menudo conduce a un plegamiento incorrecto de proteínas en cuerpos de inclusión, que carecen de actividad biológica. Por otro lado, *Pichia pastoris* es una levadura también utilizada en la expresión de proteínas heterólogas; se caracteriza por tener una tasa de crecimiento relativamente rápida en medios de cultivo baratos, además de que su principal ventaja es que realiza el correcto plegamiento de proteínas y la generación de modificaciones postraduccionales (Guo *et al.*, 2017; Serrano *et al.*, 2016). El objeto de estudio de este proyecto es el análisis de la expresión del transgén sintético *Lac2 Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* que codifica la enzima lacasa en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris* para comprobar si se obtiene una proteína funcional en ambos sistemas.

IV. ANTECEDENTES

4.1 Enzimas lacasa

Las lacasas o fenol oxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de una gran variedad de compuestos orgánicos aromáticos (orto y para-difenoles, fenoles metoxi-substituidos, polifenoles, aminas aromáticas, bencenotioles, hicroxindoles, el 1-naftol, la siringaldazina y algunos otros compuestos no fenólicos) para producir radicales con la ayuda de cuatro átomos de cobre, que forman el núcleo catalítico principal de la enzima y promueven la reducción del oxígeno molecular a agua (Hilgers *et al.*, 2018). Las lacasas (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxigenorductasa) forman parte de este amplio subgrupo de oxidasas azules multicobre. Debe su nombre a que fue descubierta, hace más de un siglo, en el árbol japonés de laca: *Rhus vernicifera* (Thurston, 1994). Además de los compuestos ya mencionados, los compuestos metálicos inorgánicos/orgánicos Mn^{+2} y $Fe(EDTA)^{-2}$ son otros sustratos capaces de ser utilizados por las lacasas en presencia de mediadores orgánicos de bajo peso molecular que forman radicales catiónicos altamente reactivos al ser oxidados, entre ellos encontramos al ABTS (2,2'azino bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)) y el HBT (1-hidroxibenzotriazol) (Rodríguez, 2019). Las enzimas lacasas tienen una alta variación en el potencial redox (E^0), es decir el tipo de sustrato puede cambiar de una lacasa a otra; esto provoca que exista un amplio rango de compuestos que pueden ser oxidados por ellas y que sea difícil clasificarlas de acuerdo al sustrato reductor (More *et al.*, 2011; Viswanath *et al.*, 2014).

En los estudios realizados para la caracterización de lacasas, el común denominador ha sido la multiplicidad de genes y la producción de numerosas isoenzimas en distintas especies. Las familias de genes probablemente producen proteínas estrechamente relacionadas que son sutilmente diferentes en sus actividades, permitiendo ampliar la gama de sustratos o mostrando una regulación diferencial (Johannes y Majcherczyk, 2000; Monssef *et al.*, 2016). Además, se tiene la teoría de que algunos de los genes pudieran ser expresados en diferentes condiciones fisiológicas; sin embargo, a pesar de que se han estudiado algunas familias



multigénicas para la producción de este tipo de enzimas, sería interesante incrementar la búsqueda de nuevos argumentos para confirmar esta teoría (Schneider *et al.*, 1999).

La búsqueda de tecnologías de oxidación ecológicas y eficientes para reemplazar los métodos convencionales no ecológicos y no sostenibles ha aumentado el interés en la investigación enzimática. En este contexto, las lacasas presentan diversas ventajas, frente a otras enzimas; requisitos simples de catálisis (presencia de sustrato y O₂), alta estabilidad, falta de inhibición (como se ha observado con H₂O₂ para la peroxidasa) y la posibilidad de utilizarlas de forma inmovilizada, empleando diferentes tipos de soportes orgánicos o inorgánicos (Fortes *et al.*, 2017). Por esta razón, en los últimos años se ha incrementado el uso de dichas enzimas en operaciones industriales y en aplicaciones biotecnológicas que incluyen el mejoramiento de fibras, biosíntesis, explotación energética, protección del medio ambiente, biodetección, degradación de tintes sintéticos, industria de impresión y teñido, pulpa de papel y la biorremediación de algunos desechos químicos tóxicos (compuestos aromáticos clorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitroaromáticos y pesticidas) en aguas residuales (Agrawal *et al.*, 2018; Upadhyay *et al.*, 2016).

La enzimología general de las lacasas ha sido discutida en numerosas revisiones en donde se presentan descripciones bastante amplias sobre sus aplicaciones biotecnológicas (Fortes *et al.*, 2017). Sin embargo, la intención de este proyecto se centra específicamente a la lacasa codificada por el gen *Lac2* de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (Litvintseva y Henson, 2002a) y su aplicación en la biotecnología como alternativa de biorremediación de aguas residuales industriales.

4.1.1 Organismos productores de lacasas

Las lacasas son enzimas casi ubicuas, es decir, se encuentran ampliamente distribuidas en varias plantas, insectos, gran cantidad de hongos, algunas bacterias y más recientemente en algas (Otto *et al.*, 2010). La primera descripción de una lacasa



la hizo Yoshida (1883) cuando la extrajo de los exudados del árbol de laca japonés *Rhus vernicifera*; posteriormente Bertrand (1885) la aisló y purificó (Thurston, 1994).

Las lacasas presentan diversas funciones biológicas dependiendo de la fuente de donde provengan. Las encontramos en diversas especies de plantas como *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al.*, 2017), *Sorghum bicolor* (Wang *et al.*, 2017), *Oryza sativa* (arroz) (Cho *et al.*, 2014), *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Kiefer *et al.*, 1996), *Gossypium arboreum* (algodón) (Wang *et al.*, 2014); participando en la biosíntesis de lignina para la formación de la pared celular. En insectos como *Bemisa tabaci* (mosca blanca) (Yang *et al.*, 2017), *Sitobion avenae* (pulgón de la espiga) (Zhang *et al.*, 2018) y *Acythosiphon pisum* (pulgón del guisante) (Hattori *et al.*, 2010) su función principal está relacionada al proceso de esclerotización en la formación de la cutícula en la epidermis. En bacterias, las lacasas se encuentran involucradas en procesos de morfogénesis, homeostasis del cobre, biosíntesis de pigmentos y en la protección de las esporas contra la luz UV y H₂O₂, como algunos ejemplos encontramos a *Bordetella campestris*, *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Azospirillum lipoferum*, *subincetera*, *Marinomonas*, *Bainomonas*, *Bainomatis* y *Marinomatis* (Mendoza, 2011; Senthivelan *et al.*, 2016; Viswanath *et al.*, 2014).

Las lacasas fúngicas, están implicadas en procesos de deslignificación, esporulación, producción de pigmentos, formación del cuerpo fructífero y patogénesis en plantas. Gracias a su alto potencial redox, han sido de gran interés en diversas aplicaciones industriales que incluyen bioblanqueo, degradación de colorantes textiles y deslignificación de compuestos lignocelulósicos (Upadhyay *et al.*, 2016). Entre los hongos que pertenecen a ascomicetos y basidiomicetos en los que se ha demostrado su actividad encontramos a *Agaricus bisporus* (Wood, 1980), *Botrytis cinerea* (Marbach *et al.*, 1984), *Coprinus cinereus* (Schneider *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2019), *Phlebia radiata* (Niku *et al.*, 1988; Saloheimo y Niku-Paavola, 1991), *Pleurotus ostreatus* (More *et al.*, 2011; Palmieri *et al.*, 1997)) y *Trametes versicolor* (Brown *et al.*, 2002; Jönsson *et al.*, 1997; Rogalski *et al.*, 1990), por mencionar algunos ejemplos; sin embargo hasta el

momento se han aislado y caracterizado más de 100 lacasas a partir de hongos, las cuales pueden consultarse en Viswanath *et al.* (2014). De los hongos Basidiomicetos, *Trametes* sp., se considera el organismo más estudiado en cuanto a la producción de lacasas debido a su gran capacidad para degradar lignina, incluso se han reportado algunas especies capaces de producir lacasa como única enzima ligninolítica; característica de importancia a nivel industrial ya que facilita los procesos de purificación (Jönsson *et al.*, 1997; Rodríguez, 2019)).

4.1.1.1 *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*

En la investigación publicada por Litvinseva y Henson (2002) describen cuatro variedades del género *Gaeumannomyces graminis* en función de sus características morfológicas y rango de hospedante: var. *tritici*, var. *avenae*, var. *maydis* y var. *graminis* (Litvintseva y Henson, 2002b), siendo este último, el más importante para esta investigación. *G. graminis* var. *graminis* es un patógeno perteneciente al orden Ascomycota que afecta las raíces de los cultivos de pastos, arroz y trigo, generando “take-all”, la enfermedad de raíz más severa en todo el mundo que provoca una necrosis en los tejidos infectados (Peixoto *et al.*, 2013). Los datos preliminares sugieren que la patogénesis causada por este hongo se atribuye, entre otros factores, a la expresión de los genes *Lac1* y *Lac2* que codifican para la enzima lacasa que, la cual puede estar involucrada en la biosíntesis de 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN)-melanina y en la degradación de lignina producida por la planta huésped en respuesta a la infección por hongos. Aunque dichos genes fueron caracterizados en dicha investigación, hasta la fecha no se tiene evidencia de su expresión de manera recombinante (Epstein *et al.*, 1994; Litvintseva y Henson, 2002a).

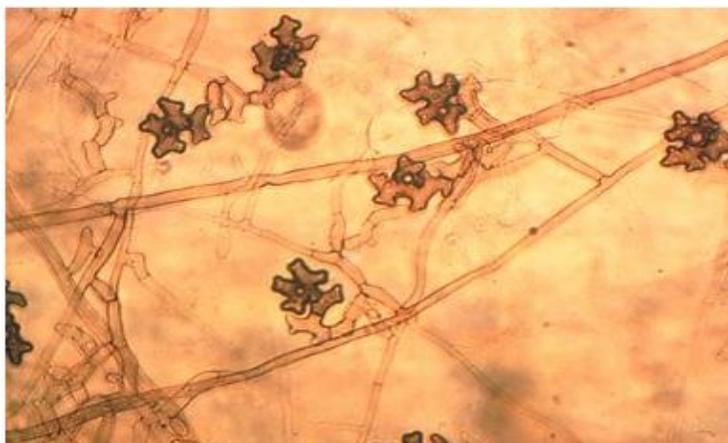


Figura 1. Morfología microscópica de las macrohifas e hifopódios de *Gaeumannomyces graminis* var *graminis* (Peixoto *et al.*, 2013).

4.1.2 Estructura y mecanismo de acción de las lacasas

Las enzimas lacasa poseen regiones glicosiladas (que corresponden del 10 al 45% de su masa total) y cuatro átomos de cobre con distinta absorbancia y propiedades electroparamagnéticas. El alineamiento de secuencias de lacasas de hongos demuestra que los dominios de unión a cobre presentes en el sitio activo son altamente conservados, aunque el resto de los aminoácidos tenga poca similitud (Ausec *et al.*, 2011).

Las lacasas se componen de tres motivos tipo cupredoxina, y poseen dos centros de cobre. Cerca de la superficie de la proteína hay un centro monocúprico llamado sitio T1, el cual está coordinado por dos histidinas y una cisteína (Cavallazzi *et al.*, 2004). El cobre tipo I es el que confiere a la enzima el color azul típico y es ahí donde ocurre la oxidación monoelectrónica del sustrato y por lo tanto es el primer aceptor de electrones. Internalizado en la proteína existe un clúster trinuclear, llamado sitio T2-T3, el cual posee dos cobres T3 coordinados por tres histidinas cada uno y un centro T2 coordinado por dos residuos de histidina, a los cuales son transferidos los electrones y donde tiene lugar la oxidación del O₂ (Figura 2) (Baldrian, 2006; Bento *et al.*, 2005)

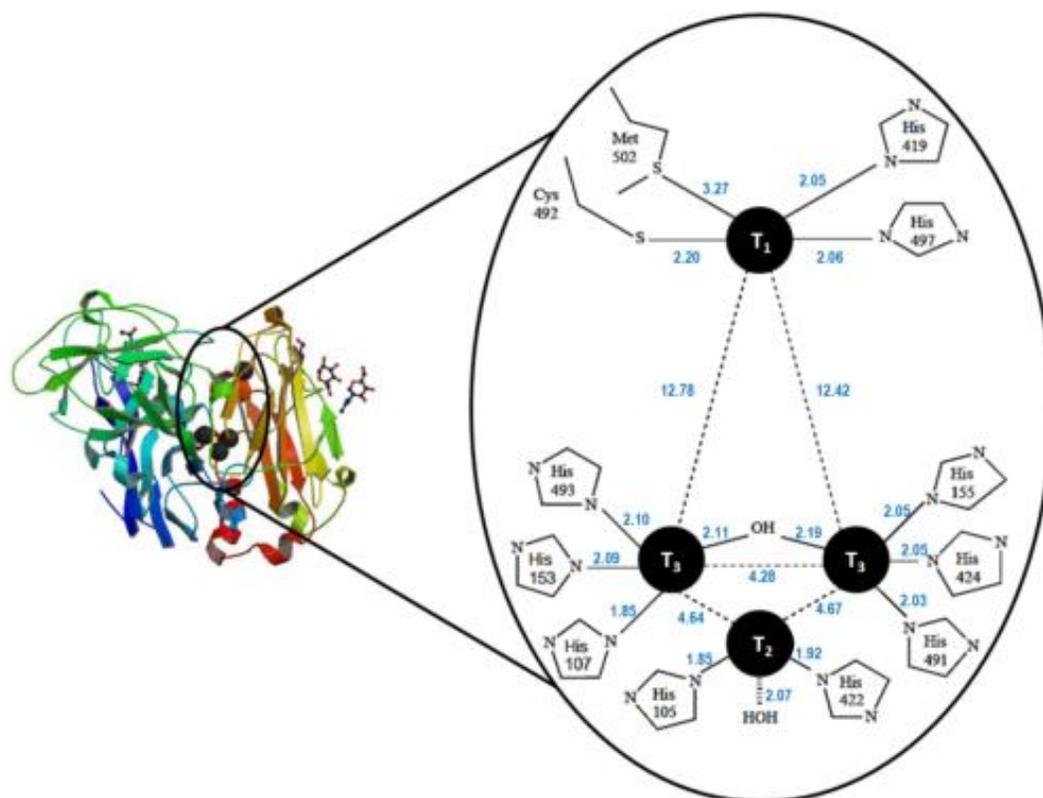


Figura 2. Representación del sitio activo de la lacasa CotA de *Bacillus subtilis* con los tres tipos de cobre y la distancia en angstroms entre los átomos relevantes (Morozova *et al.*, 2007).

La oxidación de los sustratos va acoplada a la reducción del oxígeno molecular a dos moléculas de agua. Esto significa que por cada molécula de oxígeno reducida, se oxidan moléculas de sustrato sin producir peróxido de hidrógeno ($4\text{H}^+ + 4\text{sustrato} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{sustrato}^+$). Por esta razón, las lacasas se consideran catalizadores “verdes ideales” ya que emplean O_2 como co-sustrato generando únicamente H_2O como subproducto (Figura 2) (Shraddha *et al.*, 2011).

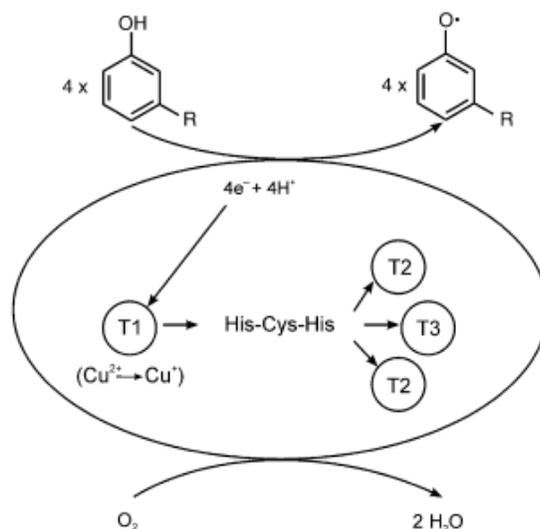


Figura 3. Ciclo catalítico de las lacasas. Los sustratos son oxidados por el centro de Cu-TI y los electrones transferidos a través del motivo tripeptido altamente conservado His-Cys-His hacia el sitio donde se encuentran los centros de cobre TII y TIII, y en este lugar se realiza la reducción del oxígeno molecular a agua (Baldrian, 2006).

En términos generales, la oxidación del sustrato por la lacasa es una reacción de un electrón que genera un radical libre. El producto inicial es típicamente inestable y puede sufrir una segunda oxidación por catálisis enzimática o por una reacción no enzimática: hidratación, polimerización y dismutación (Fortes *et al.*, 2017).

Kumar, *et al.* (2003) compararon la secuencia de más de 100 lacasas, encontrando cuatro regiones conservadas, específicas para lacasas. Una cisteína y diez residuos de histidina forman el ambiente de ligandos a iones de cobre del sitio activo y están presentes en estas cuatro secuencias conservadas (Figura 3) (Kumar *et al.*, 2003).

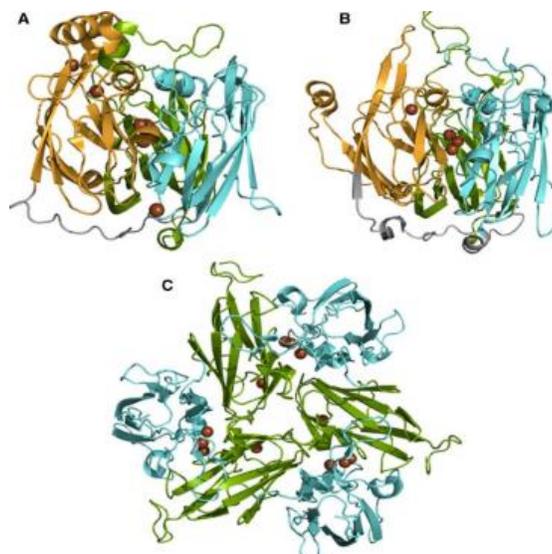


Figura 4. Estructura cristalográfica de enzimas lacasa de distintas fuentes. A) CueO de *E. coli* B) CotA de *B. subtilis* y C) SLAC de *S. coelicolor*. Los dominios de cada subunidad están representados en distintos colores. Las esferas que se ven en la estructura representan los átomos de cobre (Martins et al., 2002).

4.1.3 Sistema lacasa mediador (LMS)

Debido a que las reacciones catalizadas por la lacasa dependen de la diferencia de potencial redox entre la enzima y el sustrato, algunos compuestos no son oxidables por la enzima lacasa. Sin embargo, las regiones promotoras de los genes que codifican la lacasa contienen varios sitios de reconocimiento que son específicos para varios compuestos conocidos como mediadores (Alshabib y Onaizi, 2019). Los mediadores son un grupo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que pueden ser oxidados por la lacasa generando radicales catiónicos altamente activos que oxidan al sustrato, incluidos compuestos no fenólicos que la lacasa por sí sola no puede oxidar (Kudanga *et al.*, 2011)(Figura 4).

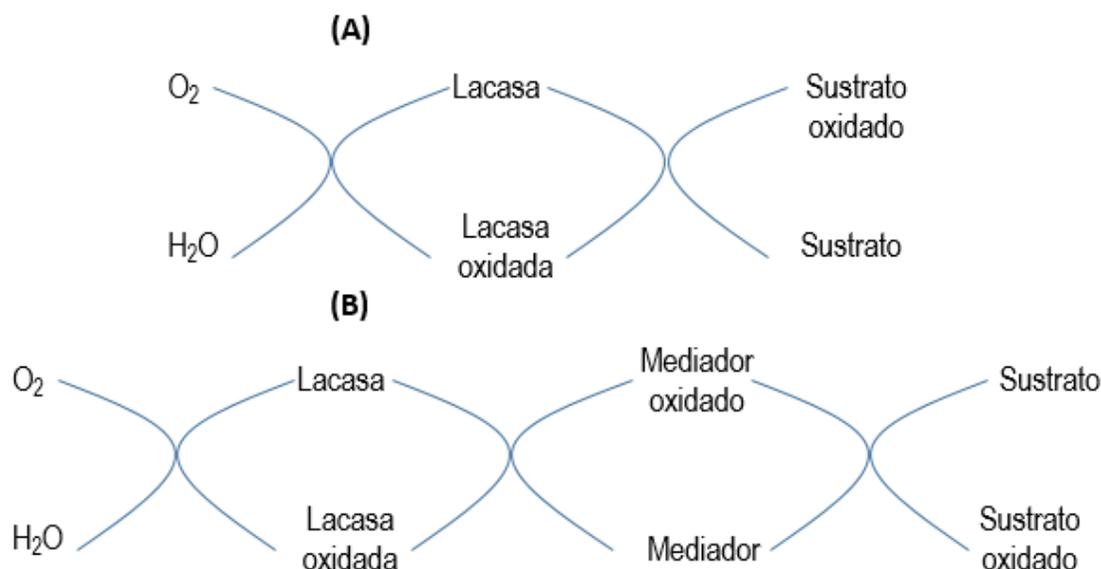


Figura 5. Representación esquemática del LMS. La reacción involucra la oxidación del sustrato que puede ser de dos formas: (A) existe una interacción directa entre el sustrato y el centro monocúprico T1 con la transferencia de los electrones a una molécula de oxígeno; (B) cuando existe una limitación, la adición de mediadores, que actúan como sustratos intermediarios por la lacasa formando radicales catiónicos altamente activos que oxidan al sustrato (Weng *et al.*, 2012).

Los mediadores sintéticos más comunes son 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), N-hidroxitftalimida (NHPI) y 2,2'-azinobis 3-etiltiazolina-6-sulfonat (ABTS). Un buen mediador debe ser un sustrato de lacasa, producir una forma oxidada estable y tener un alto poder de oxidación (Domínguez *et al.*, 2005; Moldes y Sanromán, 2006).

Las propiedades tóxicas de los mediadores más comunes provocan la búsqueda de otros ambientalmente seguros y no tóxicos. Se trata de una búsqueda inacabada, ya que aún no existe evidencia de un mediador adecuado para las distintas aplicaciones de los LMS (Ebbs, 2004). El uso de compuestos mediadores permite una expansión de la reactividad de lacasa para incluir tales sustratos de lacasa no naturales generando especies de alto potencial redox. Así, el uso de sistemas mediadores de lacasa (LMS) ha sido propuesto por diferentes autores como un método prometedor para blanquear la pulpa (Sigoillot *et al.*, 2005) y degradar compuestos xenobióticos (Nagai *et al.*, 2002; Tominaga *et al.*, 2004; Weng *et al.*, 2012)

Una de las posibles aplicaciones de los LMS es la biotransformación de tintes recalcitantes. Las aguas residuales de las fábricas textiles contienen grandes cantidades de estos tintes y, en la actualidad, no existe un tratamiento eficaz para este efluente. Además, la decoloración de los tintes es un indicador útil de la capacidad potencial de degradar otros contaminantes, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Monssef *et al.*, 2016) y los policlorobifenilos. Moldes y Sanromán (2006) encontraron que las isoenzimas lacasas codificadas por los genes *LacI* y *LacII* de *Trametes versicolor*, con la adición de los mediadores 1-hidroxibenzotriazol (HBT), promazina (PZ), ácido para-hidroxibenzoico (pHBA) y ácido 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfónico (NNDS), lograban una mayor decoloración de un tinte en presencia del mediador que sin él.

La degradación de antibióticos, es otra de las aplicaciones que pueden tener los LMS. El uso descontrolado e imprudente de antibióticos no solo ha convertido los desechos hospitalarios en un peligro potencial para el medio ambiente, sino que también ha aumentado el riesgo de aparición de farmacorresistencia en microorganismos a un ritmo alarmante (Weng *et al.*, 2012). La solución más común es la incineración de los residuos, sin embargo, se producen emisiones tóxicas y cenizas peligrosas. Navada y Kulal (2019) reportaron la eliminación de altas concentraciones de cloranfenicol por la enzima lacasa de *Trametes hirsuta* en presencia de siringaldehído, vanilina, ABTS y α -Naftol.

4.1.4 Aplicaciones de las lacasas

La oxidación enzimática se presenta como una alternativa potencial frente a los métodos químicos en muchos procesos industriales, los cuales se mencionan a continuación, ya que las enzimas son catalizadores muy específicos, eficientes y ecológicamente sostenibles (Viswanath *et al.*, 2014). En la última década la búsqueda de nuevas enzimas con aplicaciones biotecnológicas se tornó apremiante y las enzimas lacasas han despertado gran interés en los investigadores gracias a su capacidad de oxidar una amplia gama de compuestos fenólicos y no fenólicos y del

hecho de que utilizan el oxígeno molecular como aceptor final de electrones, entre otras características que se han venido mencionando con anterioridad en esta revisión (Imran, 2012; Kudanga *et al.*, 2011).

En el área de la salud, las lacasas son utilizadas para diagnósticos médicos y en la preparación de medicamentos contra el cáncer como son: el ácido 4-metil-3-hidroxiantranílico que bloquea la transcripción de ADN en las células tumorales y la Vinblastina utilizada en el tratamiento de la leucemia (Kelbert *et al.*, 2020). Además, tienen capacidades tanto ligninolíticas como polimerizantes por lo cual son aplicables durante toda la cadena de producción de productos de papel, desde la pulpa hasta la recuperación de fibras secundarias y blanqueamiento (Viswanath *et al.*, 2014). Lo anterior se demuestra en la investigación realizada por Bourbonais *et al.*, (1998) en la cual se determinó que la deslignificación de la pasta del papel llevada a cabo por la lacasa de *Trametes versicolor* en presencia de mediadores presentaba una mejor alternativa frente a las técnicas tradicionales basadas en el uso de reactivos tóxicos clorados.

Adicionalmente, en la industria alimentaria las lacasas son utilizadas para mejorar la calidad de las bebidas y la estabilización de ciertos productos perecederos que contienen aceites vegetales, pero su principal aplicación es la estabilización del vino. Sin embargo, dado que aún no está permitida como aditivo alimentario, su utilización en forma inmovilizada supone una ayuda tecnológica para superar las barreras legales (Minussi *et al.*, 2002). Por otro lado, recientemente, el uso de tratamientos enzimáticos para la degradación de colorantes sintéticos en aguas contaminadas de la industria textil, alimentaria, cosmética, del cuero y del papel se presenta como una estrategia alternativa al uso de los tratamientos convencionales que presentan serias limitaciones (Guan *et al.*, 2014). En este contexto, el uso de enzimas lacasas parece una solución atractiva debido a su potencial de degradación de colorantes, como se demostró en la investigación realizada por Glenn *et al.* (1983) en donde se mostró la capacidad de decoloración de la enzima lacasa proveniente de *Phanerochaete chrysosporium*.



Otra de las áreas de aplicación de gran interés es la biorremediación mediante el uso de enzimas lacasas ya que la contaminación del suelo, el agua y el aire por tóxicos químicos es uno de los principales problemas ambientales que enfrenta el mundo (Garzón *et al.*, 2017). En el sector agrícola, estas enzimas se emplean en la biorremediación de suelos contaminados con herbicidas, pesticidas y algunos explosivos, ya que presenta la enorme capacidad de eliminar sustancias xenobióticas y producir productos poliméricos. También, al contar con un alto potencial redox las lacasas pueden ser utilizadas para biorremediación de efluentes de aguas contaminadas, especialmente las que provienen de la industria papelera, de la pulpa, textil y petroquímica (Imran, 2012; Upadhyay *et al.*, 2016).

4.1.4.1 Biorremediación

El desarrollo sostenible, se establece como un compromiso de la humanidad que surgió a partir de la polémica por el impacto de las actividades humanas en el medio ambiente y la preocupación de continuar con los procesos de crecimiento económico, previniendo y mitigando al máximo los impactos ambientales sobre los ecosistemas para conservar sus funciones y de esta manera, garantizar a las futuras generaciones la satisfacción de sus necesidades implementando medidas preventivas y nuevas tecnologías que contribuyan a reducir y corregir el recurso impactado (Navada y Kulal, 2019; Shraddha *et al.*, 2011).

Bajo esta premisa, la biotecnología constituye un conjunto de tecnologías con potencial para contribuir al desarrollo sostenible, dando solución a los problemas de contaminación, ya que se desenvuelve en distintos campos, tales como: industria de los alimentos, industria química, agricultura y silvicultura, sector salud y protección del medio ambiente (Alshabib y Onaizi, 2019). En esta última, tiene protagonismo, la biorremediación, la cual es una técnica innovadora que se ha desarrollado en los años ochenta que hace referencia a la aplicación de microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para degradar en forma natural compuestos contaminantes, permitiendo de esta manera, reducir o remover los residuos



potencialmente peligrosos presentes en el ambiente (Navada y Kulal, 2019). Dado que su ámbito de aplicabilidad es muy amplio, se utiliza como objeto de remediación para cada uno de los estados de la materia, es decir; sólidos, en suelos o sedimentos, lodos o residuos; líquidos, en aguas superficiales, subterráneas y residuales; así como gases, derivados de las emisiones industriales (Shraddha *et al.*, 2011).

El tratamiento de las aguas residuales por el método de lodos activados constituye uno de los usos más importantes de la biotecnología en la biorremediación para el control de la contaminación de los ambientes acuáticos (Ebbs, 2004). Además, los microorganismos y enzimas han sido el foco principal de los esfuerzos para mejorar la capacidad de biorremediación, se han utilizado con éxito en aplicaciones diversas como el tratamiento eficaz y controlado de nitrato y fosfato, así como la eliminación de colorantes textiles en las aguas residuales. Asimismo, el uso de las plantas superiores en fitorremediación es un área importante de desarrollo (Filazzola, 1999).

Los procesos de biorremediación se han establecido tanto para el tratamiento de aguas subterráneas contaminadas *in situ* como *ex situ*. Se ha demostrado en las diferentes experiencias que cuando se adapta correctamente a las condiciones del medio a intervenir, la biorremediación puede ofrecer disminución significativa de costes y beneficios ambientales en comparación con tecnologías alternativas (Garzón *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de que la biorremediación es a menudo considerada como un tratamiento efectivo económico y amigable del ambiente, enfrenta un nuevo reto: convencer a las compañías y a los organismos oficiales de su alto potencial, por cuanto se ha venido convirtiendo en una verdadera industria para sanear el ambiente de las afectaciones generadas por las actividades humanas (Gochev y Krastanov, 2007; Imran, 2012).

Por otro lado, teniendo en cuenta que los procesos biológicos en algunas ocasiones son más lentos, la biorremediación no es la primera opción en aquellos sitios donde por razones económicas, políticas o ambientales, es necesaria una rápida limpieza del lugar contaminado, además si se aplica sin conocer los procesos microbianos involucrados, las vías metabólicas y químicas participantes podrían conducir a una situación peor a la ya existente debido que para algunos productos

químicos, la degradación microbiana puede conducir a la producción de sustancias tóxicas o más volátiles que el compuesto de origen (Kudanga *et al.*, 2011; Mendoza, 2011).

4.1.4.2 Degradación de verde de malaquita (MG)

El verde malaquita (MG), es un trifenilmetano producido en millones de kilogramos por la industria de colorantes (Srivastava *et al.*, 2004), es utilizado por la industria textil para teñir las fibras que contienen proteínas, como lana, angora, cachemira y seda. Además, es ampliamente utilizado en la acuicultura, en la industria alimentaria y como desinfectante médico, debido a su habilidad antimicrobiana y antiprotozoaria (Shanmugam *et al.*, 2017). El gran problema al que se enfrentan estas industrias es que alrededor del 2 al 50% de estos compuestos es desechados en las aguas residuales y se considera un contaminante persistente, es decir, debido a su origen sintético y sus estructuras complejas, no puede ser removido por los métodos convencionales (Cortazar *et al.*, 2012) de tratamiento de aguas y como sustancia química recalcitrante con efectos teratogénicos, cancerígenos y mutagénicos, la gran cantidad de MG descargada amenaza de forma persistente el medio ambiente y la salud pública (Guo *et al.*, 2017). En este contexto, existen microorganismos que pueden degradar gran variedad de colorantes dentro de los cuales encontramos a los hongos de la putrefacción blanca, debido a que son capaces de degradar sustratos complejos a través de un sistema enzimático basado en la producción de lacasas y peroxidasas. Sin embargo, aunque la decoloración mediada por hongos se considera económica, a concentraciones mayores a 25 mg L⁻¹ el MG inhibe el crecimiento celular, lo que restringe la biosíntesis de las enzimas necesarias para la degradación (Domínguez *et al.*, 2005). Alternativamente, la degradación de MG mediada por enzimas como citocromo P450, lignin peroxidasas como manganeso peroxidasas conduce a la generación de leucoderivados cancerígenos. No obstante, la biodegradación de MG llevada a cabo por lacasas, ya sea en presencia o no de un mediador redox, implica un proceso de degradación diferente, sin la producción de

estos metabolitos, por lo cual son consideradas excelentes candidatas para biorremediación de efluentes contaminados con este colorante (Li *et al.*, 2019; Moldes y Sanromán, 2006).

Dentro de las investigaciones de lacasas aplicadas a la degradación de colorantes encontramos el trabajo realizado por Liu *et al.* (2019) en donde el gen *Stlac2* que codifica para una isoforma de lacasa en *Setosphaeria turcica* expresado en *E. coli* fue capaz de decolorar 67.08% de verde malaquita en concentración de 20 mg L⁻¹ en 15 min sin adición de mediadores redox; al contrario de la lacasa codificada por el gen *CotA* de *Bacillus subtilis* expresada en *E. coli*, reportado por Xu *et al.* (2020) que logró la decoloración de más del 70% de MG en una concentración de 0.025 mg/mL en presencia de ABTS 0.3 mM como mediador de la reacción. En contraste, en el trabajo reportado por Yang *et al.*, (2017) Lac7 de *Cerreña* sp. HYB07 inmovilizada mediante agregados de enzimas reticulados (cross-linked enzyme aggregates CLEAs) consiguió decolorar aproximadamente el 90% de MG a concentración de 100 mg L⁻¹ después de 3 h sin adición de mediador.

4.1.5 Producción heteróloga de lacasas

La obtención de lacasas a partir de fuentes nativas no alcanza a cubrir las necesidades en los procesos a nivel industrial, además, los costos en los procedimientos de cultivo y purificación son muy altos. Por esta razón, en este subtema se habla sobre la expresión heteróloga de lacasas la cual se muestra como una alternativa prometedora, en donde la utilización de organismos huésped fáciles de cultivar y manipular genéticamente aumenta la productividad y disminuye el tiempo y el costo de producción (Brijwani *et al.*, 2010; Soden *et al.*, 2002).

Existen gran variedad de organismos huésped (Tabla I), no obstante, esta investigación se centró en la utilización de *E. coli* y *P. pastoris* como sistemas de producción de proteínas recombinantes (Kunamneni *et al.*, 2008). *Escherichia coli* es ampliamente usada como un organismo huésped para la expresión de proteínas

heterólogas; esto se debe a que es un sistema más económico y escalable, está genéticamente caracterizado y tiene altos niveles de producción, pero la expresión de proteínas recombinantes de alto nivel a menudo conduce a un mal plegamiento de proteínas en cuerpos de inclusión que carecen de actividad biológica (Ma *et al.*, 2018).

Tabla 1. Expresión heteróloga de lacasas en diferentes organismos huésped.

Lacasa	Organismo fuente	Organismo hospedero	Reporte
LCC1 PrL	<i>Trametes versicolor</i> <i>Phlebia radiata</i>	<i>Pichia pastoris</i> <i>Trichoderma reesei</i>	(Jönsson <i>et al.</i> , 1997) (Saloheimo y Niku-Paavola, 1991)
LCC1, LCC4	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	(Wahleithner <i>et al.</i> , 1996)
LCC1 LAC 1	<i>Trametes villosa</i> <i>Melanocarpus albomyces</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Trichoderma reesei</i>	(Yaver <i>et al.</i> , 1996) (Kiiskinen <i>et al.</i> , 2004)
LacA	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Escherichia coli</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
STSL CjSL	<i>Streptomyces lewendulae</i> <i>Catenuloplanes japonicus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia coli</i>	(Suzuki <i>et al.</i> , 2003) (Trubitsina <i>et al.</i> , 2021)
CotA SLAC	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptomyces coelicolor</i> <i>Streptomyces cyaneus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Pichia pastoris</i> <i>Escherichia coli</i>	(Martins <i>et al.</i> , 2002) (Yadav <i>et al.</i> , 2018) (Ece <i>et al.</i> , 2017)
OsLAC10 BC_lacL	<i>Oryza sativa</i> <i>Burkholderia cepacia</i> BNS	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Escherichia coli</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2017) (Ma <i>et al.</i> , 2019)
LcCg PpuLcc Lcc9	<i>Coriolopsis gallica</i> <i>Pleorotus pulmonarius</i> <i>Laccaria bicolor</i>	<i>Pichia pastoris</i> <i>Pichia pastoris</i> <i>Pichia pastoris</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>	(Avelar <i>et al.</i> , 2017) (Behrens <i>et al.</i> , 2017) (Wang <i>et al.</i> , 2018)
yacK Gr2	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Helicoverpa armigera</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Ahlawat <i>et al.</i> , 2020) (Kwiatos <i>et al.</i> , 2020)
FpLcc1 y FpLcc2	<i>Fomitopsis pinicola</i> <i>Pandora sp.</i>	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Escherichia coli</i>	(Csarman <i>et al.</i> , 2021) (Kumar <i>et al.</i> , 2003)
rLac Lac1	<i>Bacillus valeszensis</i> <i>Pycnoporus cinnabarius</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Pichia pastoris</i> y <i>Aspergillus niger</i>	(Li <i>et al.</i> , 2020) (Otterbein <i>et al.</i> , 2000; Record <i>et al.</i> , 2002)
NM	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Pichia pastoris</i>	(Lu <i>et al.</i> , 2013)



Por otro lado, *Pichia pastoris* es una levadura empleada igualmente en la expresión de proteínas heterólogas; se caracteriza por poseer una velocidad de crecimiento relativamente rápida en medios de cultivo baratos, además, su principal ventaja es que lleva a cabo el plegamiento correcto de las proteínas y la generación de modificaciones postraduccionales como la glicosilación que es requerida en las lacasas extracelulares (Cregg *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2016).

Entre las investigaciones realizadas sobre la expresión heteróloga de lacasas en sistemas bacterianos, encontramos el primer reporte realizado por Garg *et al.* (2008) en donde se analizó la expresión de una lacasa proveniente de *Cyathus bulleri* en *E. coli* y se encontró que el pH óptimo para alcanzar la mayor actividad de enzima purificada fue de 4.0, medido por la oxidación de 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6sulfonato) (ABTS) 0.2 mM con buffer de citrato 0.1; sin embargo, no se analizó la temperatura óptima para la enzima ni su estabilidad, que son parámetros importantes. Además, uno de los resultados más relevantes que se obtuvieron fue el replegamiento de la proteína en 10 min realizado con la adición de cobre en condiciones alcalinas y con una recuperación de la actividad enzimática a un 100%.

Por otro lado, Ma *et al.* (2017) analizaron la expresión de la proteína lacasa recombinante codificada por el gen *StLAC4* proveniente de *Setosphaeria turcica* en *E. coli* BL21(DE3) y se estableció que el pH y la temperatura en la que la enzima purificada alcanza su mayor actividad es 4.0 y 60 °C, respectivamente, medidos por la oxidación de 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6sulfonato) (ABTS) 0.2 mM con buffer de citrato 0.1 M. De igual manera el análisis de la actividad de la lacasa sobre diferentes iones metálicos reveló que la actividad aumentó aproximadamente 434.8% con Fe³⁺, y 217.4% con Cu²⁺ a concentraciones de 10 mM/L, el Mn²⁺ aumentó la actividad a 5 y 10 mM/L, mientras que Na⁺ aumentó la actividad a 1 mM/L, pero inhibió la actividad a 5 y 10 mM/L.

Sobre la expresión heteróloga de lacasas en levaduras, encontramos la realizada por You *et al.* (2013) en donde analizaron la expresión de la proteína lacasa recombinante proveniente de *Ganoderma lucidum* TR6 en *Pichia pastoris* GS115 y se reveló que para que la enzima purificada alcance su mayor actividad es necesario un

pH de 3.5 y una temperatura en un rango de 60-90 °C, medidos por la oxidación de 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) a 0.05 mM con buffer de citrato 0.2M, además, el análisis de la actividad lacasa sobre diferentes iones metálicos mostró que Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} no tienen efecto sobre la lacasa purificada, mientras que Hg^{2+} y Mn^{2+} disminuyen moderadamente la actividad enzimática.

En investigaciones más recientes, se encuentra la realizada por Bronikowski *et al.* (2017) en donde se analizó la expresión de la proteína lacasa codificada por el gen *Mrl2* proveniente de *Moniliophthora roreri* en *Pichia pastoris* y se observó que el pH y temperaturas óptimas para que la enzima purificada pueda alcanzar su mayor nivel de actividad, medido por oxidación de 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) 0.5 M, con buffer de citrato 100 mM fueron de 2 y 30°C, respectivamente. En la medición de la actividad enzimática sobre diferentes iones metálicos, se observó que incluso a una concentración de 100 mM, Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Na^{2+} , Zn^{2+} y K^{+} no se encontró un efecto sobre la actividad, mientras que, a una concentración de 10 mM, solo Ni^{2+} y Ca^{2+} condujeron a una ligera inhibición de *Mrl2* del 15-18%. A una concentración de iones metálicos de 100 mM, los iones Ni^{2+} y Ca^{2+} condujeron a la inhibición más alta de *Mrl2*.

En este contexto, conociendo que las lacasas fúngicas funcionan como agentes catalíticos ecológicos y como ya se mencionó, tiene diversas aplicaciones muy importantes dentro de las áreas de la biotecnología, diversificar la búsqueda de fuentes de enzimas lacasa con eficiente actividad se torna apremiante (Upadhyay *et al.*, 2016).

4.2 *Escherichia coli* como sistema de expresión

La tecnología de producción de proteínas recombinantes en bacterias ha presentado una solución frente a la necesidad de proveer proteínas de uso terapéutico con un abasto asegurado y calidad constante (Hayat *et al.*, 2018). *Escherichia coli* es una bacteria que se ha mantenido como una de las mejores opciones para la producción de proteínas recombinantes, a pesar de que muchas de ellas requieren

modificaciones postraduccionales que no pueden ser llevadas a cabo por cepas bacterianas silvestres, ya que presenta una serie de ventajas importantes: puede crecer rápido en medios de cultivo muy simples (la división celular toma 20 minutos), existe una gran cantidad de conocimiento acumulado sobre su fisiología y metabolismo y representa la técnica más fácil y barata para la expresión de dichas proteínas (Lara, 2011; Ma *et al.*, 2019). Actualmente cerca del 30% de las proteínas recombinantes de uso terapéutico son producidas empleando esta bacteria (Hayat *et al.*, 2018), las más destacadas pueden consultarse en la Tabla 2.

El uso de *E. coli* para la producción de proteínas recombinantes se ha enfrentado a varios problemas prácticos. Por ejemplo, *E. coli* no es adecuada para la producción de muchas proteínas grandes y complejas que contienen enlaces disulfuro o proteínas que requieren modificaciones postraduccionales (Xu *et al.*, 2020). Por otro lado, la estabilidad de las proteínas recombinantes puede ser baja debido a la degradación proteolítica, además de acumularse en cuerpos de inclusión que requieren procesos de desnaturalización y replegamiento para hacerlas funcionales (Middelberg *et al.*, 1991). En adición a esto, se han publicado estrategias de recuperación alternativas entre las que se encuentra: la clonación del gen de interés en una secuencia señal secretora endógena que resulta en la secreción de la proteína recombinante al espacio periplásmico y permeabilización química de la membrana utilizando sustancias químicas como antibióticos, agentes quelantes, agentes caotrópicos, detergentes, disolventes y enzimas (Falconer *et al.*, 1998; Hayat *et al.*, 2018).

Tabla 2. Principales proteínas de uso terapéutico producidas por *E. coli* (adaptado de Lara, 2011)

Molécula	Observaciones	Compañías productoras
Activador del tejido del plasminógeno	Forma cuerpos de inclusión	Roche
Insulina humana y análogos	Forma cuerpos de inclusión	Eli Lilly, Aventis, Probiomed
Hormona de crecimiento humano	Forma cuerpos de inclusión o es acumulada en periplasma	Genentech, Eli Lilly, Pfizer, Novo Nordisk, Probiomed y otros
Análogo pegilado de hormona de crecimiento humana	Forma cuerpos de inclusión	Eli Lilly
Calcitonina de salmón	Secretada	Unigene
Factor estimulante de la colonia de granulocitos, pegilado	Forma cuerpos de inclusión, pegilación N-terminal	Amgen
Interferón α-2b pegilado, interferón α-2b	Pegilación aleatoria	Hoffmann-La Roche, Schering
Interferón alfacon-1	Forma cuerpos de inclusión	Valeant
Interferón β-1b	Forma cuerpos de inclusión	Schering AG, Chiron
Interferón γ-1b	Forma cuerpos de inclusión	Genentech, Intermune
Antagonista del receptor de interleucina-1		Amgen
Interleucina-2		Chiron
Toxina de fusión de la difteria		Seragen/Ligand
Interleucina-11		Genetics Institute
Lipoproteína r OSpA	Lipoproteína	SmithKline Beechman
Péptido natriurético tipo B	Forma cuerpos de inclusión	Scios/ Johnson & Johnson
Factor de necrosis TNFα		Boehringer Ingelheim
Toxina pertussis	Componente de vacuna combinada	Chiron

4.2.1 Acumulación de proteínas en cuerpos de inclusión

Las proteínas recombinantes en *E. coli* pueden dirigirse a tres compartimentos en los que está dividida la célula: el citoplasma, el periplasma y el espacio extracelular. Si el destino objetivo es el citoplasma, la producción de las proteínas de alto nivel a menudo conduce a la formación de agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión (Ece *et al.*, 2017; Garg *et al.*, 2008).

Las estrategias para la extracción de proteínas recombinantes de los cuerpos de inclusión incluyen la rotura celular, la separación de los cuerpos de inclusión insolubles de la fracción soluble, el lavado y la solubilización de los cuerpos de inclusión y, finalmente, el replegamiento y la purificación de la proteína (Falconer *et al.*, 1998). La purificación de proteínas recombinantes solubles del conjunto de proteínas citoplasmáticas es una tarea relativamente difícil ya que este compartimento contiene la gran mayoría de las proteínas celulares totales. Bajo esta premisa, la recuperación de proteínas biológicamente activas a partir de cuerpos de inclusión presenta diversas ventajas: los cuerpos de inclusión constituyen generalmente más del 25% de las proteínas totales; estos pueden aislarse inicialmente en un estado altamente purificado y concentrado mediante centrifugación, lo que facilita el proceso de eliminación del resto de las proteínas; por último, los cuerpos de inclusión son resistentes a la proteólisis, lo que permite una producción de proteínas de alto rendimiento (Hayat *et al.*, 2018; Imran, 2012).

En un estudio sobre la producción de varias proteínas recombinantes en *E. coli*, no se observó relación entre la formación de cuerpos de inclusión y el origen o hidrofobicidad de la proteína. Por lo tanto, no es posible generalizar o predecir que proteínas se producirán o no dentro de cuerpos de inclusión (Lara, 2011; Ma *et al.*, 2018).

4.3 *Pichia Pastoris* como sistema de expresión

Como sistema de expresión microbiano eucariota, las levaduras son hospederos adecuados para la producción de proteínas recombinantes cuya expresión en un sistema bacteriano conduce a la síntesis de agregados proteicos inactivos o plegados incorrectamente o en cuerpos de inclusión. Éstas, combinan la facilidad de manipulación genética, rápido crecimiento en medios de cultivo relativamente económicos y la habilidad de realizar modificaciones postraduccionales (Cregg *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007).

Pichia Pastoris, posee un promotor fuerte y regulado correspondiente al gen del alcohol oxidasa 1 (PAOX1), ya que su metabolismo preferentemente respiratorio le permite alcanzar elevadas densidades celulares en biorreactores sin que los productos del metabolismo como el etanol inhiban su crecimiento, hace que actualmente sea la levadura más empleada en la expresión de proteínas heterólogas. Además, esta levadura secreta pequeñas cantidades de proteínas endógenas al medio de cultivo; por consiguiente, las proteínas heterólogas secretadas al mismo se encuentran parcialmente puras, lo que facilita su futura purificación (Bronikowski *et al.*, 2017; Jönsson *et al.*, 1997).

Todas las cepas de *P. pastoris* utilizadas para la expresión de proteínas heterólogas provienen de la cepa silvestre *P. pastoris* NRRL-Y 11430 y la mayoría cuenta con fenotipos adquiridos por mutación o delección de genes. Se clasifican de acuerdo a su capacidad de metabolizar el metanol (Mut) como: Mut⁺ que al portar los genes AOX1 y AOX2 funcionales, presenta un crecimiento igual al de la cepa silvestre; Mut^S, que sólo porta el gen AOX2 funcional, motivo por el cual su crecimiento en presencia de metanol es lento; por último, la cepa Mut⁻ posee los genes AOX1 y AOX2 inactivos, por lo que no puede utilizar metanol como fuente de carbono y energía (Cregg *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2016).

4.3.1 Excreción de proteínas al medio de cultivo

Una de las dificultades a las que normalmente nos enfrentamos en la expresión homologa de proteínas, es la recuperación de la proteína. *Pichia pastoris* presenta la ventaja de poder recuperar el producto del medio extracelular mediante secuencias de péptido señal que traslocan las proteínas al retículo endoplásmico (Thak *et al.*, 2020). La pre-proseuencia α MF (alpha-mating factor) de *Saccharomyces cerevisiae* es la señal secretora más utilizada en *P. pastoris*. Esta secuencia consta de una secuencia señal de 19 aminoácidos (pre-secuencia) seguida de una pro-secuencia de 66 aminoácidos, que contiene tres sitios potenciales de glicosilación ligados al extremo N-terminal y un sitio de procesamiento de endo-peptidasa Kex2 (He *et al.*, 2012). El procesamiento del péptido señal consiste en los siguientes tres pasos: primero, la eliminación de la pre-secuencia mediante peptidasas en el RE; seguido de la eliminación de la pro-secuencia mediada por Kex2 entre la arginina C-terminal y la lisina; por último, la proteína Ste13 (dipeptidil aminopeptidasa) escinde las repeticiones de GLU-ALA (Chahal *et al.*, 2017).

4.3.2 Glicosilación de proteínas

P. pastoris es capaz de realizar la adición de oligosacáridos, en su caso únicamente residuos de manosa, a los grupos hidroxilo de los residuos de serina y treonina de las proteínas secretadas, que luego es extendido por la adición de otros residuos α -1,2 manosa y finalmente protegido con una β -o fosfomanosa, a esto se le conoce como O-glicosilación. Por otro lado, también realiza la adición de cadenas de oligosacáridos a asparagina en la secuencia de reconocimiento X-SER/THR, conocida como N-glicosilación (Li *et al.*, 2007). Comienza en el retículo endoplásmico con la transferencia de un oligosacárido por una oligotransferasa a la asparagina en la secuencia de reconocimiento y generar un enlace N-glicosídico; luego la unidad es reducida por la eliminación de tres glucosas y un residuo de manosa; por último, en el aparato de Golgi se adicionan residuos de manosa mediante enlaces α -1,6 y α -1,3 y



son extendidos hasta obtener una forma hipermanosilada, comúnmente con 8 o 9 residuos de manosa (Xu *et al.*, 2019).

Algunas de las funciones que desempeñan estos carbohidratos en las funciones biológicas de las glicoproteínas (clasificación, plegamiento, estabilidad y función) aún no están claras con informes contradictorios que se encuentran con frecuencia en la literatura (Serrano *et al.*, 2016; Vite Vallejo *et al.*, 2009).



V. JUSTIFICACIÓN

Los compuestos fenólicos son contaminantes altamente tóxicos, aun en pequeñas concentraciones, que se encuentran presentes en efluentes de aguas residuales provenientes de ciudades, industrias, hoteles y explotaciones mineras, agrícolas y ganaderas, actualmente existe una amplia variedad de tratamientos que pueden ser utilizados en la eliminación de estos compuestos, sin embargo, la biorremediación puede ofrecer disminución significativa de costos y beneficios ambientales en comparación con tecnologías alternativas. En este contexto, se ha demostrado que las lacasas fúngicas funcionan como agentes catalíticos ecológicos y benignos útiles para biorremediación; por ello, diversificar la búsqueda de fuentes de enzimas lacasa con eficiente actividad se torna apremiante. Por esta razón, en el presente trabajo se analizó la expresión de la lacasa codificada por el gen *Lac2* de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*, de la cual aún no hay evidencia de su expresión de manera recombinante, en dos sistemas: *Eschechia coli* y *Pichia pastoris* mediante herramientas de ingeniería genética. Esto con la finalidad de comprobar si en ambos sistemas se obtiene una proteína funcional.



VI. HIPÓTESIS

Dado que las enzimas lacasa poseen regiones glicosiladas, la levadura *Pichia Pastoris* se presenta como un organismo potencial para la expresión de estas enzimas, debido a su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales. Sin embargo, se ha reportado *Escherichia coli* ofrece una vía, simple, rápida, y eficiente para la producción de proteínas lacasa recombinantes biológicamente activas; por esta razón, el transgén sintético *Lac2* de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* que codifica para la enzima lacasa subclonado en los vectores de expresión pET32a(+)[®] y pPICZαA[®] y expresado en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*, respectivamente, generará una enzima funcional.



VII. OBJETIVOS

Objetivo general:

Expresar el transgén sintético *Lac2* que codifica para la enzima lacasa de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*.

Objetivos específicos:

1. Clonar el transgén *Lac2* que codifica para lacasa en *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* en el vector pPICZ α A[®], para la construcción del plásmido pALH1.
2. Transformar células de *E. coli* BL21(DE3) y *Pichia pastoris* X33 con el plásmido pMBO2 y pALH1, respectivamente.
3. Expresar y extraer la proteína lacasa de *E. coli* y *Pichia pastoris* para su posterior análisis enzimático: determinación de pH y temperatura óptimos, constantes cinéticas y efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática.
4. Determinar la funcionalidad de la enzima Lac2 recombinante frente a la degradación de colorante verde malaquita.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Materiales

8.1.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas *P. pastoris* X33 (Donada por el Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, Cd. Cuauhtémoc, Chih. Mex.) y *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). Se utilizaron los medios YPD (extracto de levadura 10%, dextrosa 20%, peptona 20% pH 6.5) para el cultivo y mantenimiento de levaduras y LB (peptona 10%, NaCl 10% y extracto de levadura 5% pH 7.0) para el cultivo, mantenimiento e inducción de la expresión de proteínas recombinantes en bacterias y el medio BMMY (PBS 100 mmol/L pH 6.0, 1% extracto de levadura, 2% peptona, 1.34% YNB, 400 µg/L biotina y 0.5% metanol) para la inducción de la expresión de proteínas recombinantes en levaduras.

8.1.2 Plásmidos y gen de interés

Para la transformación genética de *E. coli* BL21DE3 se utilizó el plásmido pMBO2 proporcionado por Banda (2019) el cual contiene el transgén *Lac2* que codifica para lacasa proveniente del genoma de *G. graminis* var. *graminis*. Para la síntesis del transgén *Lac2*, se tomó la secuencia del gen *Lac2* de *G. graminis* var. *graminis* (AJ437320.1) de 1,737 pb. La secuencia fue sometida a mutaciones puntuales silenciosas para la eliminación de sitios no deseados y posteriormente fue enviada a la empresa GenScript® para su clonación en el vector pUC19®. Posteriormente se subclonó en pET32a(+)[®] (EMD Biosciences, MI, USA) dando lugar al plásmido pMBO2 (Ver Apéndice I).



Para la construcción del vector utilizado en la transformación genética de *P. pastoris* X33 se empleó el vector de expresión en levaduras pPICZ α A[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA).

8.2 Métodos

8.2.2 Análisis de la secuencia y clonación del transgén *Lac2* en el vector pPICZ α A[®]

Se tomó la secuencia codificante del transgén *Lac2* integrada en la construcción pMBO2. La secuencia fue analizada *in silico* utilizando en programa SnapGene[®] ver 2.4.1 (GSL Biotech) y fue flanqueada por los sitios *Xba*I/*Xba*I. La secuencia *in silico* fue enviada a la empresa GenScript[®] para su clonación en el sitio *Xba*I del vector pPICZ α A[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) y con ello dar lugar al vector pALH1.

8.2.3 Comparación *in silico* de la lacasa codificada por el transgén *Lac2* con otras lacasas

La secuencia de aminoácidos de la lacasa codificada por el transgén *Lac2* fue modelada tridimensionalmente utilizando el software Phyre2 (Kelley y Sternberg, 2009) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). Por otro lado, se obtuvieron tres modelos cristalográficos de la base de datos del RCB PBD (<http://www.rcb.org>) para hacer la comparación *in silico* con *Lac2*; la lacasa de *Trametes versicolor* (PDB ID: 1KYA), *Basidiomycete* PM1 (Cect 2971) (PDB ID: 5ANH) y *Pycnoporus cinnabarius* (PDB ID: 2XYB). El análisis de las moléculas fue realizado por medio de PyMOL ver 2.0 (Pymol, 2010) haciendo una superposición de estructuras. Se utilizó también el software libre Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para llevar a cabo un alineamiento múltiple de secuencias para identificar las secuencias altamente conservadas. El análisis de comparación entre las estructuras 3D de las proteínas se



realizó utilizando el servidor DALI (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/index.html#tabs-2>) (Holm y Laakso, 2016) obteniendo el porcentaje de similitud entre las estructuras secundarias y la Desviación Cuadrática Media (RMSD) del alineamiento de las estructuras.

8.2.4 Modelación de ligando y Docking molecular

Se escogió como modelo de ligando la molécula de ABTS (ácido 2,2' azino-bis-(3 etil bencatiazoline sulfato)) obtenida de la base de datos PubChem del NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (CID: 5360881). La estructura se modeló y se refinó utilizando una minimización con el programa Avogadro (Marcus *et al*, 2012). Con el fin de identificar los aminoácidos que forman el bolsillo catalítico, se utilizó el programa CASTp (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html?3trg>) (Tian *et al.*, 2018).

Se empleó el programa AutoDock 1.5.6 para convertir las estructuras de pdb a formato pdbqt y añadir hidrógenos polares a cada receptor y asignando cargas parciales de Kollman. Se realizaron ocho simulaciones para el ligando ABTS con el modelo tridimensional de la lacasa codificada por el transgén *Lac2* y los modelos 1KYA, 2XYB y 5ANH obtenidos del Protein Data Bank utilizando AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010), estableciendo una dimensión de caja suficiente para cubrir el bolsillo catalítico, con un espaciado de punto de rejilla de 0.375 Å, utilizando semilla aleatoria y una exhaustividad de ocho. Se guardó la mejor pose para cada uno de los ocho docking realizados. Finalmente, el promedio del valor de afinidad en Kcal/mol para la mejor pose fue aceptado como el valor de afinidad de unión para el sustrato.

8.2.5 Preparación de células competentes de *E. coli* (Mandel y Higa, 1970)

Para la preparación de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3), se inocularon 5.0 mL de LB con 50 μ L de células de *E. coli* BL21(DE3) 15 h a 37 °C. Después de ese tiempo, se tomó 1.0 mL del cultivo inicial para inocular 100 mL de LB y se colocó a 37 °C en agitación constante hasta obtener una D.O. 0.35-0.4. Posteriormente, se colocó el medio en tubos falcón de 50 mL previamente fríos (4 °C) y se centrifugó a 4,000 rpm por 14 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 10 mL de $MgCl_2$ 100 mM frío, luego se centrifugó a 300 rpm por 15 min a 4 °C. De nuevo se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 20 mL de $CaCl_2$ 100 mM para después colocar la suspensión en hielo por 20 min, transcurrido el tiempo se centrifugó a 300 rpm por 15 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5.0 mL de $CaCl_2$ 85 mM, 15% glicerol y se centrifugó a 2,100 rpm 15 min a 4 °C. Se decantó nuevamente el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2.0 mL de $CaCl_2$ 85 mM, 15% glicerol (O.D. de células 200-250). Por último, se colocaron 100 μ L de células competentes en microtubos de 1.5 mL congelados a -80 °C.

8.2.6 Transformación genética de *E. coli* para la conservación y propagación de plásmidos (Mandel y Higa, 1970)

El ADN del plásmido pALH1 enviado por la empresa GenScript® fue resuspendido en agua destilada estéril para obtener una concentración de 200 ng/ μ L. Este ADN, así como el ADN del plásmido pMBO2, fueron utilizados para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) mediante choque térmico.

Se tomaron 3 microtubos de 1.5 mL con 100 μ L de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) almacenadas a -80 °C y se colocaron directamente en hielo durante 5 min para descongelarlas, luego se añadieron 3.0 μ L de ADN de pMBO2 y 3.0 μ L de ADN de pALH1 a cada tubo, respectivamente. Se mezcló invirtiendo los tubos y se dejó en hielo durante 15 min. Transcurrido el tiempo se colocaron los tubos a 42



°C durante 45 s para producir un choque térmico en las células, después se agregaron 450 μ L de medio LB y se incubó durante 60 min a 37 °C con agitación constante (225 a 250 rpm). Pasados los 60 min de incubación, los tubos fueron centrifugados a 4,000 rpm por 20 s para concentrar las células. Se desecharon 350 μ L del sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células en el sobrenadante restante. Finalmente, las células resuspendidas fueron plaqueadas en cajas Petri con LB suplementado con antibiótico, 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma—Aldrich, USA) para pMBO2 y 50 μ g/mL de zeocina (Sigma—Aldrich, USA) para pALH1 y se incubaron durante 16 h a 37 °C.

8.2.7 Extracción de ADN plasmídico (Birnboim, 1983)

Las colonias que crecieron en presencia del agente de selección fueron purificadas por medio de tres rondas de subcultivo en placas de medio LB suplementadas con ampicilina (100 μ g/mL) y zeocina (50 μ g/mL) para la selección de clonas transformantes y fueron incubadas a 37 °C por 16 h. Las células se colectaron y resuspendieron en 70 μ L de agua destilada estéril, posteriormente se adicionaron 350 μ L de TENS (10 Mm Tris-HCL pH 7.5, 1.0 mM EDTA, 0.1 M NaOH, 0.5% SDS); la solución se mezcló por inversión de tubo y se reposó durante 3 min, después se le adicionaron 150 μ L de acetato de sodio 3.0 M pH 5.2 y se mezclaron suavemente por inversión; los tubos se colocaron en hielo por 5 min para precipitar proteínas y ADN cromosomal. Posteriormente, se centrifugó a 13,200 rpm durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante se recuperó en un microtubo de 1.5 mL y se le adicionaron 700 μ L de etanol absoluto centrifugándolo a 13,200 rpm durante 10 min. Las pastillas obtenidas se lavaron con 500 μ L de etanol al 70% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las pastillas se resuspendieron con 20 μ L de agua destilada estéril y se cuantificaron.

8.2.8 Caracterización de clonas transformantes de *E. coli* BL21 (DE3): mapa parcial y amplificación del transgén de interés mediante PCR

Una vez obtenidos los ADN plasmídicos de ambos plásmidos, fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI*, y *EcoRI/EcoRV* para pMBO2 y *EcoRI*, y *EcoRI/BamHI* para pALH1 durante 3 h a 37 °C. Posteriormente, la mezcla de reacción fue corrida en un gel de agarosa al 0.8% a 90 V por 40 min y el resultado fue revelado en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 200 Imaging System, USA).

Las amplificaciones de PCR se realizaron utilizando primers específicos para amplificar una parte de la región codificante del transgén *Lac2* de aproximadamente 908 pb: Fw-5' GACATCAAGAGCGACTACTAC 3' Rv-5' GATGATGGGCTTGAGCTTCT 3', utilizando 1.0 µL de ADN bajo las siguientes condiciones: 2 min de desnaturalización a 94 °C, seguido por 35 ciclos de amplificación (45 s a 94 °C, 45 s a 58 °C, 1 min a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C por 5 min. Posteriormente la mezcla de reacción fue corrida en un gel de agarosa al 0.8% a 90 V por 40 min y el resultado fue revelado en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 200 Imaging System, USA).

8.2.9 Preparación de ADN para la transformación genética de *P. pastoris* X33

A partir de una placa de cultivo bacteriano suplementado con zeocina (50 µg/mL) se aisló ADN plasmídico con el kit Zymo Pure™ Plasmid Miniprep (ZymoResearch®, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante y cuantificando el ADN plasmídico resultante mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2,000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA). 1.0 µg de ADN fue linearizado con la enzima *SacI* durante 24 h a 37 °C. El ADN fue concentrado con dos volúmenes de etanol absoluto y resuspendido finalmente en un volumen final de 50 µL de agua destilada estéril y almacenado a -20 °C hasta su uso.



8.2.10 Preparación de células electro competentes de *P. pastoris* para su transformación genética (Cregg *et al.*, 2009)

Se inocularon 50 mL de medio YPD sin suplementar con un cultivo fresco de *P. pastoris* X33 a 30 °C a 150 rpm durante 24 h hasta alcanzar una densidad de 5×10^7 células/mL. Al día siguiente el cultivo fue centrifugado a 5,000 rpm 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas por vórtex en 5.0 mL de YPD/HEPES (1.0 M, pH 8.0). Se agregaron 125 μ L de dithiothreitol (DTT) (Sigma—Aldrich, USA) 1.0 M y se mezcló suavemente. Las células se incubaron durante 15 min a 30 °C. Transcurrido el tiempo las células se lavaron con 20 mL de sorbitol 1.0 M frio y fueron recuperadas por centrifugación a 5,000 rpm 5.0 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y fueron lavadas nuevamente con 5.0 mL de sorbitol 1.0 M frio y resuspendidas por vórtex para después llevar el volumen a 25 mL con sorbitol 1.0 M frio y centrifugar a 5,000 rpm 5 min a 4°C. Por ultimo las células se resuspendieron en 1.0 mL de sorbitol 1.0 M frio y fueron recuperadas por centrifugación a 5,000 rpm 5 min a 4 °C. Finalmente fueron resuspendidas en 0.5 mL de sorbitol 1.0 M frio (concentración final de 1×10^9 células/mL), alicuotadas en viales de 40 μ L y almacenadas a -80 °C hasta su uso.

8.2.11 Transformación genética de *P. pastoris* X33

La transformación genética de *P. pastoris* X33 (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) fue llevada a cabo en un electroporador MicroPulser™ Electroporator (BIO-RAD®, Hercules CA, USA). 500 ng de ADN del plásmido pALH1 linearizado con la enzima *SacI* fueron mezclados con 50 μ L de células electro competentes y transferidos a una cubeta de electroporación (MicroPulser/Gene Pulser Cuvettes 0.2 cm gap BIO-RAD®, Hercules CA, USA) previamente enfriada a -20 °C durante 4 h. La cubeta fue colocada dentro del portacubetas de la cámara del electroporador y se deslizó hasta que estuvo en contacto con la base de la cámara. Se utilizaron los parámetros preestablecidos por el electroporador para *P. pastoris* (voltaje 1500 V, resistencia 200 Ω , capacitancia 25 mF) y se pulso una vez. La cubeta fue removida de la cámara

e inmediatamente se agregó 1.0 mL de YPD/sorbitol 1M frío y se transfirió el contenido de la cubeta a un microtubo de 1.5 mL estéril. Las células electroporadas fueron incubadas a 30 °C durante 2 h. Transcurrido ese tiempo las células fueron centrifugadas y se decantaron 800 µL de sobrenadante, el resto fue resuspendido e inoculado en placas YPD/sorbitol 1.0 M suplementado con 200 µg/mL de zeocina. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72-96 h hasta el crecimiento de colonias.

8.2.12 Extracción de ADN genómico y amplificación del gen de interés mediante PCR en *P. pastoris* X33 (Löoke *et al.*, 2011)

Las colonias que crecieron en presencia del agente de selección fueron purificadas por medio de tres rondas de subcultivo en medio YPD suplementado con zeocina (200 µg/mL) para la selección de clonas transformantes y se incubaron durante 96 h a 30 °C. Posteriormente, las células fueron recolectadas y se resuspendieron en 200 µL de buffer de lisis (LiOAc 200 mM) por vórtex. Las células fueron incubadas 10 min a 70 °C y transcurrido el tiempo se añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto (Sigma—Aldrich, USA) para precipitar el ADN. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. La pastilla de ADN se lavó con 1.0 mL de 70% etanol para centrifugar a 10,000 rpm 10 min a 4 °C. Luego, se decantó el sobrenadante y una vez evaporado por completo el etanol, el ADN fue resuspendido en 50 µL de agua destilada estéril para centrifugar a 10,000 rpm 10 min a 4 °C. Por último, se tomó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo para su almacenamiento a -20 °C hasta su uso.

Las amplificaciones de PCR se realizaron utilizando cebadores específicos para amplificar una parte de la región codificante del transgén *Lac2* de aproximadamente 908 pb: Fw-5' GACATCAAGAGCGACTACTAC 3' Rv-5' GATGATGGGCTTGAGCTTCT 3', y cebadores específicos para una región de 2,616 pb: Fw-5' TCTATCGCTTCTGAACCCCG 3' Rv-5' GAAGCCTGCATCTCTCAGG 3', que incluye una parte del promotor AOX1 hasta el terminador utilizando 1.0 µL de ADN bajo las siguientes condiciones: 2 min de desnaturalización a 94 °C, seguido por 35 ciclos de amplificación (45 s a 94 °C, 45 s a 58 °C, 1 min a 72 °C) y un ciclo

final a 72 °C por 5 min. Posteriormente la mezcla de reacción fue corrida en un gel de agarosa al 0.8% a 90 V por 40 min y el resultado fue revelado en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 200 Imaging System, USA).

8.2.13 Inducción de la expresión y recuperación de proteínas recombinantes de *E. coli* (Falconer *et al.*, 1998)

De las colonias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pMBO2 que crecieron en presencia del agente de selección, se seleccionó una, la cual fue cultivada en 3.0 mL de LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) durante toda la noche en agitación constante (250 rpm) a 37 °C. Al siguiente día se tomaron 100 µL de preinóculo para colocarlos en 50 mL de medio de cultivo LB sin antibiótico y se incubaron en agitación constante (250 rpm) a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.35-0.40. Posteriormente, se añadieron 250 µL de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 0.1 M y se incubó durante 16 h en agitación constante a 37 °C.

Pasadas las 16 h de inducción, el medio se centrifugó a 5,500 rpm durante 15 min a 4 °C, después de este periodo las células se resuspendieron en 500 µL de solución de lisis (Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, EDTA 10 mM, Lisozima 0.5 mg/mL, pH 5.0). Se sonicó por 1 min e inmediatamente se incubó en hielo por 1 min (este paso se repitió cinco veces), en seguida se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C, se separó el sobrenadante (proteínas solubles) y se almacenó a -20 °C. Al pellet restante (proteínas insolubles) se le agregaron 250 µL de solución de lisis con urea 6.0 M y se incubó por 30 min a 37 °C. Finalmente, transcurrido este tiempo se centrifugó por 30 min a 5,000 rpm y el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Las proteínas solubles e insolubles fueron dializadas con una membrana de corte de peso molecular de 10,000 Dalton y 22 mm SnakeSkin Dialysis Tubing (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) contra 1X PBS pH 7.4 (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.245 g KH₂PO₄) durante 24 h a 4 °C a 100 rpm. Al día siguiente

las proteínas fueron concentradas 10 veces de la siguiente manera: se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se incubaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min para posteriormente ser centrifugadas a 10000 rpm 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se descartó el sobrenadante y las proteínas fueron resuspendidas en agua destilada estéril.

8.2.14 Inducción de la expresión y obtención de proteínas recombinantes de *P. pastoris* (You *et al.*, 2014)

La colonia de *P. pastoris* X33 transformada con el vector pALH1 e integrada en el genoma de la levadura, fue cultivada en 5.0 mL de agar líquido YPD suplementado con zeocina ($200\text{ }\mu\text{g/mL}$) durante toda la noche en agitación constante (150 rpm) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.80-1.0. Al siguiente día el medio fue centrifugado a $5,000\text{ rpm}$ 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 50 mL de medio BMMY. Los cultivos se incubaron durante 96 h en agitación constante (150 rpm) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, con 0.5% v/v de metanol añadido diariamente.

Después de 96 h de inducción, las células fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación a $5,000\text{ rpm}$ 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El medio de cultivo sobrenadante fue dializado con una membrana de corte de peso molecular de 10,000 y 22 mm SnakeSkin Dialysis Tubing (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) contra 1X PBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.245 g KH_2PO_4) pH 7.4 durante 24 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 100 rpm . Al día siguiente las proteínas fueron concentradas 10 veces de la siguiente manera: se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se incubaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min para posteriormente ser centrifugadas a $10,000\text{ rpm}$ 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se descartó el sobrenadante y las proteínas fueron resuspendidas en agua destilada estéril.

8.2.15 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Biuret (1.5 g CuSO₄, 6.0 g 2,3-dihidroxi-[R-(R*R*)]-butanedioic ácido, tetrahidratado monosódico monopotásico, 500 mL H₂O, 300 mL NaOH 10% p/v, 1 g KI) el cual se basa en la formación de un complejo coloreado entre los enlaces peptídicos y los grupos NH de los enlaces en medio básico. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la relación es bastante específica, de manera que casi no hay interferencia.

Para poder obtener la ecuación de la recta se realizó una curva de calibración con Albumina de Suero Bovino (Sigma—Aldrich, USA) a diferentes concentraciones. Luego de la obtención de la curva y la ecuación de la recta, se procedió a realizar las lecturas de las muestras de la siguiente manera: en una placa de 96 pozos se depositaron 50 µL de extracto de proteína lacasa de *E. coli* y *P. pastoris*; adicionalmente se agregó a cada pozo 200 µL de reactivo de Biuret. Después de agitarlos se incubaron a 37 °C durante 10 min. Seguidamente se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 540 nm. Al obtener las absorbancias el valor fue sustituido en la ecuación de la recta para determinar las concentraciones.

8.2.16 Análisis de proteínas en gel de acrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Se utilizó una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems (BIO-RAD California, USA); se colocaron en el soporte de preparación dos vidrios para electroforesis con una separación de 1 mm entre cada uno, previamente lavados con etanol al 70%. Se preparó el gel separador con agua desionizada (dH₂O) (2.9 mL), poliacrilamida 30% (3.0 mL), Tris 1.0 M pH 8.8 (4.0 mL) (Sigma—Aldrich, USA), Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10% (0.1 mL) (Sigma—Aldrich, USA), Persulfato de Amonio (APS) 10% (0.1 mL) (IBI Scientific, USA) y tetrametiletiléndiamina (TEMED) (0.006 mL) (BIO-RAD, California, USA).

El gel se dejó polimerizar en condiciones de anaerobiosis. Una vez



polimerizado se preparó el gel concentrador con agua desionizada (dH₂O) (2.85 mL), poliacrilamida 30% (0.35 mL), Tris 1.0 M pH 6.8 (0.570 mL) (Sigma—Aldrich, USA), Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10% (0.020 mL) (Sigma—Aldrich, USA), Persulfato de Amonio (APS) 10% (0.038 mL) (IBI Scientific, USA) y tetrametiletiléndiamina (TEMED) (0.006 mL) (BIO-RAD, California, USA). El gel concentrador se colocó en el espacio restante de los vidrios y una vez dentro, se colocó un peine de 15 pozos.

Cuando el gel quedó completamente polimerizado se sacó del soporte de preparación y se colocó en la cámara de electroforesis previamente llena con buffer de corrida 1X (3 g Tris-base (Sigma—Aldrich, USA), 14.4 g glicina (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA), 1 g SDS pH 8.3 (Sigma—Aldrich, USA) aforado a 1.0 L con agua desionizada estéril); se retiró el peine del gel y los pozos fueron lavados con buffer de corrida.

En microtubos de 1.5 mL se colocaron 0.2 mg de extracto de proteína de cada muestra y un control positivo una lacasa comercial de *Trametes versicolor* (SKU: 38429, Sigma—Aldrich, USA) y se mezclaron con 10 µL de buffer de carga 4X (0.125M Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (Sigma—Aldrich, USA), 20% glicerol (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA), 0.0715 M β-mercaptoetanol (Sigma—Aldrich, USA), 0.005% azul de bromofenol (Sigma—Aldrich, USA) y 4% p/v SDS (Sigma—Aldrich, USA)); las muestras se calentaron a ebullición durante 5 min y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min, después fueron cargadas en el gel. Se corrió el gel a 85 V durante 3 h. Transcurrido el tiempo se retiró de la cámara y fue colocado en solución de tinción toda la noche (200 mL metanol (Merck, Alemania), 265 mL dH₂O, 35 mL de ácido acético glacial (Biopack, Argentina) y 0.5 g de azul de Coomassie R-250); al día siguiente el gel se colocó en solución de desteñir (200 mL metanol (Merck, Alemania), 100 mL etanol, 50 mL de ácido acético glacial (Biopack, Argentina), 650 mL de agua destilada) durante 1 h, repitiendo este paso tres veces.

8.2.17 Identificación de glicoproteínas en SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE siguiendo el protocolo mencionado en el apartado anterior y posteriormente se empleó el kit Glycoprotein Detection Kit® (Sigma—Aldrich, USA) para la identificación de glicoproteínas en dicho gel.

Siguiendo las instrucciones del fabricante el gel fue colocado en solución de fijación toda la noche en agitación constante (200 mL dH₂O, 200 mL de metanol); al día siguiente se realizaron dos lavados reemplazando la solución fijadora por agua desionizada (dH₂O) y se colocó 20 min en agitación constante (200 rpm) dos veces. Transcurrido el tiempo se reemplazó el agua desionizada por solución de oxidación y se dejó actuar durante 1 h en agitación constante (200 rpm). Posteriormente, se realizó otro lavado con agua desionizada 20 min en agitación constante (200 rpm) dos veces y se añadió solución de tinción (Schiff's Reagent, Fuchsin-Sulfite Reagent (Sigma—Aldrich, USA)) la cual se dejó actuar durante 2 h o hasta observar las bandas en color magenta. Pasado el tiempo se colocó el gel en solución de reducción por 1 h y se realizaron tres lavados más con agua desionizada. Por último, el gel fue transferido a solución de almacenamiento (380 mL dH₂O, 20 mL ácido acético glacial).

8.2.18 Análisis enzimático de Lac2 recombinante (Bourbonnais *et al.*, 1998)

Se utilizó ABTS como sustrato para la medición de la actividad enzimática de Lac2 recombinante. El aumento de la absorbancia resultante por la oxidación del sustrato se midió a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36 \text{ mM cm}^{-1}$). Una unidad (U) se definió como la cantidad de enzima lacasa que oxida 1 μmol de sustrato por minuto.

La determinación de la actividad enzimática preliminar de Lac2 recombinante expresada en *E. coli* BL21 (DE3) (eLac2) y *P. pastoris* (pLac2) se realizó de la siguiente manera: en microtubos de 1.5 mL se colocó 1.0 mg de extracto de proteínas con 400 μL de una solución tampón de acetato de sodio 0.1 M pH 5.0 y



1.0 mL de ABTS 1.0 mM y se incubó a temperatura ambiente por 1 h, como control positivo se utilizó una lacasa comercial de *Trametes versicolor* (SKU: 38429, Sigma—Aldrich, USA)

Para la determinación del pH óptimo se evaluó la actividad enzimática en un rango de pH de 3.0-6.0 utilizando solución tampón de acetato de sodio 0.1M. En microtubos de 1.5 mL se colocó 1.0 mg de extracto de proteínas con 400 μ L de cada una de las soluciones tampón de acetato de sodio 0.1 M y 1.0 mL de ABTS 1.0 mM y se incubó a temperatura ambiente por 1 h.

La evaluación del efecto de la temperatura se determinó incubando la mezcla de reacción durante 1 h a temperaturas que varían de 25-90 °C. En microtubos de 1.5 mL se colocó 1.0 mg de extracto de proteínas con 400 μ L de tampón de acetato de sodio 0.1 M pH 5.0 y 1.0 mL de ABTS 1.0 mM.

Los efectos de los iones metálicos divalentes (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) sobre la actividad enzimática se determinaron mediante la adición de NaCl, MgCl_2 , CaCl_2 , MnSO_4 , CuSO_4 y $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ a una concentración final de 10 mM a la mezcla de reacción incubada a 30 y 60 °C para eLac2 y pLac2, respectivamente durante 1 h. En microtubos de 1.5 mL se colocaron 1.0 mg de extracto de proteínas con 75 μ L de la solución stock 100 mM de cada uno de los iones metálicos a evaluar, 325 μ L de tampón de acetato de sodio 0.1 M pH 5.0 y 1.0 mL de ABTS 1.0 mM.

Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se determinaron utilizando diferentes concentraciones de ABTS 0.01, 0.04, 0.07, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 5.0 y 10 mM. En una placa de 96 pozos se colocaron 16.67 mg de extracto de proteínas solubles con 66.67 μ L de tampón de acetato de sodio 0.1 M y 1.0 mL de ABTS 1.0 mM a la temperatura y pH óptimo determinado en los análisis anteriores para eLac2 y pLac2, midiendo la absorbancia cada minuto por 5 minutos.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado; los controles no fueron tratados con extracto de proteína.

8.2.19 Decoloración de verde de malaquita por Lac2 recombinante (Liu *et al.*, 2019)

Para evaluar la aplicación de Lac2 recombinante frente a la degradación de colorantes de triarilmetano, se utilizó verde de malaquita a concentraciones de 20, 50, 100 y 200 mg/mL. En una placa de 96 pozos se colocaron 0.1 mg de extracto de proteínas con 235 μ L de tampón Tris 0.1 M y 45 μ L de colorante y se incubaron a temperatura ambiente, el análisis se realizó por triplicado. El aumento de la absorbancia resultante por la oxidación del sustrato se midió a 618 nm, la eficiencia de degradación se calculó como porcentaje de la siguiente forma:

$$\text{Decoloración (\%)} = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times 100$$

Donde A_0 = absorbancia inicial y A_f = absorbancia final.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado; los controles no fueron tratados con extracto de proteína.

8.2.20 Análisis de varianza (ANOVA) de un factor

El análisis estadístico fue realizado en el software Minitab® ver. 18, para identificar el pH, temperatura óptima y la influencia de los iones metálicos sobre la actividad de Lac2 recombinante.

Los ensayos enzimáticos se repitieron tres veces y se reportaron como el promedio de triplicados con las desviaciones estándar correspondientes. La significancia estadística se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y un análisis comparativo de medias con el método de Tukey con un intervalo de confianza del 95% para cada uno de los factores (pH, temperatura y iones metálicos).

IX. RESULTADOS

9.1 Análisis y clonación de la secuencia del transgén *Lac2* en el vector pPICZαA®

Se tomó la secuencia codificante del transgén *Lac2* de 1,737 pb, integrada en la construcción pMBO2 que presenta una longitud de 7,643 pb. Este vector contiene el transgén *Lac2* que codifica la enzima lacasa en *G. graminis* var *graminis* entre los sitios de restricción *EcoRV/EcoRI* del Sitio Múltiple de Clonación, bajo el control del promotor y terminador del gen diez del bacteriófago T7. Además, el vector contiene un gen de resistencia a ampicilina AmpR de 861 pb dirigido por el promotor AmpR de 105 pb, un promotor *lacI* para la inducción del operón *lac*, inducible con IPTG, correspondientes al vector pET32a(+)[®] (Figura 6).

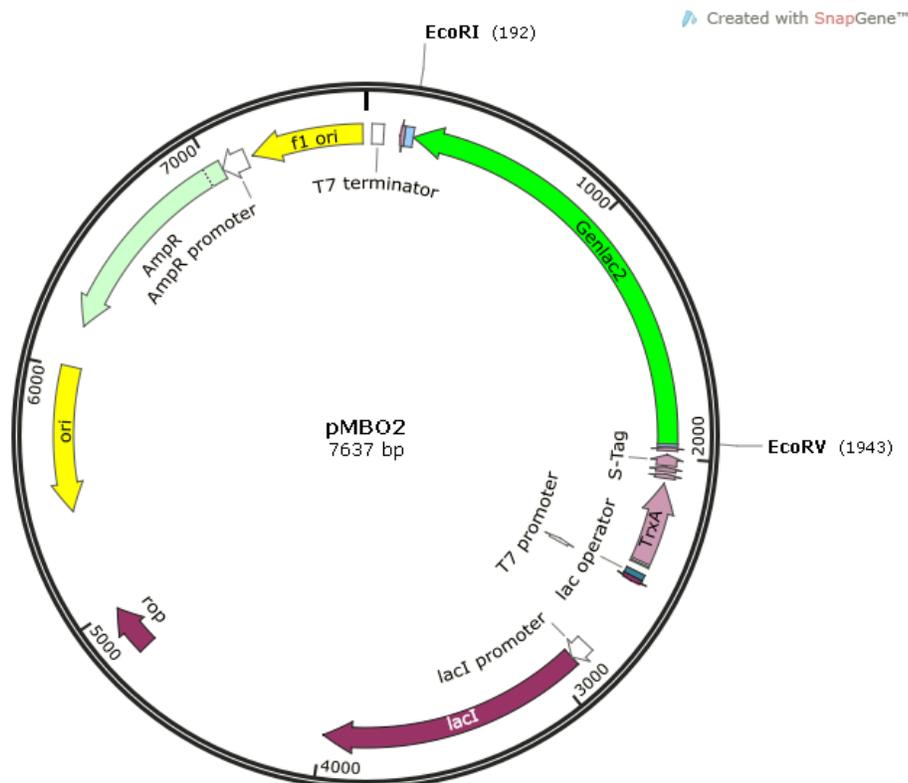


Figura 6. Mapa *in silico* de la construcción pMBO2 visualizado en SnapGene[®]. Plásmido pMBO2 7,643 pb derivado del vector pET32a(+)[®] en el cual fue clonado el transgén *Lac2* que codifica para la enzima lacasa en los sitios de restricción *EcoRV/EcoRI* del Sitio Múltiple de Clonación.

La secuencia se analizó *in silico* utilizando el programa SnapGene® ver 2.4.1 (GSL Biotech) y se realizó la adición de un sitio de restricción *Xba*I (TCTAGA) en los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante del transgén *Lac2* (Figura 7) para facilitar su extracción en futuras investigaciones. La secuencia fue enviada a la empresa GeneScript® para su clonación en el vector pPICZαA® en el sitio de restricción *Xba*I, en fase con el péptido señal y con ello dar lugar a la construcción pALH1.

```
tctagagatatcatggttgctcatcactctttcacgctactctcgctcgccgacctcgctgggctctcctctcggggaActccagcagag
ggccgagccccggattcagcaacgggctacatgcgaggaaacaccgccaccacgcgctcgagtggtgagcttcgacatcaagagc
gactactacactggccagcaccccaactggagtcaccagggagtcttggttgagcttacagacagcgtaagctggcgcccgatgg
cgctcctcgctatgttcaggccttcaacggcaccgttccggccccgactctcgtgatggactggggcgacgacgtcgatccatgaccc
aaciaaactcaccagagcatcaacggcaccagtgctcactggcagccctgcaccagaaggacacggctcctcagcgatggtgctgctg
cgtaaccagtgcccctcggccccggcagcaccagacctacaagttcaaggccacaaactatggctcctcgtggtaccactcgcacttt
gctgagcagggcgtggcaggggtgcttccggcgcatcatcaacggctcccggcagcgcaattacgacgaggacgtcggcatggtcgt
gctgagcgactggggccacaagacgcccgacgagctttggcaccagggccgagagccagggccccacgcttgagaacgcccctgatc
aacggcatgaacgtctacggcgccgagggcaaccagaccggcaagcgctgggagacctcgttcgaggccggcaagtcttaccgcttc
gcattgtcaactgcccacacccacttcaagttcggcatcgacaaccacaccctgaccgtcatcgcccttgacttattcccgttgag
ccgtacgagaccacAatggtcaacatcggcatgggcccagcgctcgacgtcattgtcaagggtgaccagggccgctgctgcctcgcacttc
tggtgctgcgcccacccccagagcgctcggcaccatcgagatggccaagaacaccgcccacatcgctgactacggcaacagccagg
gctgccccagcaccaccggccacacctacgtcgacgctgagggagcagcgcctcgagaagctcaagcccacatccgcatcgacgct
gagcagtcacactacgagcagctgaagatcgccaccgcccggcgtcaacggcaacggcgttctcgtggtacctcaactccaccacAat
ggaActcgactggtccaacccccacgctcagccagctcggcagcaacgccacggctgccttctccaacagcaacgcccgtcatggagctgc
ccgagggccgacaagtgggcctacgtcatcatccagaccgacttgggtgctgcccacccatccactgcacggccacgactactcggctc
tcgcccagggcagcggcgctaccagcccggcgtaccaagctgatcaccaccaaccccatgcccggcagacggccatcctgcccggc
gccggccacctggtcctggtttcaagaccgacaacccAgggcgctggctcatgactgccacatcggtggcacacggcccagggcttc
gccatgagttcgtcgagcgccgagcgagatgttctccaagaacatcatcaacaacaacgacatcgagggcctctcgagccctggag
gacacacgtcggcaagcacaacatcaagctcgaggactcgggcatctaaagatctgaattctctaga
```

Figura 7. Secuencia de la región codificante del transgén *Lac2* de *G. graminis* var *graminis*. Obtenida de la construcción pMBO2, que codifica para la enzima lacasa 2 de 1,737 pb. La secuencia muestra en negritas el codón de inicio y el codón de paro. En color amarillo y azul se muestran los sitios de restricción para *EcoRV* (gatatc) en el extremo 5' y *EcoRI* (gaattc) en el extremo 3', respectivamente; mientras que, en color rosa, en ambos extremos de la secuencia, se muestra la adición del sitio de restricción *Xba*I (tctaga).

En la figura 8 se muestra el mapa diseñado *in silico* de la construcción pALH1 (fusión del vector pPICZαA® y el transgén *Lac2* de *G. graminis* var *graminis*). La construcción presenta un gen de resistencia a zeocina (BleoR) dirigido por el promotor TEF1, un fragmento de 942 pb de la secuencia 5' del promotor del gen AOX1, un fragmento de 260 pb de la secuencia 3' del terminador del gen AOX1, así como una secuencia de secreción (α-MF) de *Sacharomyces cerevisiae* pertenecientes al vector pPICZαA®. Asimismo, el vector pALH1 presenta el transgén *Lac2* de *G. graminis* var *graminis* clonado en el sitio *XbaI* del sitio múltiple de clonación.

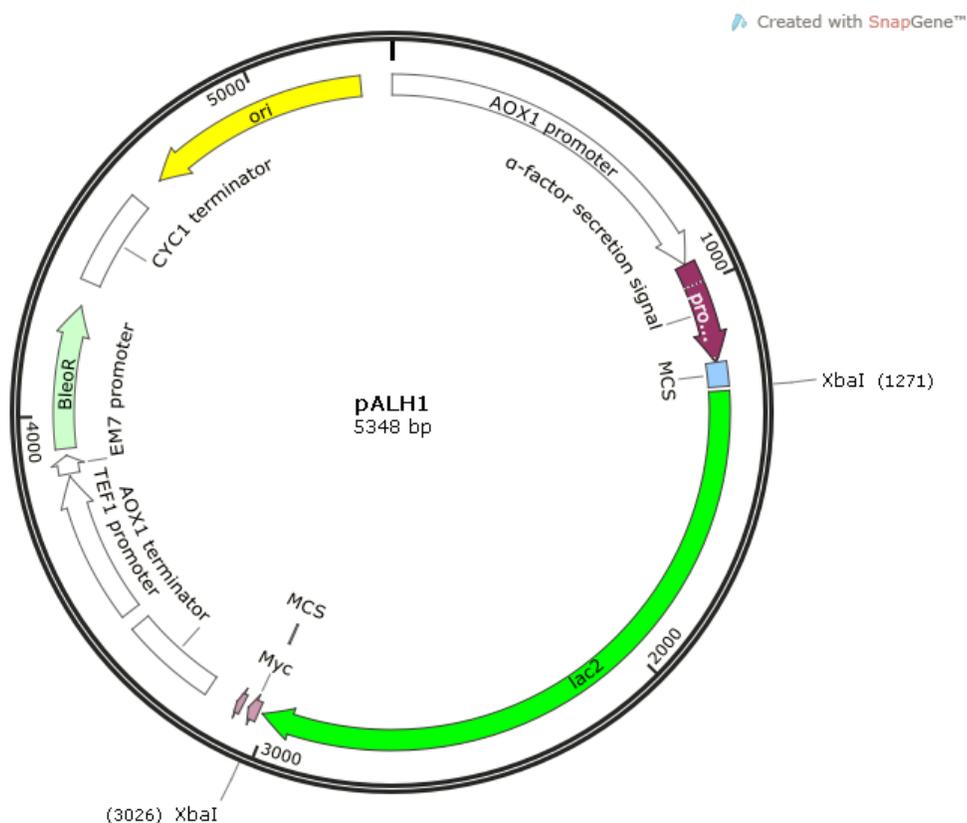


Figura 8. Mapa *in silico* de la construcción pALH1 visualizado en SnapGene®. Plásmido de 5,348 pb derivado del vector pPICZαA® en el que fue clonado el transgén *Lac2* que codifica para la enzima lacasa en el sitio restricción *XbaI* del sitio múltiple de clonación.

9.2 Comparación *in silico* de la lacasa codificada por el transgén *Lac2* con otras lacasas

La secuencia de aminoácidos de la lacasa codificada por el transgén *Lac2* fue modelada tridimensionalmente utilizando el software Phyre2 (Figura 9A). Por otro lado, se obtuvieron 3 modelos cristalográficos de la base de datos del RCB PDB (<http://www.rcb.org>) para hacer la comparación *in silico* con *Lac2* recombinante; la lacasa de *Trametes versicolor* (PDB ID: 1KYA) (Figura 9B), *Basidiomycete* PM1 (Cect 2971) (PDB ID: 5ANH) (Figura 9C) y *Pycnoporus cinnabarius* (PDB ID: 2XYB) (Figura 9D).

La figura 10 muestra la superposición de estructuras utilizando el software Chimera para analizar la similitud por medio de la superposición de las estructuras. No obstante, aunque a simple vista parecieran ser muy similares, el análisis de alineamiento de estructuras tridimensionales utilizando DALI (Holm y Laakso, 2016) mostró que *Lac2* y 5ANH comparten 27% de similitud en la secuencia de aminoácidos y el alineamiento de 458 de un total de 497 aminoácidos, por lo cual tienen 92.15% de similitud en la estructura de la proteína (DRMS= 2.0 Å), mientras que *Lac2* y 2XYB comparten 28% de similitud en su secuencia de aminoácidos y 91.58% de similitud en su estructura proteica (DRMS= 1.9 Å) con la alineación de 457 de 499 aminoácidos; asimismo, *Lac2* y 1KYA comparten 28% de similitud en la secuencia de aminoácidos y un 91.93% de similitud en la estructura de la proteína (DRMS= 2.1 Å) con la alineación de 456 de 496 aminoácidos.

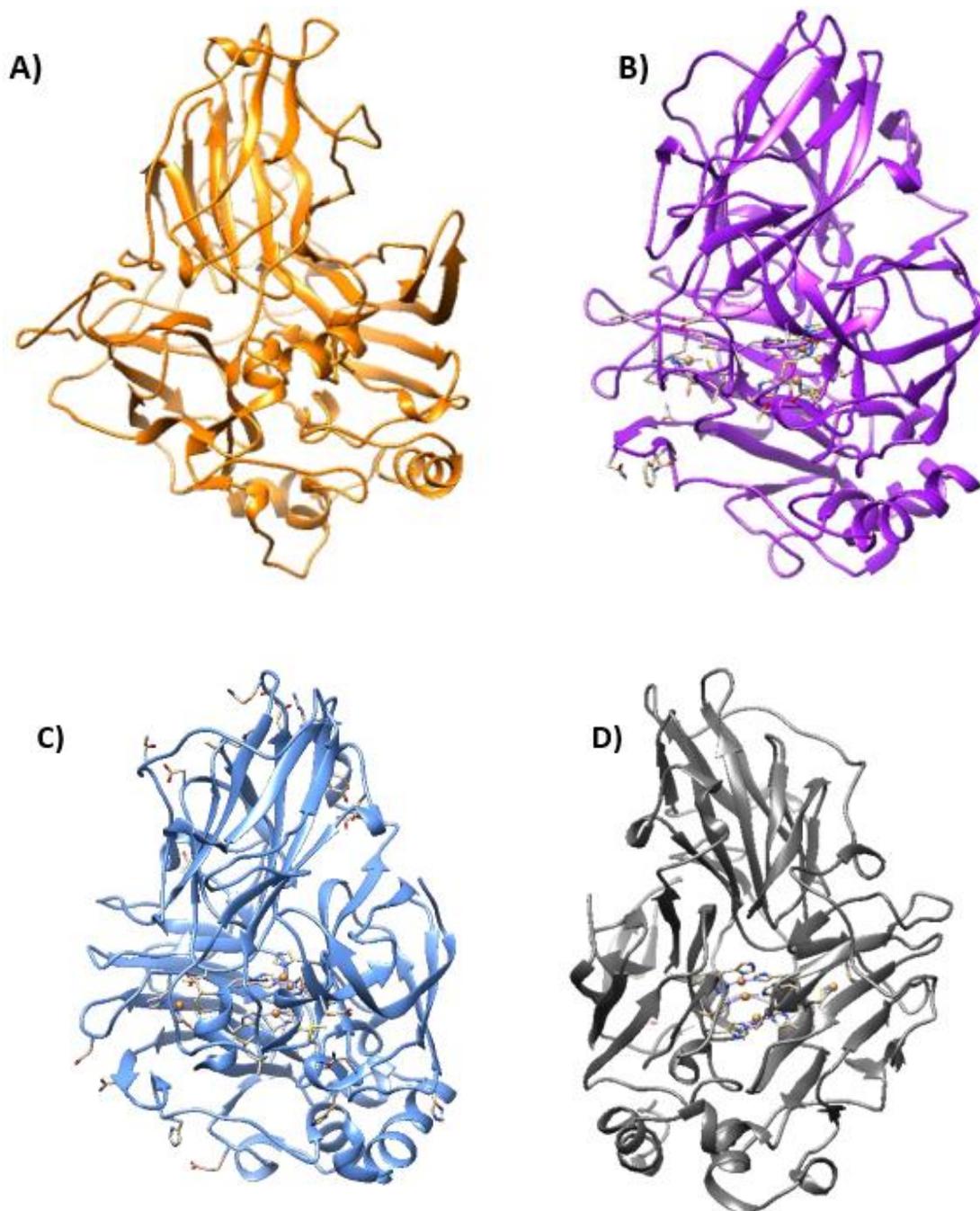


Figura 9. Modelado tridimensional de las proteínas lacasa. Modelo “de cintas” para las proteínas A) Lac2 de *G. graminis* var *graminis*; B) lacasa de *Trametes versicolor* (PDB ID: 1KYA); C) lacasa de *Pycnoporus cinnabarius* (PDB ID: 2XYB); D) lacasa de *Basidiomycete* PM1 (Cect 2971) (PDB ID: 5ANH). Los modelos B, C y D obtenidos del RCSB PDB muestran en color naranja sus cuatro átomos de cobre y los residuos de aminoácidos implicados en la coordinación de estos.

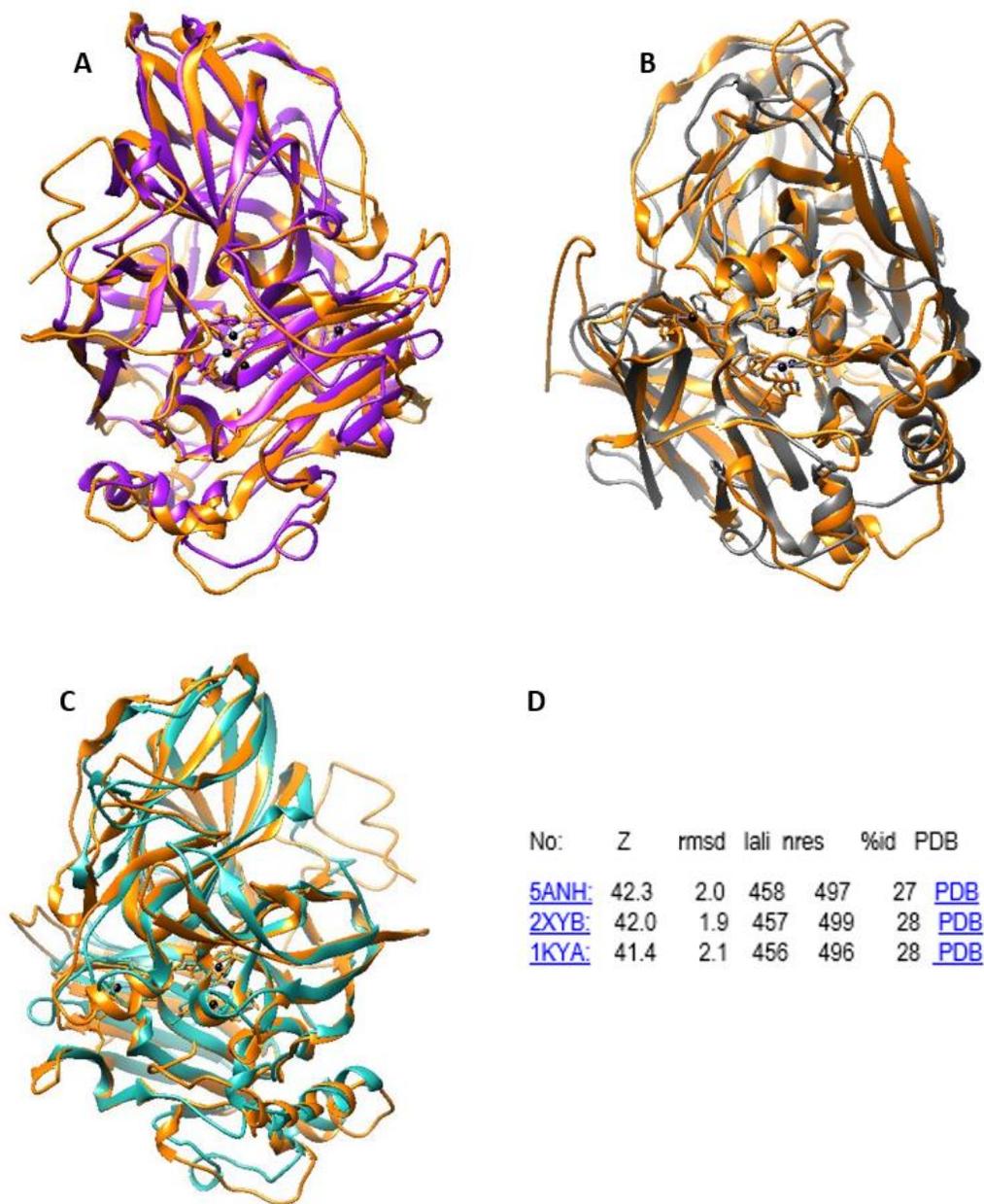


Figura 10. Comparación de proteínas lacasa. A) Superposición de proteínas en morado *T. versicolor* en naranja *G. graminis* var. *graminis*; B) Superposición de proteínas en gris *Basidiomycete* PM1 (cect 2971) en naranja *G. graminis* var. *graminis*; C) Superposición de proteínas en cian *Pycnoporus cinnabarius* en naranja *G. graminis* var. *graminis*; D) Análisis de alineamiento de estructuras 3D por Dali.

Los resultados muestran que a pesar de ser muy diferentes en su composición aminoacídica sus estructuras son muy similares debido a que estas enzimas presentan una gran diversidad en cuanto a su tamaño y su estructura; sin embargo, la estructura terciaria de los sitios redox y la coordinación de los sitios de cobre es muy conservada (Trubitsina *et al.*, 2021). Para la identificación de estos sitios altamente conservados, se realizó un alineamiento en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Figura 11). Los 8 ligandos de histidina del centro trinuclear formado por los cobres T2/T3 muestran un patrón altamente conservado de 4 motivos Histidina-X-Histidina. En uno de esos motivos, X es la cisteína que se une al cobre T1, mientras que las histidinas adyacentes se unen a cada lado uno de los cobres del sitio T3. A una separación de 35-75 residuos de aminoácidos hay otro motivo Histidina-X-Histidina y cerca del amino terminal hay otros dos motivos separados por 35-60 residuos.

El centro activo está formado por once aminoácidos diferentes (ILE¹²³, GLU⁴¹⁵, ASP⁴¹⁷, TRP⁴¹⁸, VAL⁵⁶⁶, GLY⁵⁶⁷, HIS⁵⁶⁹, ASN⁵⁷⁰, ILE⁵⁷¹, LYS⁵⁷² y LEU⁵⁷³).

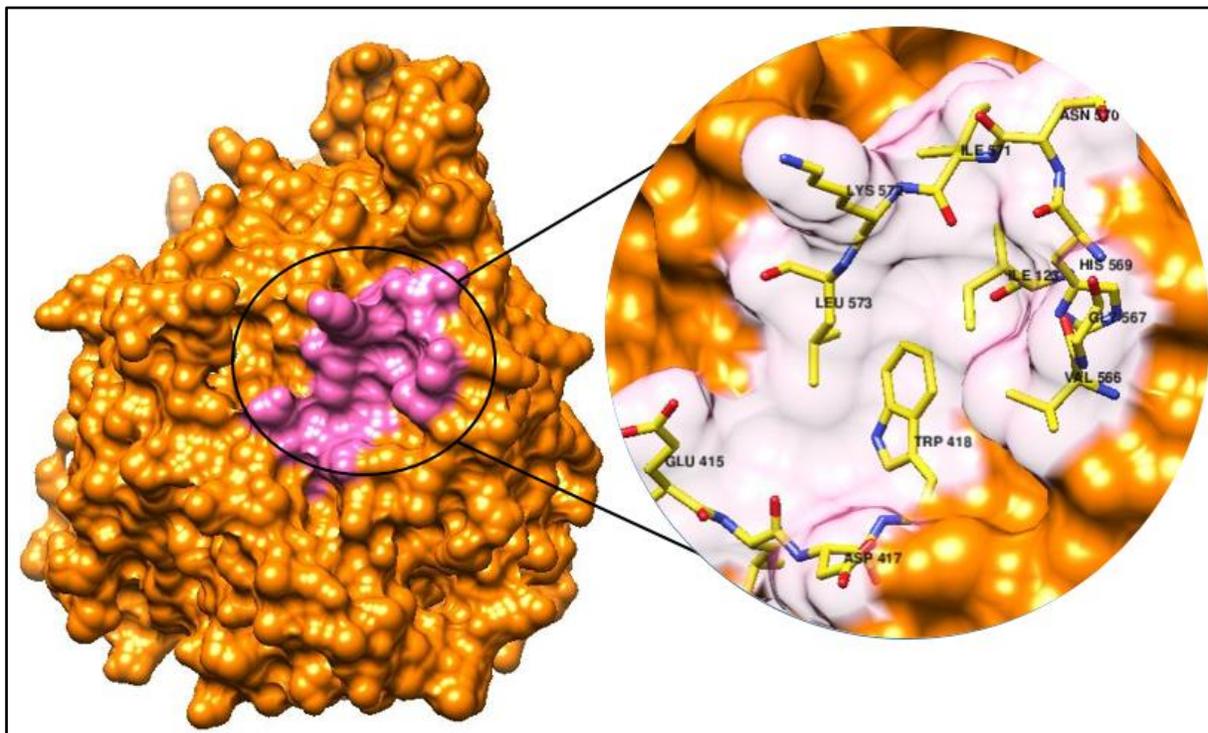


Figura 12. Centro activo de la proteína Lac2. Diagrama de superficie del modelo de la proteína Lac2 en color naranja con su centro activo resaltado en color rosa, visualizado en Chimera; Acercamiento al centro activo del modelo de la proteína Lac2, en color amarillo se muestran los aminoácidos que conforman el bolsillo (ILE¹²³, GLU⁴¹⁵, ASP⁴¹⁷, TRP⁴¹⁸, VAL⁵⁶⁶, GLY⁵⁶⁷, HIS⁵⁶⁹, ASN⁵⁷⁰, ILE⁵⁷¹, LYS⁵⁷² y LEU⁵⁷³).

De las ocho simulaciones de docking molecular realizadas en AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010) se calculó el promedio de afinidad en Kcal/mol para la mejor conformación que adopta el ABTS en el centro activo del modelo Lac2 siendo el resultado -7.4 Kcal/mol (Figura 13). La interacción entre el ABTS y el modelo se generó con los aminoácidos ILE¹²³, GLU⁴¹⁵, LEU⁴¹⁶, ASP⁴¹⁷, TRP⁴¹⁸, SER⁴³⁵, SER⁴³⁷, ASN⁴³⁸, VAL⁵⁶⁶, GLY⁵⁶⁷, HIS⁵⁶⁹, ASN⁵⁷⁰, ILE⁵⁷¹, LYS⁵⁷² y LEU⁵⁷³.

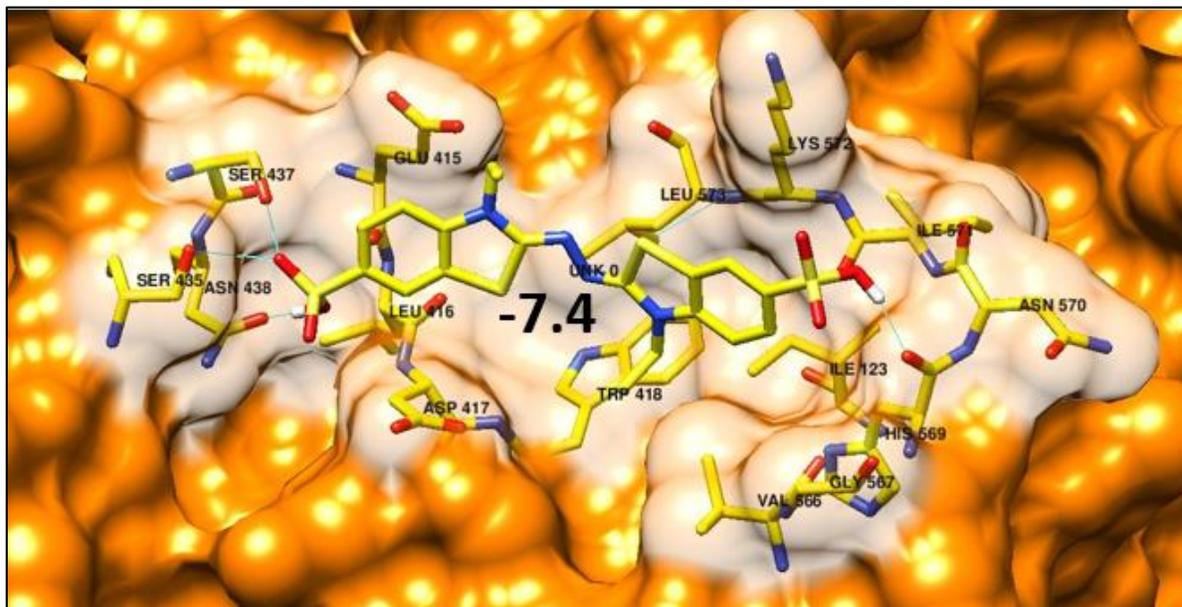


Figura 13. Acoplamiento molecular del ligando ABTS en el centro activo del modelo de la proteína Lac2. En color amarillo se muestran los aminoácidos con los cuales hace contacto el ligando (ILE123, GLU415, LEU416, ASP417, TRP418, SER435, SER437, ASN438, VAL566, GLY567, HIS569, ASN570, ILE571, LYS572 y LEU573) y al centro de la imagen se muestra la afinidad -7.4 Kcal/mol. Visualizado en Chimera.

El docking molecular se realizó de la misma manera para los modelos cristalográficos de las lacasas de *Trametes versicolor* (PDB ID: 1KYA), *Basidiomycete* PM1 (Cect 2971) (PDB ID: 5ANH) y *Pycnoporus cinnabarius* (PDB ID: 2XYB) (Figura 14); con energía de enlace de -7.1 Kcal/mol para 1KYA y 5ANH, mientras que para 2XYB fue de -7.5 Kcal/mol, respectivamente. Estos resultados indican que la proteína lacasa codificada por el gen *Lac2*, presenta una mayor afinidad por el sustrato ABTS que la lacasa de *Trametes versicolor*, que se considera el organismo más estudiado en cuanto a la producción de lacasas, y *Basidiomycete* PM1 (Cect 2971) el cual produce una lacasa de alto potencial redox (Upadhyay *et al.*, 2016); por otro lado, es similar a *Pycnoporus cinnabarius* el cual se ha utilizado con éxito para la decoloración de efluentes de plantas de pigmentos; por lo tanto, esto significaría, al menos *in silico*, que la proteína lacasa producida por el gen *Lac2* codificado podría ser funcional.

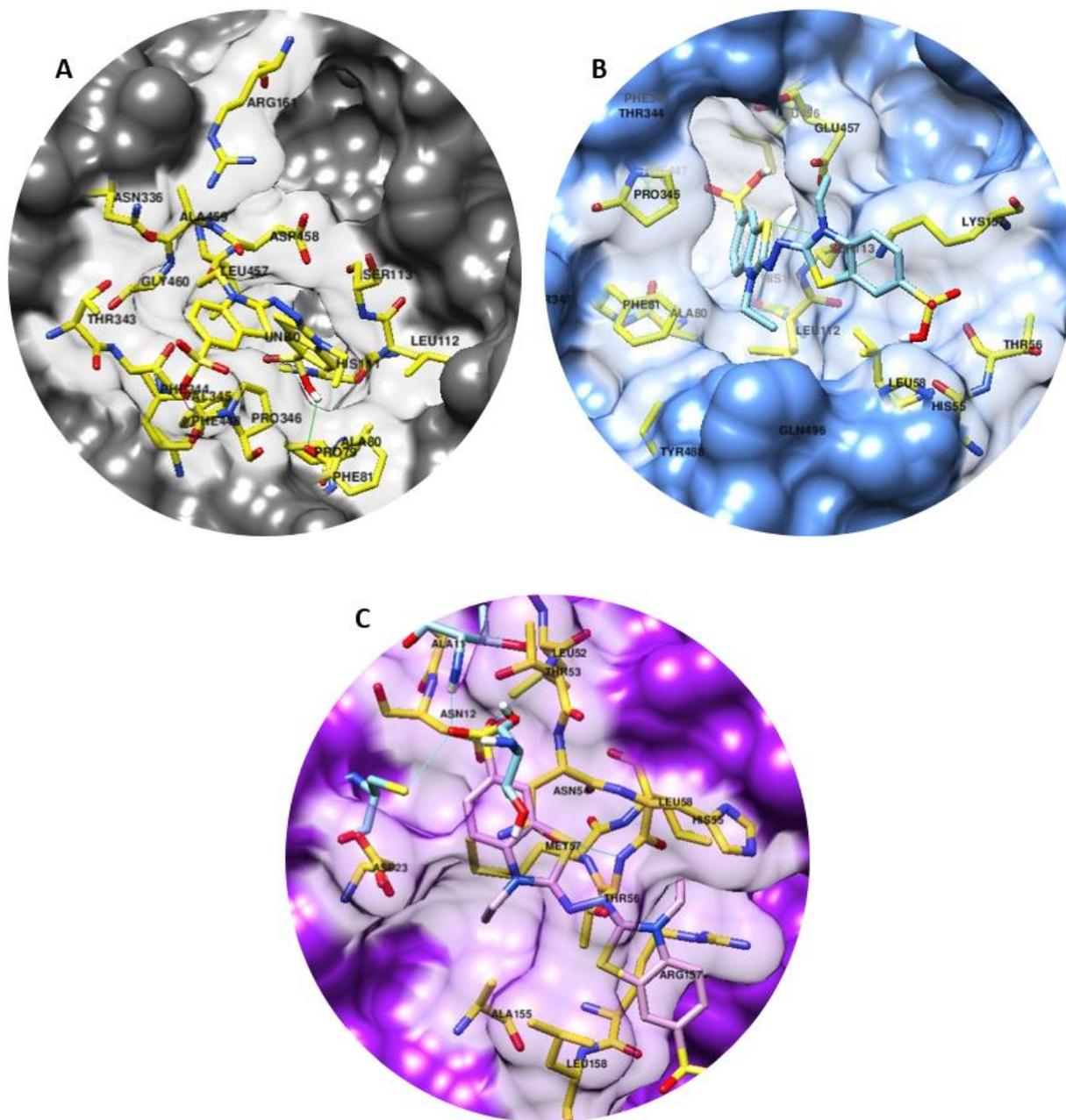


Figura 14. Acoplamiento molecular del ligando ABTS con otras lacasas. A) *Basidiomycete* PM1 (cect 2971) con afinidad de -7.1 Kcal/mol; B) *Pycnoporus cinnabarius* con -7.5 Kcal/mol; C) *Trametes versicolor* con afinidad de -7.1 Kcal/mol. Visualizado en Chimera.

9.4 Caracterización de clonas transformantes de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pMBO2

Células de *E. coli* BL21(DE3) fueron transformadas por choque térmico con ADN del plásmido pMBO2 (fusión del vector pET32a(+)[®] y el transgén *Lac2* de *G. graminis* var *graminis*) obteniéndose colonias transformadas a las 12h de incubación. Las colonias transformadas fueron purificadas por medio de tres rondas de subcultivo para la selección de clonas transformantes y se realizó una extracción de ADN plasmidico con Zymo Pure[™] Plasmid Miniprep kit obteniendo 150 ng de ADN con una relación 260/280 de 1.8 el cual es, por consenso, considerado puro.

Las clonas putativamente transformadas se caracterizaron mediante digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRI/EcoRV*. Se obtuvo un fragmento de 7,646 pb correspondiente a la linearización del plásmido con *EcoRI* y dos fragmentos de 5,886 y 1,751 pb correspondientes al vector pET32a(+)[®] y al transgén *Lac2*, respectivamente (Figura 15). Además, se confirmó la transformación mediante PCR a una clona seleccionada; los resultados de PCR mostraron un amplicón de 986 pb de la región codificante del transgén *Lac2* (Figura 16) lo que confirma la correcta integración del transgén *Lac2* en el vector pET32a[®], además, de su integración en las células de *E. coli* BL21 (DE3). Esta última clona, fue seleccionada para la inducción de proteínas de *E. coli* con el vector pMBO2, esta clona fue denominada C2-pMBO2-Ec (C2 corresponde al número de clona aislada; pMBO2 corresponde al plásmido que contiene la clona y Ec se refiere a *E. coli*, el organismo que la expresa).

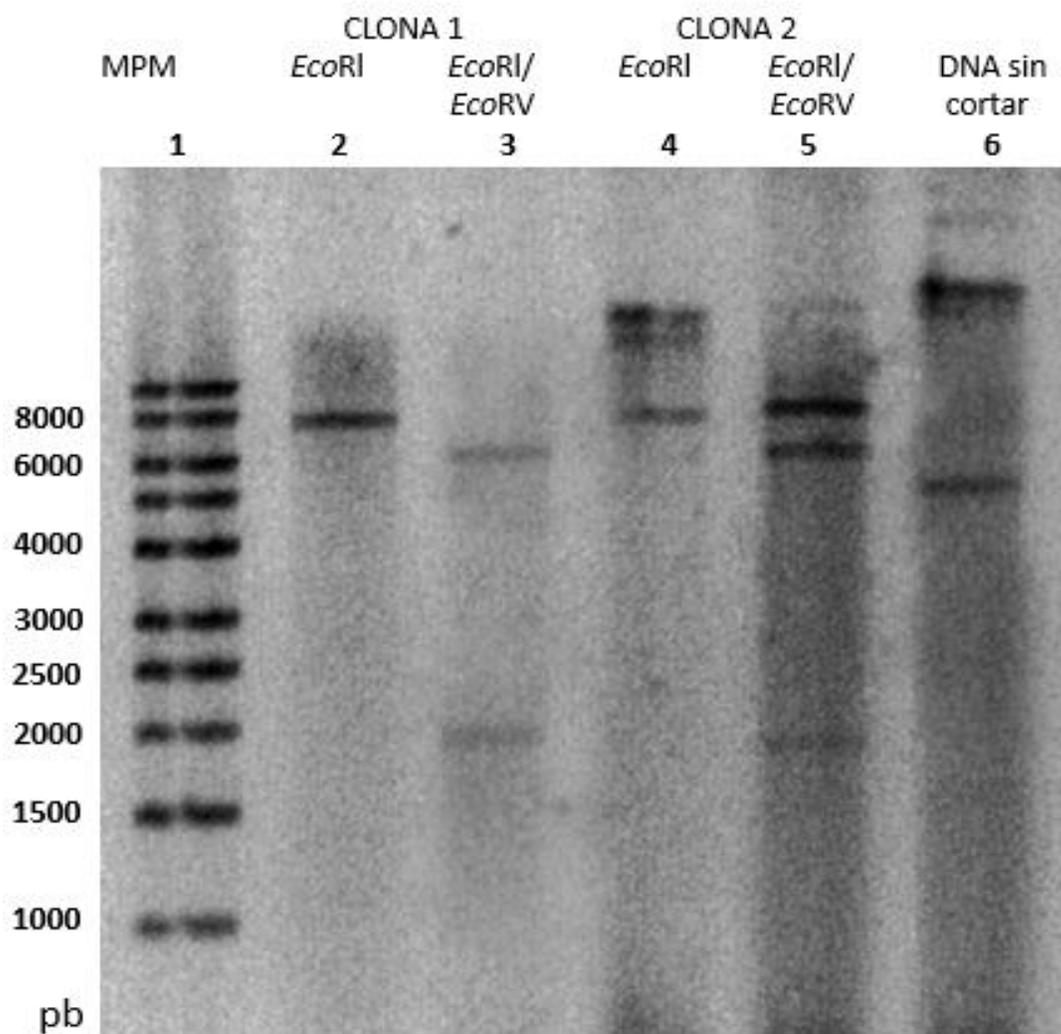


Figura 15. Caracterización del ADN plasmídico de pMBO2 por enzimas de restricción. Agarosa 0.8%. Carril 1: MPM 1kb ladder (Sigma—Aldrich, USA). Carril 2: restricción con *EcoRI* clona 1 (7,646 pb). Carril 3: restricción con *EcoRI/EcoRV* clona 1 (5,886 y 1,751 pb). Carril 4: restricción con *EcoRI* clona 2 (7,646 pb). Carril 5: restricción con *EcoRI/EcoRV* clona 2 (5,886 y 1,751 pb). Carril 6: ADN sin cortar.

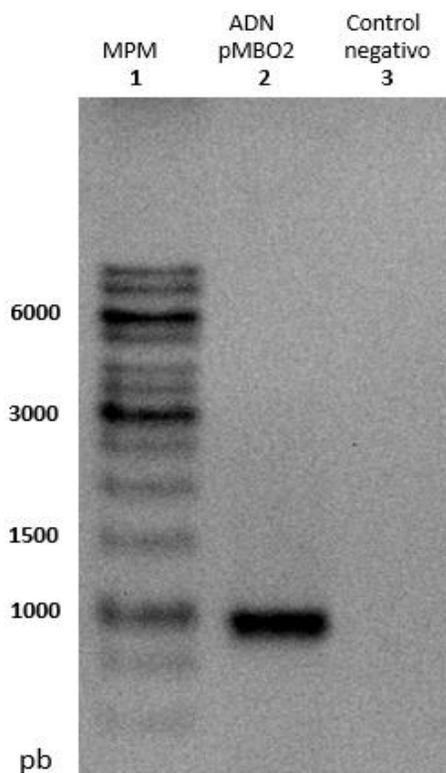


Figura 16. Caracterización del ADN plasmídico de pMBO2 por PCR. Agarosa 0.8% Amplificación de una región del transgén *Lac2* con los primers FW-5' GACATCAAGAGCGACTACTAC 3' FR-5' GATGATGGGCTTGAGCTTCT 3'. Agarosa 0.8%. Carril 1: MPM Genruler 1kb ladder (Sigma—Aldrich, USA). Carril 2: producto de amplificación de aproximadamente 908 pb; Carril 3: control negativo con ADN de *E. coli* sin transformar.

9.5 Caracterización de clonas transformantes de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pALH1

Células de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas por choque térmico con ADN del plásmido pALH1 (fusión del vector pPICZαA® y el transgén *Lac2* de *G. graminis* var. *graminis*) obteniéndose colonias transformadas a las 12 h de incubación. Las colonias transformadas fueron purificadas por medio de tres rondas de subcultivo para la selección de clonas transformantes y se realizó una extracción con el kit Zymo Pure™ Plasmid Miniprep kit obteniendo 150 ng de ADN con una relación 260/280 de 1.8 el cual es, por consenso, considerado puro.

Las clonas putativamente transformadas se caracterizaron mediante digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRI/BamHI*. Se obtuvo un fragmento de 5,348 pb correspondiente al corte con *EcoRI* y dos fragmentos de 3,124 y 2,224 pb correspondientes al corte con *EcoRI/BamHI* (Figura 17).

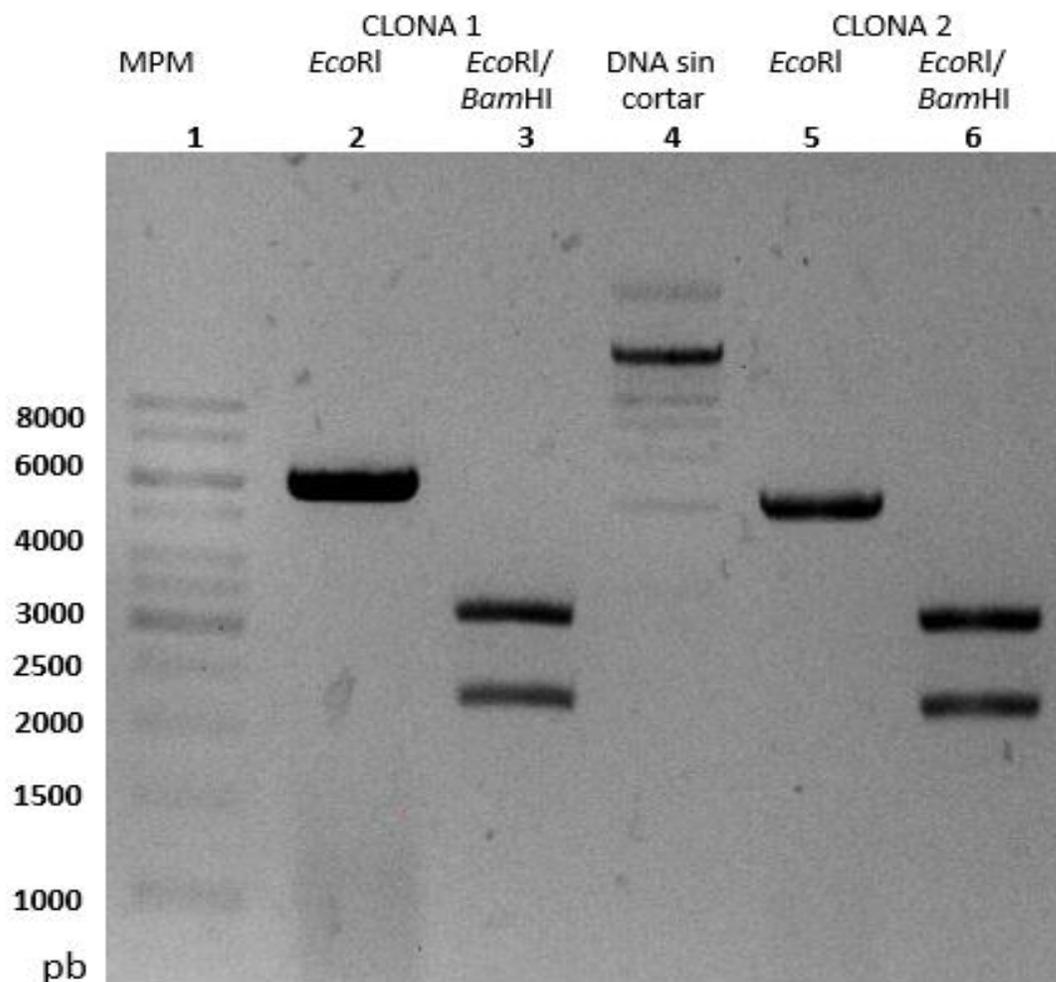


Figura 17. Caracterización del ADN plasmídico de pALH1 con enzimas de restricción. Agarosa 0.8%. Carril 1: MPM Genruler 1kb ladder (Sigma—Aldrich, USA). Carril 2: restricción con *EcoRI* clona 1 (5,348 pb). Carril 3: restricción con *EcoRI/BamHI* clona 1 (3,124 y 2,224 pb). Carril 4: ADN sin cortar. Carril 5: restricción con *EcoRI* clona 2 (5,348 pb). Carril 6: restricción con *EcoRI/BamHI* clona 2 (3,124 y 2,224 pb).

Además, los resultados de PCR mostraron un amplicón de 986 pb de la región codificante del transgén *Lac2* (Figura 18) lo que confirma la correcta integración del transgén *Lac2* en el vector pPICZαA®, además, de su integración en las células de *E. coli* BL21 (DE3).

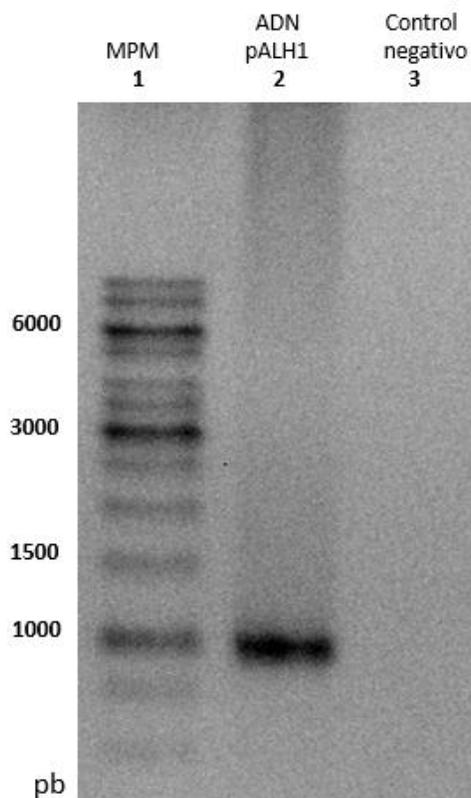


Figura 18. Caracterización del ADN plasmídico de pALH1 por PCR. Agarosa 0.8%. Amplificación de una región del gen *Lac2* con los primers Fw-5' GACATCAAGAGCGACTACTAC 3' Rv-5' GATGATGGGCTTGAGCTTCT 3'. Agarosa 0.8%. Carril 1: MPM Genruler 1kb ladder (Sigma—Aldrich, USA). Carril 2: producto de amplificación de aproximadamente 908 pb. Carril 3: control negativo con ADN de *E. coli* sin transformar.

9.6 Caracterización de clonas transformantes de *P. pastoris* X33 con el plásmido pALH1

Células de *P. pastoris* X33 fueron transformadas por electroporación con ADN del plásmido pALH1 (fusión del vector pPICZαA® y el transgén *Lac2* de *G. graminis* var *graminis*) obteniéndose colonias transformadas a las 96 h de incubación. Las colonias transformadas fueron purificadas por medio de tres rondas de subcultivo para la selección de clonas transformantes. Para confirmar una eficiente integración del gen en el genoma de la levadura, dado que sólo entre el 1 y 10% de las colonias contienen el gen de interés integrado en el genoma de *P. pastoris* (Cregg *et al.*, 2009), se realizó una extracción de ADN genómico y una amplificación con cebadores específicos para el gen *Lac2* y para una región del promotor y terminador de AOX1. De tres clonas que fueron aisladas, sólo en dos de ellas se obtuvo un producto de amplificación de 986 pb aproximadamente para la región específica del transgén *Lac2* (Figura 19); por otro lado, sólo en una de ellas se obtuvo un producto de amplificación de 2,616 pb aproximadamente correspondiente a la amplificación del fragmento del promotor, el gen y el fragmento del terminador AOX1 (Figura 20). Debido a esto solo esta última se identificó como clona positiva, es decir que contiene el transgén *Lac2* y que, además, está integrado de manera correcta en el locus AOX1 del genoma de *P. pastoris*. Esta clona fue denominada C3-pALH1-Pp (C3 corresponde al número de clona aislada; pALH1 corresponde al plásmido que contiene la clona y Pp se refiere a *P. pastoris*, el organismo que la expresa).

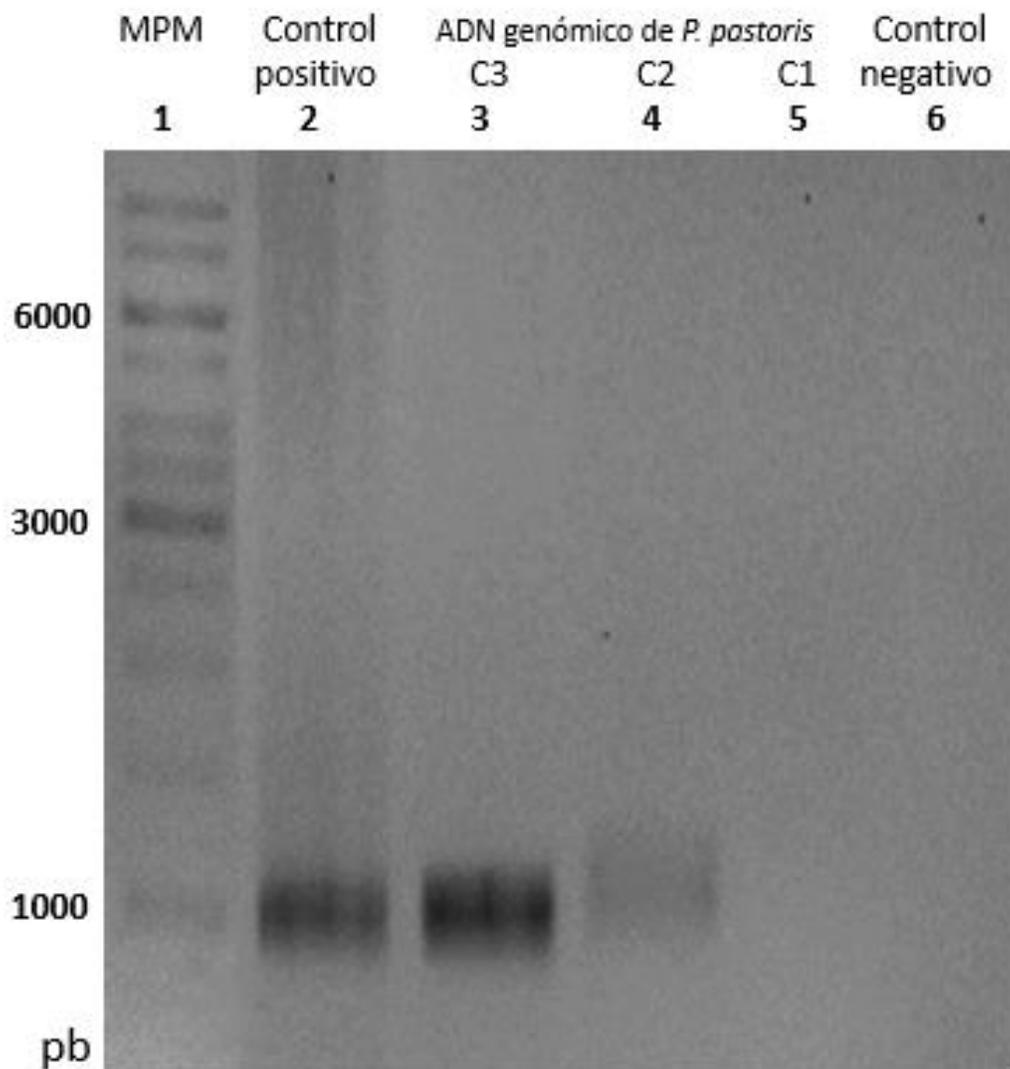


Figura 19. Caracterización del ADN genómico de *P. pastoris* para verificar la integración del transgén *Lac2*. Amplificación de una región del gen *Lac2* con los primers FW-5' GACATCAAGAGCGACTACTAC 3' FR-5' GATGATGGGCTTGAGCTTCT 3'. Carril 1: MPM Genruler 1kb ladder (Sigma—Aldrich, USA). Carril 2: control positivo ADN plasmídico de *E. coli* BL21(DE3) transformada con pALH1 (se muestra producto de amplificación 908 pb). Carril 3: ADN genómico clona 3 de *P. pastoris* transformada (se muestra el producto de amplificación 908 pb). Carril 4: ADN genómico clona 2 de *P. pastoris* transformada (se muestra el producto de amplificación 908 pb). Carril 5: : ADN genómico clona 1 de *P. pastoris* transformada (sin producto de amplificación). Carril 6: control negativo ADN de *P. pastoris* sin transformar.

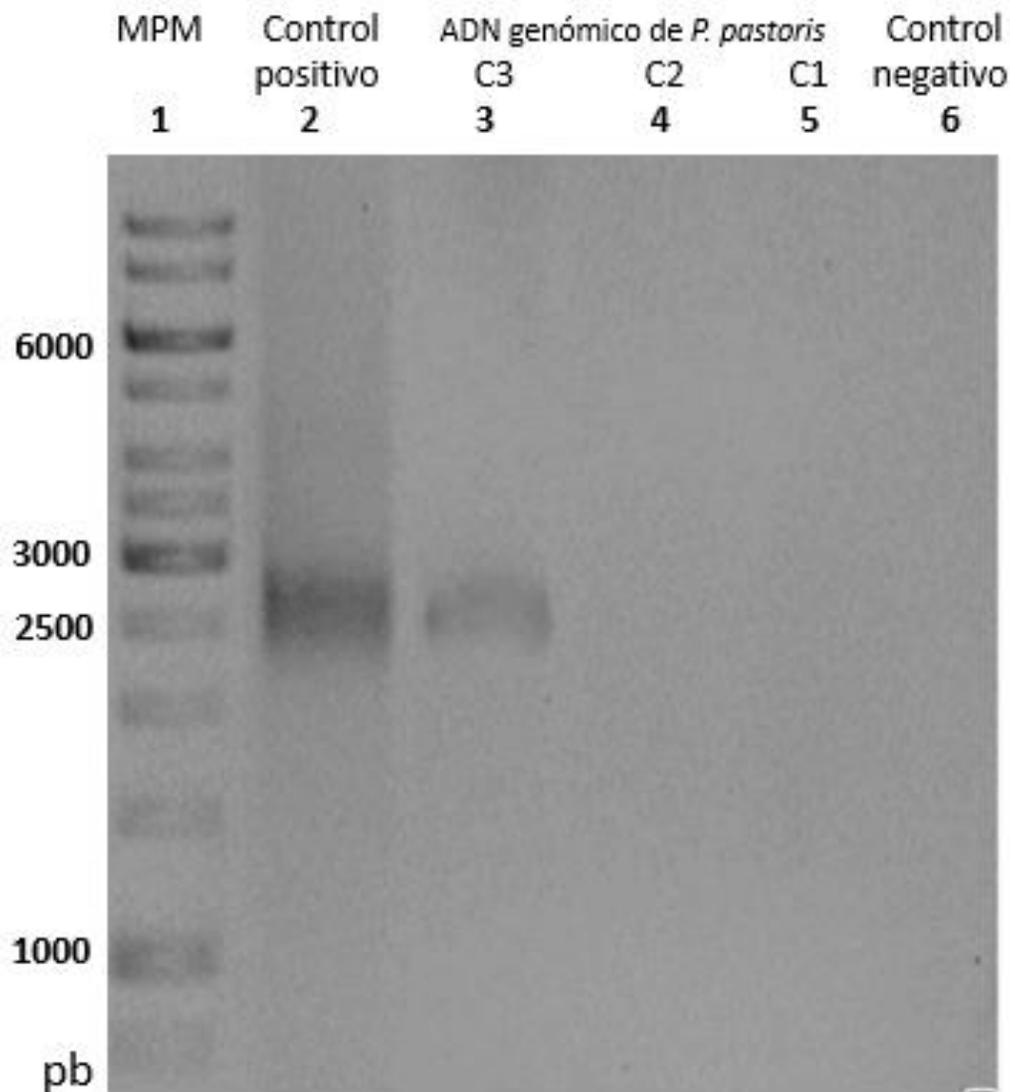


Figura 20. Caracterización del ADN genómico de *P. pastoris* para verificar la integración del transgén *Lac2* en el promotor *AOX1*. Agarosa 0.8% Amplificación del gen *Lac2* que incluye una región del promotor y terminador *AOX1* con los primers Fw-5' TCTATCGCTTCTGAACCCCG 3' Rv-5' GAAGCCTGCATCTCTCAGG 3'. Carril 1: MPM Genruler 1kb ladder (Sigma—Aldrich, USA). Carril 2: control positivo ADN plasmídico de *E. coli* BL21(DE3) transformada con pALH1 (se muestra producto de amplificación 2,616 pb). Carril 3: ADN genómico clona 3 de *P. pastoris* transformada (se muestra el producto de amplificación 2,616 pb). Carril 4: ADN genómico clona 2 de *P. pastoris* transformada (sin producto de amplificación). Carril 5: : ADN genómico clona 1 de *P. pastoris* transformada (sin producto de amplificación). Carril 6: control negativo ADN de *P. pastoris* sin transformar.

9.7 Cuantificación y análisis SDS-PAGE de proteínas totales en *E. coli* BL21(DE3)

Posterior a la transformación y caracterización de C2-pMBO2-Ec que contiene el transgén *Lac2*, se cultivó en medio LB para la inducción de proteínas; pasadas 24 h de inducción con IPTG, se recuperaron las proteínas solubles e insolubles y se cuantificaron por el método de Biuret mediante espectroscopia a 540 nm. La concentración de proteínas totales de la cepa transformada y un control negativo del extracto proteico de una colonia de BL21 (DE3) sin transformar se obtuvieron por la sustitución de los valores obtenidos en el análisis espectrofotométrico en una curva patrón de Albumina de Suero Bovino. Se obtuvieron valores de 10.64 ± 1.83 mg/mL de proteínas solubles y 5.31 ± 0.63 mg/mL de proteínas insolubles para la cepa transformada con *Lac2*, mientras que para la cepa no transformada se obtuvieron valores de 4.91 ± 2.87 mg/mL de proteínas solubles y 2.87 ± 2.52 mg/mL de proteínas insolubles.

Se analizaron los extractos de proteínas solubles e insolubles de la clona inducida para buscar la proteína de interés mediante un análisis SDS-PAGE (12%) (Figura 21); el análisis permitió visualizar en el carril dos una banda de aproximadamente 73 kDa que corresponde al control positivo, una lacasa comercial de *Trametes versicolor*. Asimismo, en el carril cuatro y cinco se observa el patrón de las proteínas insolubles y solubles, respectivamente, obtenidas de C2-pMBO2-Ec, en donde el patrón de las proteínas solubles muestra una banda notoria en los aproximadamente 64 kDa, que corresponden al peso teórico de la lacasa codificada por el transgén *Lac2* obtenido de SMS (https://www.bioinformatics.org.sms2/protein_mw.html). La ausencia de la proteína de interés en el extracto de proteínas insoluble recuperado de *E. coli* BL21 (DE3) puede deberse principalmente a que el uso de urea en condiciones extremas de desnaturalización que son necesarias para solubilizar las proteínas contenidas en los cuerpos de inclusión, puede conducir a una degradación proteolítica (Falconer *et al.*, 1998).

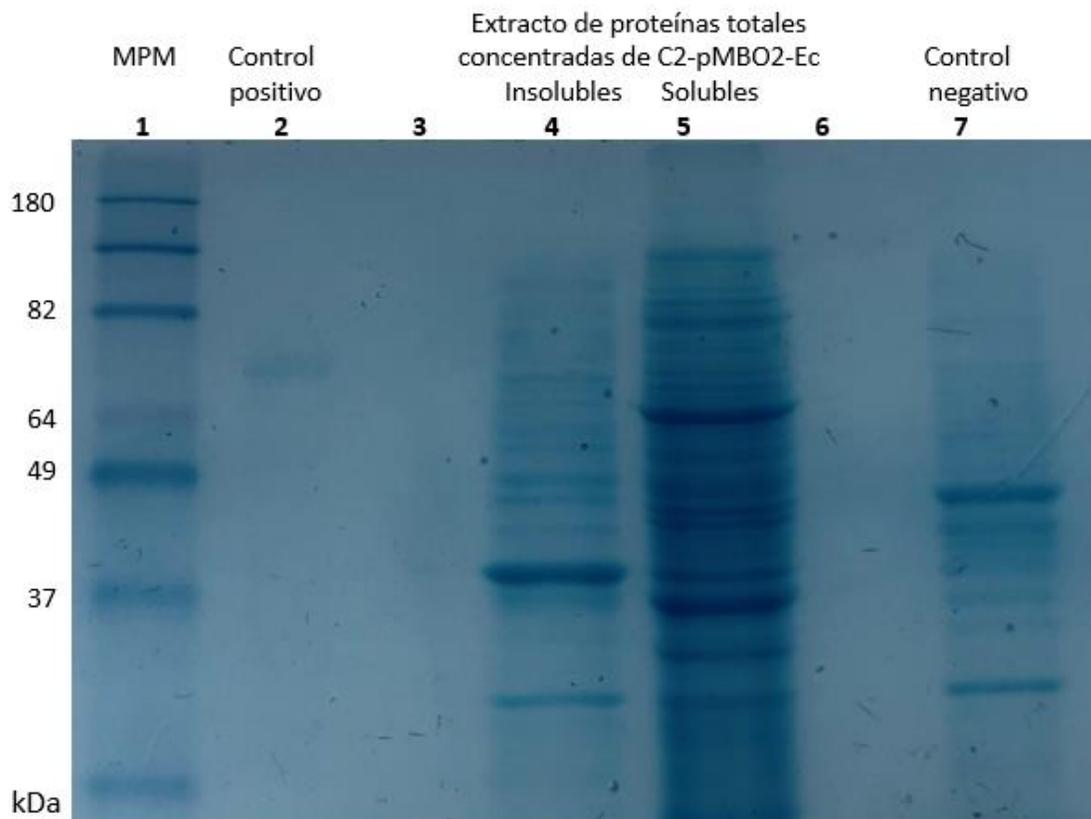


Figura 21. Análisis SDS-PAGE de las proteínas de *E. coli* BL21(DE3). Carril 1: MPM BenchMark pre-stained protein ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA). Carril 2: Control positivo de la enzima lacasa de *Trametes versicolor* de aprox. 73 kDa. Carril 4: Extracto de proteínas insolubles de la inducción de C2-pMBO2-Ec. Carril 5: Extracto de proteínas solubles de la inducción de C2-pMBO2-Ec. Carril 7: Control negativo proteínas de *E. coli* sin transformar.

9.8 Cuantificación y análisis SDS-PAGE de proteínas totales en *P. pastoris* X33

Posterior a la transformación y caracterización de C3-pALH1-Pp que contiene el transgén *Lac2*, se cultivó en medio BMMY para la inducción de proteínas; pasadas 96 h de inducción con metanol, se recuperaron las proteínas y se cuantificaron por el método de Biuret mediante espectroscopia a 540 nm. La concentración de proteínas totales de la cepa transformada y un control negativo del extracto proteico de una colonia de *P. pastoris* X33 sin transformar se obtuvieron por la sustitución de los valores obtenidos en el análisis espectrofotométrico en una curva patrón de albumina. Los valores obtenidos fueron 27.99 ± 0.85 mg/mL de proteínas totales en la cepa transformada con *Lac2* y 13.49 ± 1.15 mg/mL de proteínas totales en la cepa no transformada.

Se analizaron el extracto de proteínas de la clona inducida para buscar la proteína de interés mediante un análisis SDS-PAGE (12%) (Figura 22); el análisis permitió visualizar en el carril tres una banda de aproximadamente 73 kDa que corresponde al control positivo, una lacasa comercial de *Trametes versicolor*. Asimismo, en el carril cinco, seis y siete se observa el patrón de las proteínas obtenidas de C3-pALH1-Pp en donde se muestra una banda notoria en los aproximadamente 73 kD, que no corresponden al peso teórico de la lacasa codificada por el transgén *Lac2* (64 kDa) obtenido de SMS (https://www.bioinformatics.org.sms2/protein_mw.html) debido a que, asumiendo que *P. pastoris* realiza *N*-glicosilación adicionando residuos de manosa mediante enlaces de tipo α -1,6 o α -1,3 extendidos hasta obtener una forma hipermanosilada $(\text{Man})_{9-14}(\text{GlcNAc})_2$ (Serrano *et al.*, 2016), ocasiona que el peso molecular de las lacasas pueda aumentar de 10 a 45%, debido a dicha glicosilación (Agrawal *et al.*, 2018), por lo que es posible considerar que los fragmentos observados en el gel corresponden aparentemente a la proteína lacasa hipermanosilada.

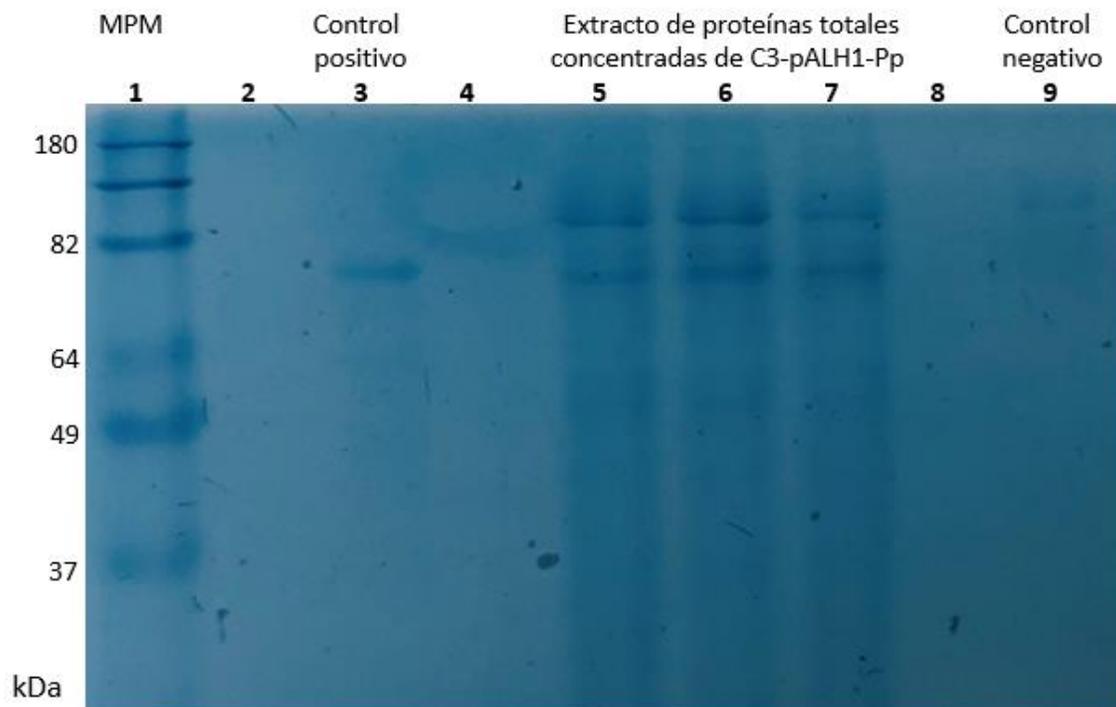


Figura 22. Análisis SDS-PAGE de las proteínas de *P. pastoris* X33. Carril 1: MPM BenchMark pre-stained protein ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA). Carril 3: Control positivo de la enzima lacasa de *Trametes versicolor* de aprox. 73 kDa. Carril 5-7: Extracto de proteínas totales de la inducción de C3-pALH1-Pp. Carril 9: Control negativo proteínas de *P. pastoris* sin transformar.

Para identificar los sitios de glicosilación en la secuencia del transgén *Lac2* que codifica a lacasa, se hizo uso del software en línea NetNGlyc 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>), el cual detectó siete sitios con potencial de N-glicosilación (ASN-X-SER/THR); ASN⁹⁵, ASN¹²⁴, ASN²⁴⁶, ASN²⁸¹, ASN⁴¹⁰, ASN⁴²⁰ Y ASN⁴²⁹ (Figura 23). Dentro de estos, ASN²⁴⁶, ASN⁴¹⁰ Y ASN⁴²⁰ se indicaron como sitios de bajo potencial de glicosilación debido a que se encuentran muy cerca del umbral predeterminado de 0.5, además ASN⁴²⁰ tiene una prolina justo después lo que hace poco probable que este glicosilada debido a limitaciones de conformación.

MVAHHSFTLLSLAALALGSPGLGELQQRAEPRIQQRATCAGNTATTRSQWCDFDIKSDYYTGQHPNTGVTREFWLELTDV 80
 KLAPDGVPRYVQAFNGTVPGPTLVMDWGDVVIHVTNKLTSINGT SVHWHGLHQKDTVLSDGVVSVTQCPSPVPGTTQTY 160
 KFKATNYGSSWYHSHFALQAWQGVFGGIIINGPASANYDEDVGMVVLSDWGHKTPDELWHQAESQGPPTLENALINGMNV 240
 YGAEGNQTGKRWETSFEAGKSYRFRIVNTAIDTHFKFGIDNHTLVIALDFIPVEPYETTMVNI GMGQRVDVIVKADQAA 320
 VASDFWLR AIPQSACGTIEMAKNTRAI VHYGNSQGV PSTTGHTYVDACEDEPLEKLP IIRIDAEQSTYEQ LKIATAGVN 400
 GNGVFRWYLNSTTMELDWSNPTVSQLASNATVAFSNSNAVMELPEADKWAYVI IQTDFGVAHP IHLHGHDYSVLAQGS GA 480
 YQPGVTKLITTNPMRRDTAILPAAGHLVLA FKTDNPGAWLMHCHIGWHTAQGFAMQFVERRSEMFSKNI INNNDIEGLCE 560
 PWRTHVGKHNKLEDSGI

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	95 NGTV	0.7616	(9/9)	+++
Sequence	124 NGTS	0.7638	(9/9)	+++
Sequence	246 NQTG	0.5340	(5/9)	+
Sequence	281 NHTL	0.7643	(9/9)	+++
Sequence	410 NSTT	0.6079	(8/9)	+
Sequence	420 NPTV	0.6111	(8/9)	+
Sequence	429 NATV	0.6568	(9/9)	++

WARNING: PRO-X1.

Figura 23. Determinación de los sitios de glicosilación de la proteína Lac2 con NetNGlyc. Las secuencias ASN-X-SER/THR (incluyendo ASN-PRO-SER/THR) se muestran resaltados en azul. Las asparaginas (ASN) identificadas para N-glicosilación, se muestran en rojo. La puntuación “Threshold=0.5” es la salida promedio de nueve redes neuronales: la columna del jurado indica cuantas de las nueve redes apoyan la predicción. Las salidas para predicciones de la columna N-Glyc indican: (+) potencial > 0.5, (++) potencial > 0.75 y acuerdo del jurado, (+++) potencial > 0.75 y acuerdo del jurado. La advertencia Pro-X1 indica que hay una prolina justo después de la asparagina lo que hace muy poco probable la glicosilación debido a limitaciones conformacionales.

Con el fin de identificar que verdaderamente la proteína expresada por *P. pastoris* se encuentra glicosilada, se realizó una tinción de glicanos con el kit Glycoprotein Detection Kit® (Sigma—Aldrich, USA) para la identificación de glicoproteínas en SDS-PAGE (Figura 24) el cual se basa en la técnica de PAS para la tinción de estructuras que contengan una alta proporción de macromoléculas de hidratos de carbono; el ácido Peryódico de Schiff oxida los grupos oxhidrilo (-OH) de dos carbonos cercanos formando grupos aldehídos que reaccionan dando un color rojo/rosa intenso (Yamabayashi, 1987); el análisis permitió visualizar en el carril número tres una banda de aproximadamente 73 kDa, correspondiente al control positivo, una lacasa comercial de *Trametes versicolor*. Asimismo, en el carril cinco se observa el extracto de proteínas obtenidas de *P. pastoris* X33, en donde se muestra una banda notoria en los aproximadamente 73 kD, lo que nos indica que se trata de

una glicoproteína en contraste con el carril número siete en el que se colocó el extracto de proteínas solubles de *E. coli* BL21 (DE3) donde no se observa ninguna banda debido a la ausencia de glicosilaciones.

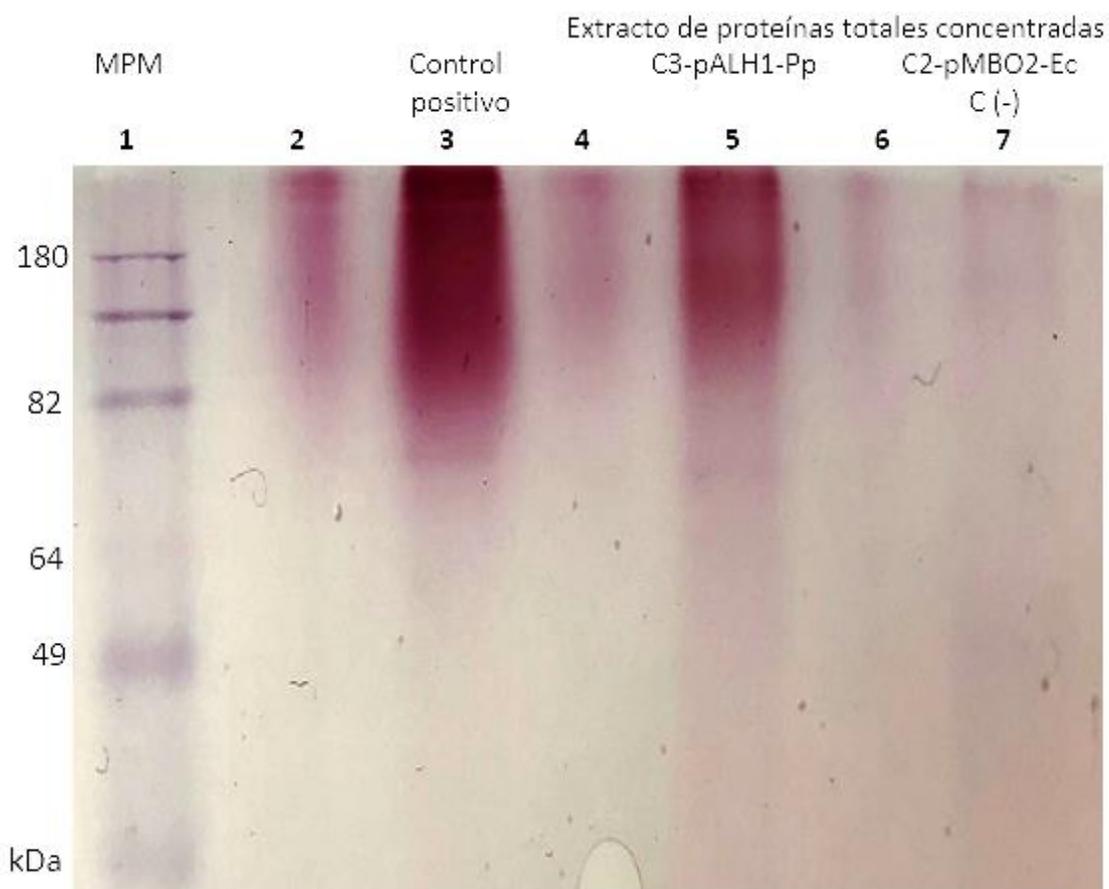


Figura 24. Identificación de glicoproteínas en SDS-PAGE. Se empleó Glycoprotein Detection Kit® (Sigma—Aldrich, USA). Carril 1: MPM BenchMark pre-stained protein ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA). Carril 3: Control positivo de la enzima lacasa de *Trametes versicolor* de aprox. 73 kDa. Carril 5: Extracto de proteínas totales de C3-pALH1-Pp (73 kDa). Carril 7: Control negativo extracto de proteínas solubles de C2-pMBO2-Ec.

9.9 Análisis enzimático de eLac2 y pLac2 recombinante

La determinación de la actividad enzimática preliminar de Lac2 recombinante se realizó en condiciones de ensayo estándar con solución tampón 0.1 M pH 5.0 a

temperatura ambiente durante 1 h. La actividad enzimática de Lac2 recombinante expresada en *E. coli* BL21(DE3), el cual denominaremos eLac2 (e corresponde al organismo en el que se expresa, *E. coli*, mientras que Lac2 corresponde a la lacasa expresada), mostro que las proteínas insolubles carecían de actividad enzimática, mientras que las proteínas solubles presentaron una actividad enzimática de 27.98 ± 0.56 U/mg, confirmando los resultados obtenidos en el SDS-PAGE, donde no se observó una banda notoria correspondiente al peso molecular de la enzima en las proteínas insolubles (Figura 21). Por esta razón, los ensayos para determinar el efecto de pH, temperatura y los iones metálicos en la actividad enzimática se realizaron con las proteínas solubles. Por otro lado, la actividad enzimática de Lac2 recombinante expresada en *P. pastoris*, el cual denominaremos pLac2 (p corresponde al organismo en el que se expresa, *P. pastoris*, mientras que Lac2 corresponde a la lacasa expresada), fue de 130.98 ± 2.58 U/mg.

9.9.1 Efecto del pH en la actividad enzimática

Para la determinación del efecto del pH se evaluó la actividad enzimática en un rango de pH de 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0 utilizando condiciones de ensayo estándar con cada una de las soluciones tampón de acetato 0.1 M a temperatura ambiente durante 1 h. El análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) para determinar el efecto del pH sobre la actividad enzimática estimó una $p < 0.5$, indicando que el pH tiene efecto sobre la actividad enzimática de Lac2 recombinante.

En el análisis de eLac2 se observó un aumento en la actividad de Lac2 desde pH 3.0 (17.64 ± 1.30 U/mg) a pH 4.5 (24.22 ± 7.07 U/mg), hasta llegar a su máximo en pH 5.0 (28.90 ± 6.10 U/mg) y disminuyó considerablemente a pH 6.0 (1.11 ± 0.35 U/mg). Por otro lado, en el análisis de pLac2 se observó que a pH 3.0 la actividad enzimática fue casi nula (0.077 ± 2.40 U/mg), en pH 3.5 (33.46 ± 3.97 U/mg) y 4.0 (111.96 ± 3.02 U/mg) aumento drásticamente y disminuyó a pH 4.5 (109.48 ± 2.85 U/mg) para volver a aumentar hasta llegar a su máxima actividad en pH 5.5 ($164.13 \pm$

3.81 U/mg); a partir de aquí a pH 6.0 (112.80 ± 3.74 U/mg) y 7.0 (4.53 ± 3.0) la actividad enzimática volvió a disminuir.

En la Figura 25 se muestra el efecto del pH en la actividad enzimática de eLac2 y pLac2, expresada como actividad relativa en porcentaje con respecto a la máxima actividad, considerada como 100%. Se realizó un análisis de comparación de medias con el método de Tukey al 95% de confianza, determinando el pH 5.0 y 5.5 como el óptimo para eLac2 y pLac2, respectivamente, al ser significativamente diferente y presentar la mayor actividad enzimática.

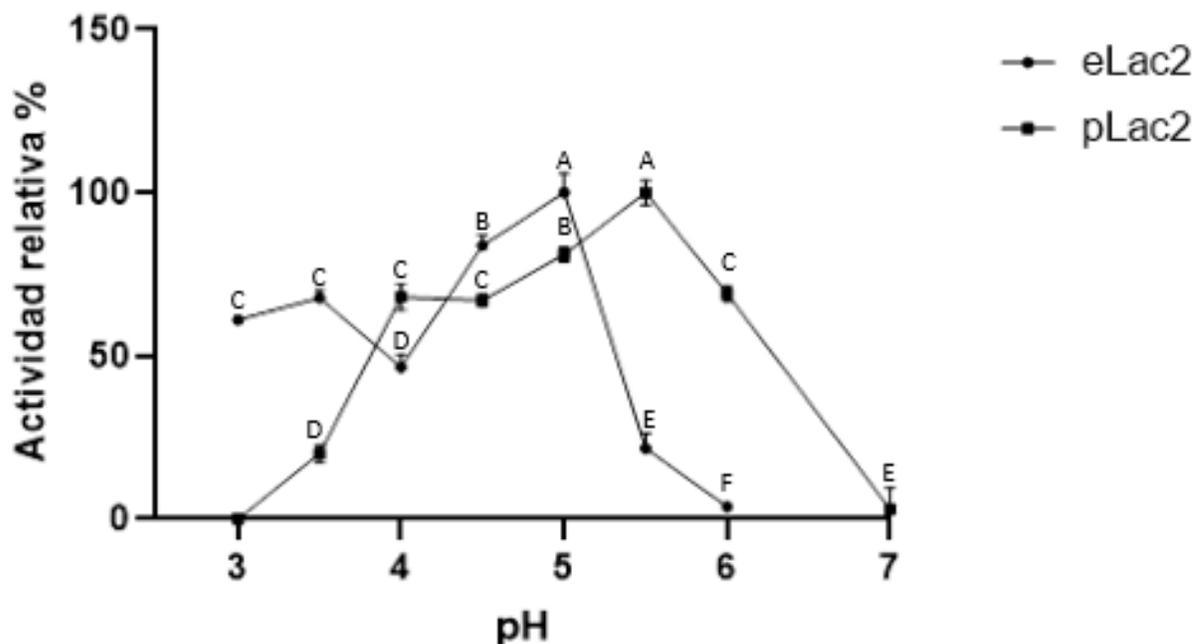


Figura 25. Efectos del pH en la actividad enzimática de la proteína Lac2. El pH óptimo fue determinado en un rango de pH de 3.0 a 6.0 a temperatura ambiente. El eje Y presenta la actividad enzimática expresada como actividad relativa en porcentaje con respecto a la máxima actividad, considerada como 100%. Las letras por encima de cada punto representan la agrupación generada mediante el análisis de medias por el método de Tukey. En eLac2: (A) pH 5.0, (B) pH 4.5, (C) pH 3.0 y 3.5, (D) pH 4.0 (E) pH 5.5 y (F) pH 6.0. En pLac2: (A) pH 5.5, (B) pH 5.0, (C) pH 4.0, 4.5 y 6.0, (D) pH 3.5 y (E) pH 7.0. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

En el reporte de Vite *et al.* (2009) en donde se analizó el rol de la *N*-glicosilación en la actividad enzimática de la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*, entre la forma nativa y *N*-deglicosilada, se observó un aumento de la oxidación de ABTS a pH por debajo de 6.0 al eliminar los *N*-glicanos coincidiendo con nuestros resultados, dado que eLac2 carece de glicosilaciones. En el modelo de Lac2, el sitio T1 está rodeado por residuos no polares, en la posición 272 se encuentra un residuo de ácido aspártico (ASP²⁷²) equivalente a ASP²²⁶ de la lacasa de *Trametes versicolor* en la cual se observó que estabiliza los sustratos mediante interacciones de puentes de hidrogeno con His⁴⁷⁸ (Brown *et al.*, 2002). Dado que Asp²⁷² se encuentra nueve aminoácidos río arriba de Asn²⁸¹, uno de los sitios potenciales de glicosilación detectados mediante NetNGlyc 1.0, se sugiere que la falta de *N*-glicanos podría resultar en una modificación de la exposición de Aps²⁷² a los cambios de pH, lo que podría desencadenar un cambio en el estado de protonación del grupo carboxilo en el extremo lateral del residuo y generar un cambio en el pH óptimo (Vite Vallejo *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2019).

El pH de la mayoría de las lacasas fúngicas varía dentro del rango 3.0-5.0 (Ma *et al.*, 2019), por lo cual ambos pH se encuentran dentro del rango establecido. En contraste, el resultado obtenido es similar a lo reportado para otras lacasas; para Stlac2 de *Setosphaeria turcica* se reporta un pH óptimo de 4.5 (Liu *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2018); LacSM de *Sordaria macrospora* presenta un pH óptimo de 5.0 (Yang *et al.*, 2020); lac de *Cyathus bulleri* un pH óptimo de 4.5 (Garg *et al.*, 2008); en el caso de Mrl2 de *Moniliophthora roreri* se reporta 4.0 como el pH óptimo (Bronikowski *et al.*, 2017); y Tplac de *Trametes pubescens* presenta un pH óptimo de 5.0 (Jönsson *et al.*, 1997).

9.9.2 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

La evaluación del efecto de la temperatura se determinó incubando la mezcla de reacción durante 1 h a temperaturas de 30, 45, 60, 75 y 90 °C con tampón de acetato 0.1 M pH 5.0. El análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática estimó una $p < 0.5$, indicando que está tiene efecto sobre la actividad enzimática de Lac2 recombinante.

En el análisis de eLac2 se observó un aumento en la actividad de Lac2 desde 30 °C (30.92 ± 2.15 U/mg), 45 °C (34.31 ± 3.39 U/mg) hasta alcanzar su máxima actividad en 60 °C (66.73 ± 3.47 U/mg), posteriormente comenzó a disminuir en 75 °C (59.71 ± 5.78 U/mg) y 90 °C (58.14 ± 0.73 U/mg). Por otro lado, en pLac2 la actividad enzimática aumentó drásticamente de 25 °C (80.42 ± 3.44 U/mg) a 30 °C (165.29 ± 5.59 U/mg), siendo esta la actividad enzimática más alta reportada; disminuyó un poco a 35 °C (99.04 ± 5.07 U/mg) y 40 °C (98.873 ± 1.41 U/mg) para tener un aumento a 45 °C (130.64 ± 7.14 U/mg) sin alcanzar la actividad máxima y descender en 60 °C (20.48 ± 7.64 U/mg).

En la figura 26 se muestra el efecto de la temperatura en la actividad enzimática del extracto proteico de eLac2 y pLac2 expresada como actividad relativa en porcentaje con respecto a la máxima actividad, considerada como 100%. Se realizó un análisis de comparación de medias con el método de Tukey al 95% de confianza determinando 60 °C y 30 °C como la temperatura óptima para eLac2 y pLac2, respectivamente, al ser significativamente diferente a las demás y presentar la mayor actividad enzimática.

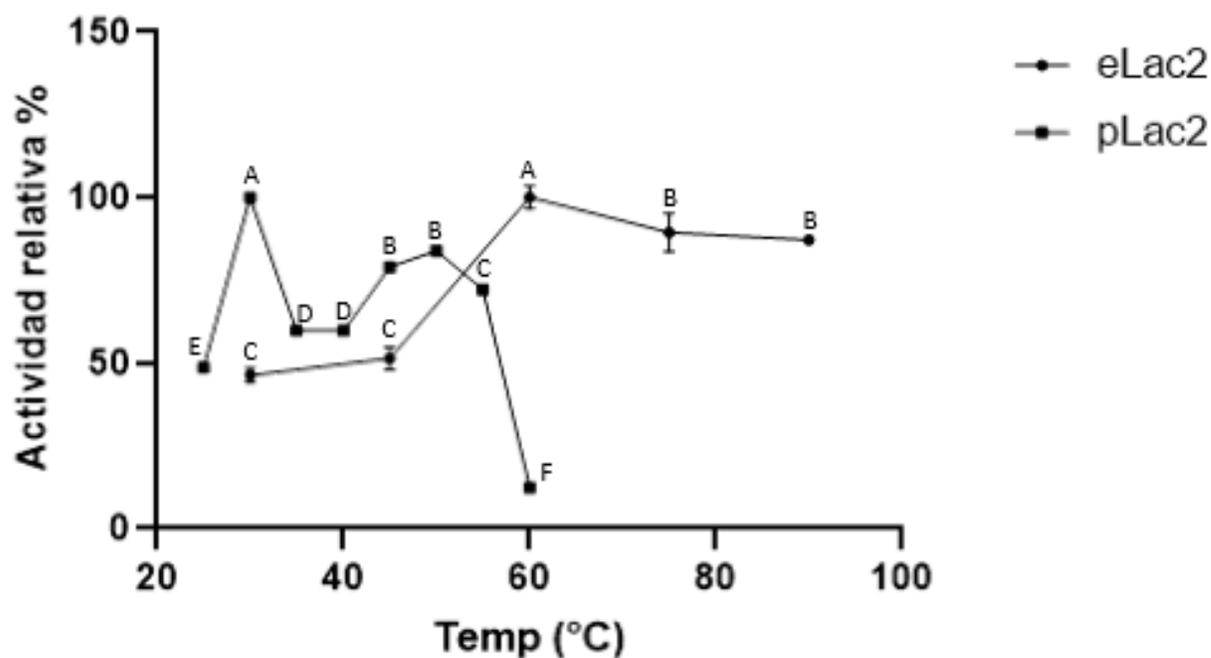


Figura 26. Efectos de la temperatura en la actividad enzimática de la proteína Lac2. La temperatura óptima fue determinada en un rango de 25 a 90 °C. El eje Y presenta la actividad enzimática expresada como actividad relativa en porcentaje con respecto a la máxima actividad, considerada como 100%. Las letras por encima de cada punto representan la agrupación generada mediante el análisis de medias por el método de Tukey. En eLac2: (A) 60 °C, (B) 75 y 90 °C y (C) 30 y 45 °C. En pLac2: (A) 30 °C, (B) 45 y 50 °C, (C) 55 °C, (D) 35 y 40 °C, (E) 25 °C y (F) 60 °C. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

Xu *et al.* (2019) analizaron el rol de la N-glicosilación en la actividad específica de la lacasa Lcc9 de *Coprinopsis cinérea* y observaron que cuando se eliminan los N-glicanos se reduce la actividad de oxidación del sustrato a bajas temperaturas de la misma manera que sucede con eLac2. Se tiene la teoría de que la presencia de N-glicosilación tiene un efecto protector (Xu *et al.*, 2019), más evidente a altas temperaturas. Entre los resultados de temperatura óptima para otras lacasas encontramos que la temperatura óptima de Stlac2 y Stlac4 de *Setosphaeria turcica* se reportó como 60 °C (Liu *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2018); mientras que para lac de *Pleurotus sp.*, 65 °C (More *et al.*, 2011); en comparación, Mrl2 de *Moniliophthora roreri* exhibió una temperatura optima muy extensa de 60-90 °C (Bronikowski *et al.*, 2017),

mientras que en lac-2 de *Pleorotus ostreatus* (Palmieri *et al.*, 1997) y lac4 de *Pleorotus sajor-caju* (Soden *et al.*, 2002) fue de 50 y 35 °C.

9.9.3 Efecto de iones metálicos en la actividad enzimática

Los efectos de los iones metálicos divalentes (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) sobre la actividad enzimática se determinaron mediante la adición de NaCl , MgCl_2 , CaCl_2 , MnSO_4 , CuSO_4 y $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ a una concentración final de 10 mM a la mezcla de reacción con tampón de acetato 0.1 M incubada a pH y temperatura óptimas durante 1 h. El análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) para determinar el efecto de los iones metálicos sobre la actividad enzimática estimó una $p < 0.5$, indicando que están teniendo efecto sobre la actividad enzimática de Lac2 recombinante.

Se observó un aumento en la actividad de Lac2 en presencia del ion Fe^{3+} (122.71 ± 2.81 U/mg para eLac2 y 356.81 ± 0.40 U/mg para pLac2) y Cu^{2+} (108.89 ± 2.90 U/mg para eLac2 y 268.42 ± 0.11 U/mg para pLac2) en ambos sistemas, en comparación con el control al que no fue adicionado el ion (66.73 ± 3.47 U/mg para eLac2 y 165.29 ± 0.11 U/mg para pLac2). En la figura 27 se muestra la actividad enzimática de eLac2 y pLac2 expresada como actividad relativa en porcentaje con respecto a la actividad del control sin ion, considerada como 100%. Se realizó un análisis de comparación de medias con el método de Dunnett al 95% de confianza tomando como control la muestra sin ion, encontrando que Fe^{3+} y Cu^{2+} son significativamente diferentes al control sin ion (100%), aumentando la actividad enzimática a 183.89 y 163.18%, respectivamente en eLac2 y a 162.39 y 215.87% en pLac2.

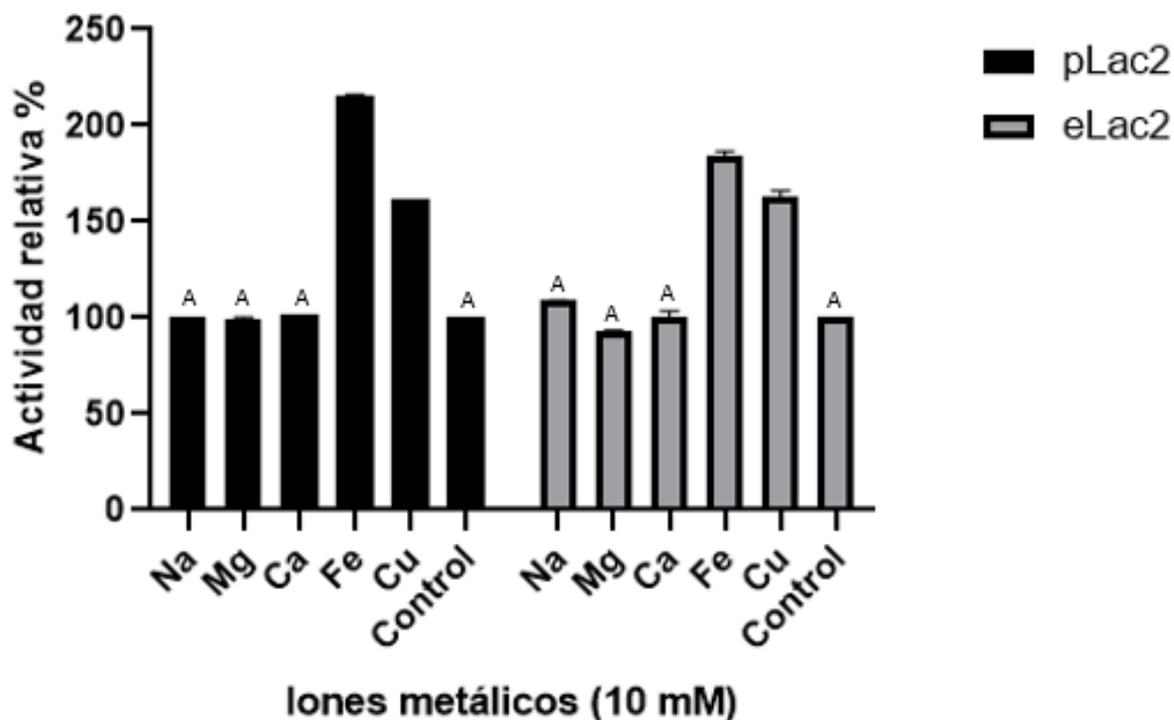


Figura 27. Efectos de los iones metálicos en la actividad enzimática de la proteína Lac2. Concentración 5.0 mM de iones metálicos (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} y Cu^{2+}). El eje Y presenta la actividad enzimática expresada como actividad relativa en porcentaje con respecto a la actividad de la enzima sin ión, considerada como 100%. Las letras por encima de cada punto representan la agrupación generada mediante el análisis de medias por el método de Dunnet con la actividad de la enzima sin ión como control. Las barras sin letra son significativamente diferentes al control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

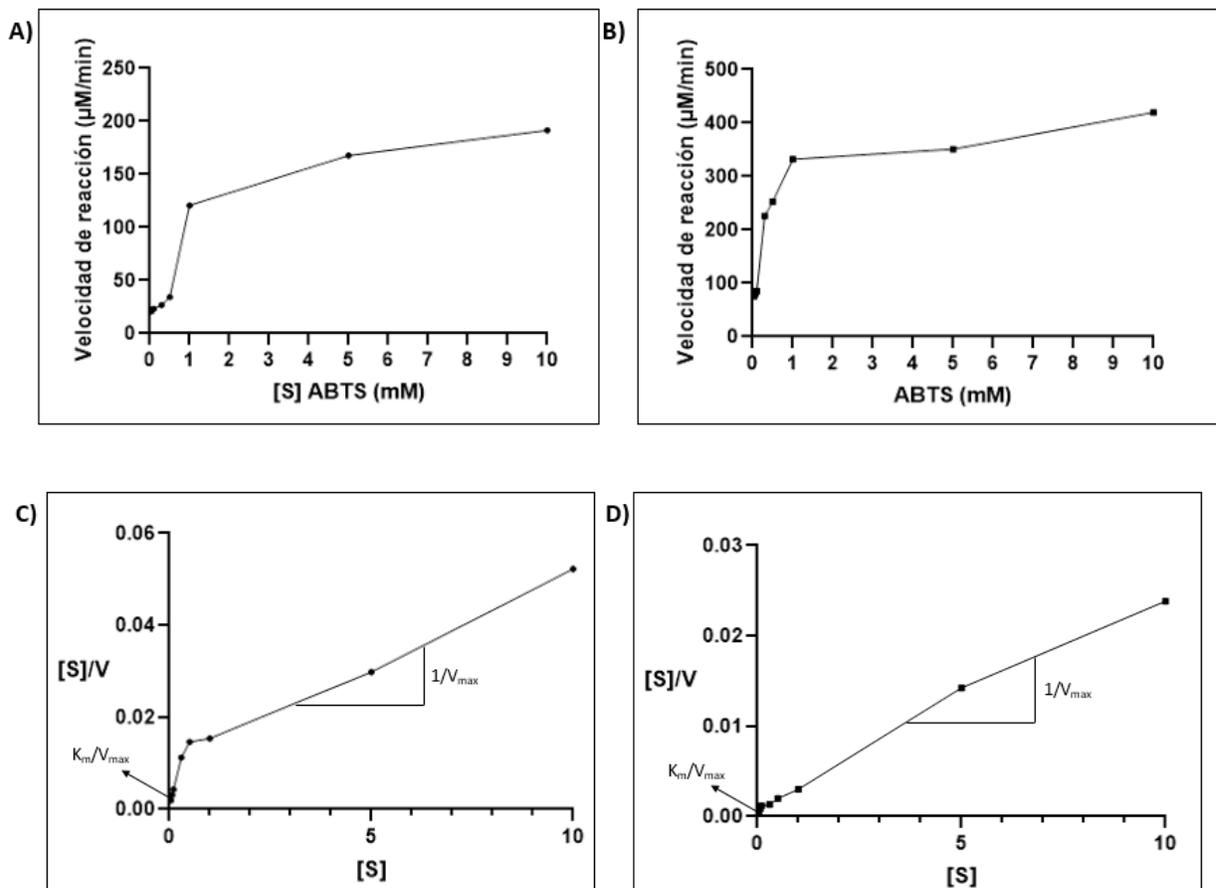
Esto es similar a lo reportado para *Stlac2* y *Stlac4* de *Setosphaeria turcica* para el ion Fe^{3+} 5.0 mM incrementa la actividad enzimática a 217.4% y 241.3%; por el contrario, difiere con lo reportado para el ion Cu^{2+} , que en el caso de *Stlac2* no hubo diferencias significativas con el control y en *Stlac4* fue mucho mayor a lo observado en Lac2 siendo su actividad mayor a 200% (Liu *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2018). Por otro lado, se reporta un aumento de la actividad enzimática de LacSM de *Sordaria macrospora* en adición de 1 mM de Na^+ a 104% (Yang *et al.*, 2020), mientras que en Lac2 no se observó diferencia significativa alguna en comparación al control sin ion.

Existe una teoría que se propone para explicar los efectos de los metales respecto a la actividad de las lacasas que nos dice que la unión de los iones metálicos Fe^{3+} y Cu^{2+} induce una modificación conformacional en la enzima que estimula la descomposición del complejo formado por sustrato-enzima-ion, como lo demuestra el modelo de inhibición no competitivo (Si *et al.*, 2013).

9.9.4 Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max}

Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se determinaron utilizando diferentes concentraciones de ABTS 0.01, 0.04, 0.07, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 5.0 y 10 mM que fueron añadidos a la mezcla de reacción con tampón de acetato 0.1 M pH incubada a pH y temperatura óptimos, midiendo la absorbancia cada minuto durante 5 minutos.

Los resultados se muestran en el gráfico de Michaelis-Menten (Figura 28A y 28B), el cual describe el cambio sufrido por la velocidad de reacción de la enzima al variar la concentración del sustrato. La velocidad de reacción indica el número de moléculas de sustrato que se convierten en producto por minuto (Rincón, 2011). Podemos observar cómo conforme aumenta la concentración de sustrato la enzima se va acercando a la velocidad máxima, pero nunca la alcanza y por esta razón no existe una concentración de sustrato específica para V_{max} (Salony *et al.*, 2008). Sin embargo, la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima ($V_{max}/2$) es igual a la K_m que establece la afinidad entre una enzima y su sustrato (Tominaga *et al.*, 2004). El gráfico de linearización por el método de Hanes-Woolf (Figura 28C y 28D) permitió identificar los datos de las constantes cinéticas K_m y V_{max} , el punto de corte con el eje Y es el equivalente a K_m/V_{max} , la pendiente de la recta es equivalente a $1/V_{max}$ y el corte con el eje X es el valor de $-K_m$.



Parámetros cinéticos	eLac2	pLac2
K_m (μM)	0.038	0.29
V_{max} (μM/min)	34.60	416.66

Figura 28. Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la proteína Lac2. A) y B) Gráfico de Michaelis-Menten C) y D) Gráfico de linearización por el método de Hanes-Woolf. La K_m y V_{max} calculadas se muestran tabulados en la parte inferior. K_m = constante de Michaelis, V_{max} = velocidad máxima de la reacción.

El valor de K_m obtenida fue de 0.038 μM y la V_{max} de 34.60 μM/min para eLac2 y una K_m 0.29 μM y la V_{max} de 416.66 μM/min para pLac2. Se puede observar que eLac2 presenta una mayor afinidad por ABTS; se propone que este efecto puede deberse,

como en el caso de la lacasa de *Trametes versicolor*, a que la estructura hipermanosilada de la lacasa disminuye la afinidad por el sustrato porque la adición de cadenas largas de glucano al esqueleto de la proteína puede alterar su estructura y, en consecuencia, su función (Jönsson *et al.*, 1997).

Las lacasas, ya sean de origen fúngico o bacteriano, presentan un amplio rango y pueden diferir frente al mismo sustrato (Gochev y Krastanov, 2007); en contraste, si comparamos el resultado obtenido con lo reportado para *fmB-rL103* de *Bacillus valismortis* K_m 35.79 μ M (Sun *et al.*, 2017) y *LacSM* de *S. macrospora* K_m 58.45 μ M (Yang *et al.*, 2020) observamos que Lac2 recombinante presenta una mayor afinidad por ABTS, sin embargo, al tratarse de una enzima no purificada, sugiere que se habla de una K_m aparente, pues la naturaleza de los otros componentes del extracto proteico es incierta y pueden interferir de manera positiva o negativa en la actividad enzimática.

9.10 Decoloración de verde de malaquita por Lac2 recombinante

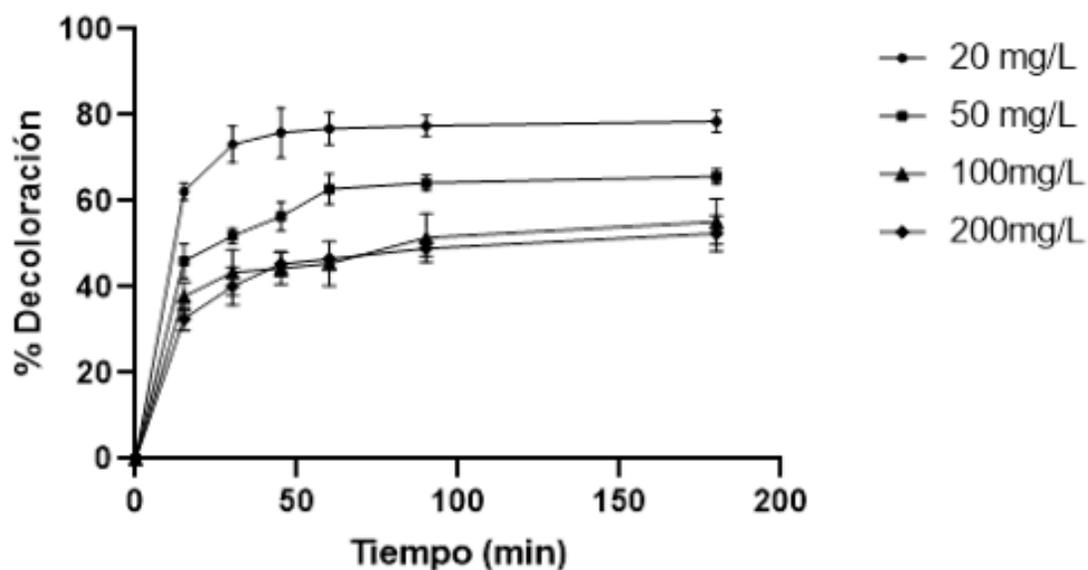
El verde malaquita (MG), es un colorante sintético de trifenilmetano ampliamente utilizado en productos químicos, en procesamiento de alimentos, farmacéutica y acuicultura, sin embargo, presenta un gran potencial de carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogenicidad (Srivastava *et al.*, 2004). Los residuos de MG en el medio ambiente son persistentes y dichos residuos son detectados con frecuencia en peces consumidos por los seres humanos y otros mamíferos (Shanmugam *et al.*, 2017). Bajo este contexto, se propone la degradación enzimática de MG como un enfoque rentable y ecológico para su descomposición y la descontaminación del medio ambiente (Li *et al.*, 2019). Por esta razón, se evaluó la aplicación de Lac2 recombinante frente a la degradación MG después del tratamiento con verde de malaquita a concentraciones de 20, 50, 100 y 200 mg L⁻¹ por 15, 30, 45, 60, 90 y 180 min.

En la Figura 29 se muestra la eficiencia de degradación frente a MG de eLac2 y pLac2, respectivamente, expresada como porcentaje; a concentración de 20 mg L⁻¹

de MG la enzima presento una excelente eficiencia de degradación en ambos casos decolorando el $58.19 \pm 0.019\%$ y $78.55 \pm 0.024\%$; con concentración de 50 mg L^{-1} el porcentaje de degradación fue un poco menor $47.38 \pm 0.034\%$ y $65.67 \pm 0.007\%$; conforme se aumentó la concentración a 100 y 200 mg L^{-1} de MG el porcentaje de degradación fue menor sin mostrar diferencias significativas $35.45 \pm 0.069\%$ y $32.35 \pm 0.020\%$ para eLac2 y $55.18 \pm 0.088\%$ y $52.45 \pm 0.016\%$ para pLac2. Respecto al tiempo, se puede observar que para todas las concentraciones ensayadas a los 15 min se obtiene el mayor porcentaje, a partir de ahí el aumento no es muy significativo.

La aplicación de lacasas para la decoloración de tintes usualmente requiere de la utilización de mediadores redox como ABTS o HBT en la reacción enzimática (Shanmugam *et al.*, 2017), sin embargo, Lac2 recombinante presentó la capacidad de degradar más del 70% del colorante sin la adición de algún mediador redox, lo que representa una gran ventaja en comparación con otras lacasas debido a que se reduce la probabilidad de producir metabolitos que puedan ser más tóxicos que el mismo colorante (Mao *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2020). Este resultado es similar a lo reportado para Stlac2 de *S. turcica* la cual decoloró el 67.08% de verde malaquita en concentración 20 mg L^{-1} en 15 min sin la adición de mediadores (Liu *et al.*, 2019); en contraste, *Ghlac* de *Geothermobacter hydrogeniphilus* tiene la capacidad de degradar solo el 10% del colorante en concentración 100 mg L^{-1} , mientras que con la adición de ABTS como mediador alcanzo un índice de degradación de más del 90% (Mao *et al.*, 2021).

A)



B)

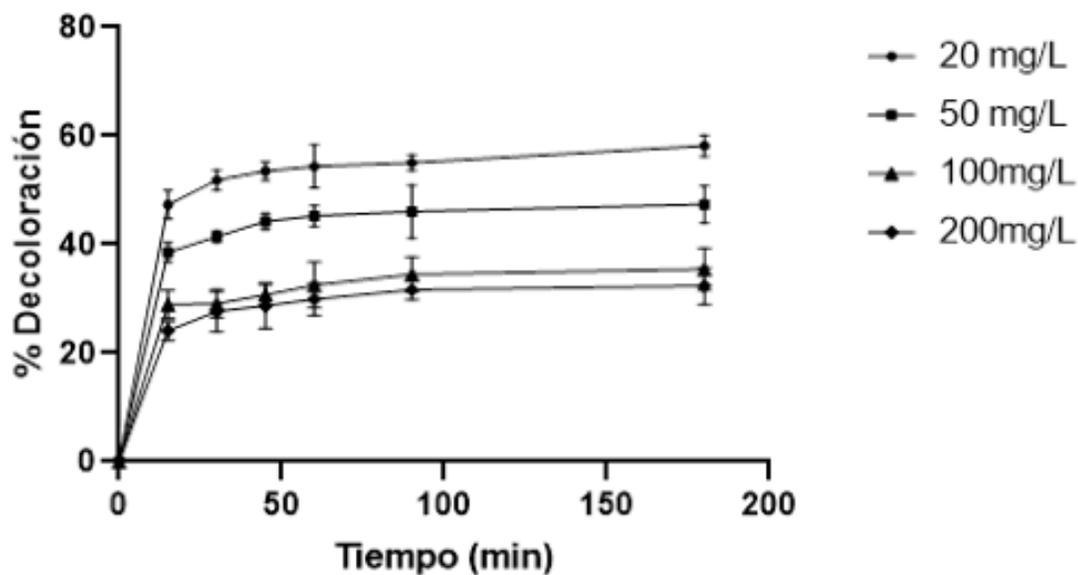


Figura 29. Aplicación de la proteína Lac2 para la degradación de MG. Se utilizaron concentraciones de 20, 50, 100 y 200 mg L⁻¹ de colorante verde de malaquita. En el eje de las X se presenta el tiempo, mientras que el eje de las Y muestra el porcentaje de decoloración. A) Decoloración por eLac2, B) Decoloración por pLac2. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media.

X. CONCLUSIONES

1. El plásmido pALH1 derivado del vector pPICZαA® cuenta con el transgén sintético *Lac2* que codifica para la enzima lacasa de *G. graminis* var. *graminis* para la expresión en levaduras.
2. El transgén sintético *Lac2* que codifica para lacasa recombinante se encuentra integrado en la levadura *P. pastoris* X33 en la línea C3-pALH1-Pp y en la bacteria *E. coli* BL21 (DE3) en la línea C2-pALH1-Ec.
3. Se determinó que las condiciones óptimas para la mayor actividad enzimática de la lacasa *Lac2* recombinante expresada en *E. coli* y *P. pastoris* son pH 5.0 y 60 °C y pH 5.5 y 30 °C, respectivamente. Además, la actividad enzimática se incrementa con la adición de 10 mM de Fe³⁺ y Cu²⁺.
4. Se logró determinar que la expresión del transgén sintético *Lac2* que codifica para la enzima lacasa de *G. graminis* var. *graminis* tanto en *P. pastoris* como *E. coli* producen una enzima funcional frente a la degradación de colorante verde malaquita. Sin embargo, la lacasa expresada en *P. pastoris* presenta la ventaja de que, al ser excretada al medio de cultivo, se encuentra parcialmente pura. Además, su actividad enzimática es 2.5 veces mayor que la expresada en *E. coli* y se puede considerar candidata para procesos industriales gracias a que su temperatura óptima es de 30 °C.

XI. PERSPECTIVAS

1. Realizar la purificación de la proteína y posteriormente realizar los análisis enzimáticos correspondientes para determinar si existe algún cambio en sus parámetros cinéticos o su actividad enzimática.
2. Determinar mediante técnicas más específicas, como la espectroscopia de masas, la presencia de glicosilaciones de la lacasa recombinante Lac2 expresada en *Pichia pastoris*.
3. Identificar el papel que tiene la *N*-glicosilación en la actividad específica de la enzima comparando la actividad entre Lac2 recombinante deglicosilada y glicosilada expresada en *P. pastoris*, además de una comparación con la actividad de Lac2 expresada en *E. coli*.
4. Insertar la secuencia del trangén *Lac2* en un vector de expresión para plantas, expresar la enzima y realizar los análisis enzimáticos consecuentes para luego compararlos con los resultados obtenidos en esta investigación con el fin de determinar si hay cambios en sus parámetros cinéticos y su actividad enzimática.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, K., Chaturvedi, V., Verma, P. 2018. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresources and Bioprocessing*, **5**(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0190-z>
- Ahlawat, S., Singh, D., Yadav, A., Singh, A.K., Viridi, J.S., Sharma, K.K. 2020. Proteomic analysis reveals the damaging role of low redox laccase from *Yersinia enterocolitica* strain 8081 in the midgut of *Helicoverpa armigera*. *Biotechnology letters*, **42**, 2189-2210. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02925-x>
- Alshabib, M., Onaizi, S.A. 2019. A review on phenolic wastewater remediation using homogeneous and heterogeneous enzymatic processes: Current status and potential challenges. *Separation and Purification Technology*, **219**, 186-207. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.03.028>
- Ausec, L., Zakrzewski, M., Goesmann, A., Schlüter, A., Mandic-Mulec, I. 2011. Bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes. *PloS one*, **6**(10), e25724-e25724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025724>
- Avelar, M., Olvera, C., Aceves-Zamudio, D., Folch, J.L., Ayala, M. 2017. Recombinant expression of a laccase from *Corioloopsis gallica* in *Pichia pastoris* using a modified α -factor preproleader. *Protein expression and purification*, **136**, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.06.001>
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*, **30**(2), 215-42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
- Behrens, C.J., Linke, D., Allister, A.B., Zelena, K., Berger, R.G. 2017. Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, **137**, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.06.014>
- Bento, I., Martins, L.O., Gato Lopes, G., Arménia Carrondo, M., Lindley, P.F. 2005. Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Trans*(21), 3507-13. <https://doi.org/10.1039/b504806k>



- Birnboim, H.C. 1983. [17] A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. in: *Methods in Enzymology*, Vol. 100, Academic Press, pp. 243-255. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(83\)00059-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(83)00059-2)
- Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M.G. 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et biophysica acta*, **1379**(3), 381-390. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(97\)00117-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(97)00117-7)
- Brijwani, K., Rigdon, A., Vadlani, P.V. 2010. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme research*, **2010**, 149748-149748. <https://doi.org/10.4061/2010/149748>
- Bronikowski, A., Hagedoorn, P.-L., Koschorreck, K., Urlacher, V.B. 2017. Expression of a new laccase from *Moniliophthora roreri* at high levels in *Pichia pastoris* and its potential application in micropollutant degradation. *AMB Express*, **7**(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0368-3>
- Brown, M.A., Zhao, Z., Mauk, A.G. 2002. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorganica Chimica Acta*, **331**(1), 232-238. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(01\)00814-3](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(01)00814-3)
- Cavallazzi, J.R.P., Oliveira, M.G.d.A., Kasuya, M.C.M. 2004. Laccase production by *Lepista sordida*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**, 261-263. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000200016>
- Chahal, S., Wei, P., Moua, P., Park, S.P.J., Kwon, J., Patel, A., Vu, A.T., Catolico, J.A., Tsai, Y.F.T., Shaheen, N. 2017. Structural characterization of the α -mating factor prepro-peptide for secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Gene*, **598**, 50-62. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.040>
- Cho, H.Y., Lee, C., Hwang, S.G., Park, Y.C., Lim, H.L., Jang, C.S. 2014. Overexpression of the *OsCh11* gene, encoding a putative laccase precursor, increases tolerance to drought and salinity stress in transgenic *Arabidopsis*. *Gene*, **552**(1), 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.018>



- Cortazar, M., A, González, R., CA, Coronel O., C., Escalante L., J., Castro R., J., Villagómez I, J. 2012. Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Universidad y ciencia*, **28**(2), 187-199.
- Cregg, J.M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K., Chappell, T. 2009. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods in enzymology*, **463**, 169-189. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63013-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63013-5)
- Csarman, F., Obermann, T., Zanjko, M.C., Man, P., Halada, P., Seiboth, B., Ludwig, R. 2021. Functional expression and characterization of two laccases from the brown rot *Fomitopsis pinicola*. *Enzyme and Microbial Technology*, **148**, 109801. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109801>
- Domínguez, A., Couto, S.R., Sanromán, M.Á. 2005. Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**(4), 405-409. [10.1007/s11274-004-1763-x](https://doi.org/10.1007/s11274-004-1763-x)
- Ebbs, S. 2004. Biological degradation of cyanide compounds. *Curr Opin Biotechnol*, **15**(3), 231-6. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.03.006>
- Ece, S., Lambertz, C., Fischer, R., Commandeur, U. 2017. Heterologous expression of a *Streptomyces cyaneus* laccase for biomass modification applications. *AMB Express*, **7**(1), 86-86. [10.1186/s13568-017-0387-0](https://doi.org/10.1186/s13568-017-0387-0)
- Epstein, L., Kaur, S., Goins, T., Kwon, Y.H., Henson, J.M. 1994. Production of hyphopodia by wild-type and three transformants of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*. *Mycologia*, **86**(1), 72-81. <https://doi.org/10.1080/00275514.1994.12026375>
- Falconer, R.J., O'Neill, B.K., Middelberg, A.P. 1998. Chemical treatment of *Escherichia coli*. II. Direct extraction of recombinant protein from cytoplasmic inclusion bodies in intact cells. *Biotechnology and bioengineering*, **57**(4), 381-386.
- Filazzola, M.T. 1999. Effect of Various Pollutants and Soil-Like Constituents on Laccase from *Cerrena unicolor*. *Journal of environmental quality*, **v. 28**(no. 6), pp. 1929-1938-1999 v.28 no.6. <https://doi.org/10.2134/jeq1999.00472425002800060032x>
- Fortes, C.C.S., Daniel da Silva, A.L., Xavier, A.M.R.B., Tavares, A.P.M. 2017. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles



- for laccase biocatalytic reactions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **117**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.03.009>
- Garg, N., Baranwal, R., Chhabra, M., Mishra, S., Chaudhuri, T., Bisaria, V. 2008. Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1784**(2), 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.11.006>
- Garzón, J.M., Rodríguez-Miranda, J.P., Hernández-Gómez, C. 2017. Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y Salud*, **19**, 309-318. <https://dx.doi.org/10.22267/rus.171902.93>
- Gochev, V., Krastanov, A. 2007. Fungal laccases. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **13**, 75-83.
- Guan, Z.-B., Song, C.-M., Zhang, N., Zhou, W., Xu, C.-W., Zhou, L.-X., Zhao, H., Cai, Y.-J., Liao, X.-R. 2014. Overexpression, characterization, and dye-decolorizing ability of a thermostable, pH-stable, and organic solvent-tolerant laccase from *Bacillus pumilus* W3. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **101**, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.11.009>
- Guo, H., Zheng, B., Jiang, D., Qin, W. 2017. Overexpression of a Laccase with Dye Decolorization Activity from *Bacillus* sp. induced in *Escherichia coli*. *Microbial Physiology*, **27**(4), 217-227. <https://doi.org/10.1159/000478859>
- Hattori, M., Tsuchihara, K., Noda, H., Konishi, H., Tamura, Y., Shinoda, T., Nakamura, M., Hasegawa, T. 2010. Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, **40**(4), 331-338. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.02.009>
- Hayat, S.M., Farahani, N., Golichenari, B., Sahebkar, A. 2018. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. *Current pharmaceutical design*, **24**(6), 718-725. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180131121940>
- He, Z., Huang, Y., Qin, Y., Liu, Z., Mo, D., Cong, P., Chen, Y. 2012. Comparison of alpha-factor preprosequence and a classical mammalian signal peptide for

- secretion of recombinant xylanase xynB from yeast *Pichia pastoris*. *Journal of microbiology and biotechnology*, **22**(4), 479-483.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1109.09031>
- Hilgers, R., Vincken, J.-P., Gruppen, H., Kabel, M.A. 2018. Laccase/Mediator Systems: Their Reactivity toward Phenolic Lignin Structures. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **6**(2), 2037-2046.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03451>
- Holm, L., Laakso, L.M. 2016. Dali server update. *Nucleic acids research*, **44**(W1), W351-W355.
- Imran, M. 2012. Production and industrial application of Laccasa enzyme. *Journal of Cell & Molecular Biology*, **10**, 1-11.
- Johannes, C., Majcherczyk, A. 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J Biotechnol*, **78**(2), 193-9. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00208-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00208-x)
- Jönsson, L.J., Saloheimo, M., Penttilä, M. 1997. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetics*, **32**(6), 425-430. [10.1007/s002940050298](https://doi.org/10.1007/s002940050298)
- Kelbert, M., Pereira, C.S., Daronch, N.A., Cesca, K., Michels, C., de Oliveira, D., Soares, H.M. 2020. Laccase as an efficacious approach to remove anticancer drugs: A study of doxorubicin degradation, kinetic parameters, and toxicity assessment. *Journal of hazardous materials*, 124520.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124520>
- Kelley, L.A., Sternberg, M.J. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature protocols*, **4**(3), 363-371.
- Kiefer, M.M.C., Gomord, V., O'Connell, A., Halpin, C., Faye, L. 1996. Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco. *Gene*, **178**(1-2), 205-207. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00381-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00381-2)
- Kiiskinen, L.-L., Kruus, K., Bailey, M., Ylösmäki, E., Siika-Aho, M., Saloheimo, M. 2004. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology*, **150**(9), 3065-3074.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.27147-0>



- Kudanga, T., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G.M., Burton, S. 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. *Enzyme Microb Technol*, **48**(3), 195-208. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.007>
- Kumar, S.V., Phale, P.S., Durani, S., Wangikar, P.P. 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol Bioeng*, **83**(4), 386-94. <https://doi.org/10.1002/bit.10681>
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F.J., Ballesteros, A., Alcalde, M. 2008. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, **7**(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-32>
- Kwiatos, N., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Krzemińska, A., Delavari, A., Paneth, P., Bielecki, S. 2020. Evolved *Fusarium oxysporum* laccase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific reports*, **10**(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60204-1>
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, **227**(5259), 680-685.
- Lara, A.R. 2011. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, **10**(2), 209-223.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.G., Ilangovan, K., Suzara, V.V., Düzgüneş, N., Renugopalakrishnan, V. 2007. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*, **142**(2), 105-24. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0003-x>
- Li, T., Huang, L., Li, Y., Xu, Z., Ge, X., Zhang, Y., Wang, N., Wang, S., Yang, W., Lu, F. 2020. The heterologous expression, characterization, and application of a novel laccase from *Bacillus velezensis*. *Science of The Total Environment*, **713**, 136713. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136713>
- Li, T., Tian, D., Zhu, Z., Jin, W., Wu, S., Li, H. 2019. The gut microbiota: a new perspective on the toxicity of malachite green (MG). *Appl Microbiol Biotechnol*, **103**(23-24), 9723-9737. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10214-5>
- Litvintseva, A.P., Henson, J.M. 2002a. Characterization of two laccase genes of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* and their differential transcription in



- melanin mutants and wild type. *Mycological Research*, **106**(7), 808-814. <https://doi.org/10.1017/S0953756202005841>
- Litvintseva, A.P., Henson, J.M. 2002b. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. tritici, the take-all fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(3), 1305-1311. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1305-1311.2002>
- Liu, N., Shen, S., Jia, H., Yang, B., Guo, X., Si, H., Cao, Z., Dong, J. 2019. Heterologous expression of Stlac2, a laccase isozyme of *Setosphaeria turcica*, and the ability of decolorization of malachite green. *International Journal of Biological Macromolecules*, **138**, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.029>
- Liu, Q., Luo, L., Wang, X., Shen, Z.G., Zheng, L. 2017. Comprehensive Analysis of Rice Laccase Gene (OsLAC) Family and Ectopic Expression of OsLAC10 Enhances Tolerance to Copper Stress in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, 209. <https://doi.org/10.3390/ijms18020209>
- Lõoke, M., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A. 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, **50**(5), 325-8. <https://doi.org/10.2144/000113672>
- Lu, L., Wang, T.-N., Xu, T.-F., Wang, J.-Y., Wang, C.-L., Zhao, M. 2013. Cloning and expression of thermo-alkali-stable laccase of *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Bioresource technology*, **134**, 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.015>
- Ma, S., Liu, N., Jia, H., Dai, D., Zang, J., Cao, Z., Dong, J. 2018. Expression, purification, and characterization of a novel laccase from *Setosphaeria turcica* in *Escherichia coli*. *J Basic Microbiol*, **58**(1), 68-75. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700212>
- Ma, Y., Li, L., Tian, H., Lu, M., Megharaj, M., He, W. 2019. Transcriptional analysis of the laccase-like gene from *Burkholderia cepacia* BNS and expression in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, **103**(2), 747-760. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9468-5>
- Mandel, M., Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, **53**(1), 159-62. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90051-3)



- Mao, G., Wang, K., Wang, F., Li, H., Zhang, H., Xie, H., Wang, Z., Wang, F., Song, A. 2021. An Engineered Thermostable Laccase with Great Ability to Decolorize and Detoxify Malachite Green. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(21), 11755. <https://doi.org/10.3390/ijms222111755>
- Marbach, I., Harel, E., Mayer, A.M. 1984. Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochemistry*, **23**(12), 2713-2717. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(84\)83001-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(84)83001-0)
- Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H., 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. *J Biol Chem*, **277**(21), 18849-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200827200>
- Mendoza, L. 2011. *Laccases from new fungal sources and some promising applications*. Lund University.
- Middelberg, A.P., O'Neill, B.K., L. Bogle, I.D., Snoswell, M.A. 1991. A novel technique for the measurement of disruption in high-pressure homogenization: Studies on *E. coli* containing recombinant inclusion bodies. *Biotechnology and bioengineering*, **38**(4), 363-370.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., Durán, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, **13**(6-7), 205-216. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00155-3)
- Moldes, D., Sanromán, M. 2006. Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: Relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 1197-1204. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9161-1>
- Monsef, R.A.A.E., Hassan, E., Ramadan, E. 2016. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. *Annals of Agricultural Sciences*, **61**, 145-154. <https://doi.org/10.1016/J.AOAS.2015.11.007>



- More, S.S., P, S.R., K, P., M, S., Malini, S., S, M.V. 2011. Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus sp.* *Enzyme Res*, **2011**, 248735. <https://doi.org/10.4061/2011/248735>
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I. 2007. "Blue" laccases. *Biochemistry (Mosc)*, **72**(10), 1136-50. <https://doi.org/10.1134/s0006297907100112>
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **60**(3), 327-335. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1109-2>
- Navada, K.K., Kulal, A. 2019. Enzymatic degradation of chloramphenicol by laccase from *Trametes hirsuta* and comparison among mediators. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **138**, 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.12.012>
- Niku, P.M.L., Karhunen, E., Salola, P., Raunio, V. 1988. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *The Biochemical journal*, **254**(3), 877-883. <https://doi.org/10.1042/bj2540877>
- Otterbein, L., Record, E., Longhi, S., Asther, M., Moukha, S. 2000. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *European journal of biochemistry*, **267**(6), 1619-1625. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01166.x>
- Otto, B., Schlosser, D., Reisser, W. 2010. First description of a laccase-like enzyme in soil algae. *Arch Microbiol*, **192**(9), 759-68. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0603-7>
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., Sannia, G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J Biol Chem*, **272**(50), 31301-7. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31301>
- Peixoto, C.N., Ottoni, G., Filippi, M.C., Silva-Lobo, V.L., Prabhu, A.S. 2013. Biology of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* isolates from rice and grasses and

- epidemiological aspects of crown sheath rot of rice. *Tropical Plant Pathology*, **38**, 495-504.
- Record, E., Punt, P.J., Chamkha, M., Labat, M., van Den Hondel, C.A., Asther, M. 2002. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *European Journal of Biochemistry*, **269**(2), 602-609. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02690.x>
- Rincón, F.R. 2011. Análisis molecular de la casa *Phanerochaete flavido-alba*: Caracterización del gen y regulación por fenoles y metales.
- Rodríguez, C.S. 2019. Fungal laccase: a versatile enzyme for biotechnological applications. in: *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*, Springer, pp. 429-457. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_13
- Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., Hatakka, A. 1990. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. *Acta Microbiologica Polonica*. 1991. 40: 221-234, **40**.
- Saloheimo, M., Niku-Paavola, M.-L. 1991. Heterologous Production of a Ligninolytic Enzyme: Expression of the *Phlebia Radiata* Laccase Gene in *Trichoderma Reesei*. *Bio/Technology*, **9**(10), 987-990. 10.1038/nbt1091-987
- Salony, Garg, N., Baranwal, R., Chhabra, M., Mishra, S., Chaudhuri, T.K., Bisaria, V.S. 2008. Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **1784**(2), 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.11.006>
- Schneider, P., Caspersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K., Østergaard, P.R., Brown, K.M., Brown, S.H., Xu, F. 1999. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**(6), 502-508. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00085-X)
- Senthivelan, T., Kanagaraj, J., Panda, R.C. 2016. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review.



- Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **21**(1), 19-38. [10.1007/s12257-015-0278-7](https://doi.org/10.1007/s12257-015-0278-7)
- Serrano, R.Y., Marrero, D.K., Fando, C.R. 2016. *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, **47**(2), 67-77.
- Shanmugam, S., Ulaganathan, P., Swaminathan, K., Sadhasivam, S., Wu, Y.-R. 2017. Enhanced biodegradation and detoxification of malachite green by *Trichoderma asperellum* laccase: Degradation pathway and product analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **125**, 258-268. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.08.001>
- Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., Kumar, A. 2011. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res*, **2011**, 217861. <https://doi.org/10.4061/2011/217861>
- Si, J., Peng, F., Cui, B. 2013. Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. *Bioresource technology*, **128**, 49-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.085>
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J., Sigoillot, J.C., Asther, M., Colom, J.F., Martínez, A.T. 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J Biotechnol*, **115**(4), 333-43. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.09.006>
- Soden, D.M., O'callaghan, J., Dobson, A. 2002. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology*, **148**(12), 4003-4014. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-12-4003>
- Srivastava, S., Sinha, R., Roy, D. 2004. Toxicological effects of malachite green. *Aquatic toxicology*, **66**(3), 319-329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.008>
- Sun, J., Zheng, M., Lu, Z., Lu, F., Zhang, C. 2017. Heterologous production of a temperature and pH-stable laccase from *Bacillus vallismortis* fmb-103 in

- Escherichia coli* and its application. *Process Biochemistry*, **55**, 77-84.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.030>
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K., Inamori, Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **67**(10), 2167-2175.
<https://doi.org/10.1271/bbb.67.2167>
- Thak, E.J., Yoo, S.J., Moon, H.Y., Kang, H.A. 2020. Yeast synthetic biology for designed cell factories producing secretory recombinant proteins. *FEMS yeast research*, **20**(2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa009>
- Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, **140**(1), 19-26. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>
- Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., Liang, J. 2018. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic acids research*, **46**(W1), W363-W367.
- Tominaga, J., Michizoe, J., Kamiya, N., Ichinose, H., Maruyama, T., Goto, M. 2004. Factors affecting the oxidative activity of laccase towards biphenyl derivatives in homogeneous aqueous-organic systems. *Journal of bioscience and bioengineering*, **98**(1), 14-19. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(04\)70236-4](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(04)70236-4)
- Trott, O., Olson, A.J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, **31**(2), 455-461.
- Trubitsina, L.I., Abdullatypov, A.V., Larionova, A.P., Trubitsin, I.V., Alferov, S.V., Ponamoreva, O.N., Leontievsky, A.A. 2021. Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes. *PeerJ*, **9**, e11646.
<https://doi.org/10.7717/peerj.11646>
- Upadhyay, P., Shrivastava, R., Agrawal, P.K. 2016. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, **6**(1), 15.
<https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3>



- Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A.P., Narasimha, G. 2014. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Res*, **2014**, 163242. <https://doi.org/10.1155/2014/163242>
- Vite Vallejo, O., Palomares, L.A., Dantán González, E., Ayala Castro, H.G., Martínez Anaya, C., Valderrama, B., Folch Mallol, J. 2009. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and microbial technology*, **45**(3), 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.007>
- Wahleithner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A., Schneider, P. 1996. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, **29**(4), 395-403. [10.1007/BF02208621](https://doi.org/10.1007/BF02208621)
- Wang, B., Yan, Y., Xu, J., Fu, X., Han, H., Gao, J., Li, Z., Wang, L., Tian, Y., Peng, R. 2018. Heterologous Expression and Characterization of a Laccase from *Laccaria bicolor* in *Pichia pastoris* and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**(12), 2057-2063. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.08042>
- Wang, C.Y., Zhang, S., Yu, Y., Luo, Y., Liu, Q., Ju, C., Zhang, Y.C., Qu, L., Lucas, W., Wang, X., Chen, Y.Q. 2014. *MiR397b* regulates both lignin content and seed number in *Arabidopsis* via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. *Plant Biotechnology Journal*, **12**. <https://doi.org/10.1111/pbi.12222>
- Wang, J., Feng, J., Jia, W., Fan, P., Bao, H., Li, S., Li, Y. 2017. Genome-Wide Identification of *Sorghum bicolor* Laccases Reveals Potential Targets for Lignin Modification. *Frontiers in Plant Science*, **8**(714). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00714>
- Wang, J., Yu, S., Li, X., Feng, F., Lu, L. 2020. High-level expression of *Bacillus amyloliquefaciens* laccase and construction of its chimeric variant with improved stability by domain substitution. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **43**(3), 403-411. [10.1007/s00449-019-02236-0](https://doi.org/10.1007/s00449-019-02236-0)



- Weng, S.S., Ku, K.L., Lai, H.T. 2012. The implication of mediators for enhancement of laccase oxidation of sulfonamide antibiotics. *Bioresour Technol*, **113**, 259-64. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.111>
- Wood, D.A. 1980. Production, Purification and Properties of Extracellular Laccase of *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, **117**, 327-338. <https://doi.org/10.1099/00221287-117-2-327>
- Xu, G., Wu, Y., Zhang, Y., Fang, W., Xiao, Y., Fang, Z. 2019. Role of N-glycosylation on the specific activity of a *Coprinopsis cinerea* laccase *Lcc9* expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of bioscience and bioengineering*, **128**(5), 518-524. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.05.004S>
- Xu, K.-Z., Ma, H., Wang, Y.-J., Cai, Y.-J., Liao, X.-R., Guan, Z.-B. 2020. Extracellular expression of mutant CotA-laccase SF in *Escherichia coli* and its degradation of malachite green. *Ecotoxicology and environmental safety*, **193**, 110335. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110335>
- Yadav, D., Ranjan, B., Mchunu, N., Le Roes-Hill, M., Kudanga, T. 2018. Secretory expression of recombinant small laccase from *Streptomyces coelicolor* A3 (2) in *Pichia pastoris*. *International journal of biological macromolecules*, **108**, 642-649. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.169>
- Yamabayashi, S. 1987. Periodic acid — Schiff — Alcian Blue: A method for the differential staining of glycoproteins. *The Histochemical Journal*, **19**(10), 565-571. [10.1007/BF01687364](https://doi.org/10.1007/BF01687364)
- Yang, C.-H., Guo, J.-Y., Chu, D., Ding, T.-B., Wei, K.-K., Cheng, D.-F., Wan, F.-H. 2017. Secretory laccase 1 in *Bemisia tabaci* MED is involved in whitefly-plant interaction. *Scientific reports*, **7**(1), 3623-3623. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03765-y>
- Yang, X., Gu, C., Lin, Y. 2020. A novel fungal laccase from *Sordaria macrospora* k-hell: expression, characterization, and application for lignin degradation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **43**(7), 1133-1139. [10.1007/s00449-020-02309-5](https://doi.org/10.1007/s00449-020-02309-5)
- Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., Dalboge, H. 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot



- basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(3), 834-841. <https://doi.org/10.1128/aem.62.3.834-841.1996>
- You, L.F., Liu, Z.M., Lin, J.F., Guo, L.Q., Huang, X.L., Yang, H.X. 2014. Molecular cloning of a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and heterologous expression in *Pichia pastoris*. *J Basic Microbiol*, **54 Suppl 1**, S134-41. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200808>
- Zhang, Y., Fan, J., Francis, F., Chen, J. 2018. Molecular characterization and gene silencing of Laccase 1 in the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **97**, e21446. <https://doi.org/10.1002/arch.21446>

XIII. APÉNDICE I: CONSTRUCCIÓN pMBO2

De la base de datos GenBank se obtuvo la secuencia del gen Lac2 que codifica para la enzima lacasa de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (AJ437320.1) de 1,737 pb (Figura 30) que codifica una proteína de 578 aminoácidos.

```
atgttgctcatcactctttcacgctactctcgctcgccgccctcgcgctgggctctctctcggggagctcagcagagggcc  
gagccccggattcagcaacgggctacatgcgaggaaacaccgccaccacgcgctcgagtggtgcgacttcgacatcaa  
gagcgactactacactggccagcaccccaactggagtcaccagggagtcttggtgagcttacagacagcgtcaagct  
ggcgcccgatggcgtccctcgctatgttcaggcctcaacggcaccgttcccggccgactctcgtgatggactggggcgac  
gacgtcgtcatccatgtcaccacaactcaccagagcatcaacggcaccagtgccactggcagggcctgcaccagaag  
gacacggctcctcagcagtggtgtcgtgtccgtcaccagtgccccctggcaccgacccagacctacaagttcaagg  
ccacaactatggctcctcgtggtaccactcgcactttcgctgcaggcgtggcaggggtgtcttcggcggcatcatcaac  
ggtcccgcagcgcgaattacgacgaggacgtcggcatggtcgtgctgagcgactggggccacaagacgcccgacgagct  
ttggcaccagggccgagagccagggccccacgcttgagaacgcctgatcaacggcatgaacgtctacggcggcagg  
gcaaccagaccggcaagcgtgggagacctcgttcgaggccggcaagtcttaccgcttcgcatgtcaactgccatcga  
caccacttcaagttcggcatcgacaaccacacctgaccgtcatcgcccttgacttcattcccgttgagccgtacgagacca  
ccatgggtcaacatcggcatgggcccagcgcgtcgacgtcattgtcaaggctgaccaggccgtgctgcctccgacttctggctg  
cgcgccatccccagagcgcctcggcaccatcgagatggccaagaacaccgcgccatcgtgcactacggcaacagcca  
ggcgctccccagcaccaccggccacacctacgtcgacgcgtgagaggacgagccgctcgagaagctcaagccatcatcc  
gcatcgacgctgagcagtcacctacgagcagctgaagatcgccaccgcccggcgtcaacggcaacggcgtcttccgctggt  
acctcaactccaccaccatggagctcgactggtccaacccaccgtcagccagctcgccagcaacgccacggctcgccttctc  
caacagcaacgccgtcatggagctgcccgaggccgacaagtgggcctacgtcatcatccagaccgactttggtgtcgccca  
ccccatccactgcacggccacgactactcggctcctcgcccagggcagcggcgcctaccagcccggcgtcaccagactgat  
caccaccaacccatgcgcccgcacacggccatcctgcccgccggccacctggtcctggcttcaagaccgacaccc  
gggcgctggctcatgactgccacatcggctggcacacggcccagggttcgcatgagttcgtcagcggcagcga  
gatgttctccaagaacatcatcaacaacgacatcgagggcctctcgcagccctggaggacacacgtcggcaagcaca  
acatcaagctcgaggactcgggcatc taa
```

Figura 30. Secuencia de la region codificante del gen *Lac2* de *G. graminis* var *graminis*. Obtenida del acceso AJ437320.1 del GenBank que codifica para la enzima lacasa 2 de 1,737 pb. La secuencia muestra en cursiva el codón de inicio y el codón de paro. Muestra en color, los sitios de restricción no deseados por ser enzimas comercialmente comunes.

La secuencia fue sometida a un análisis de secuencias para eliminar los sitios de restricción *SacI*, *NcoI* y *SmaI/XmaI* en los 67, 1,244 y 1,546 pares de bases, respectivamente (Figura 31). En el par de base número 69 se cambió G por A para eliminar el sitio *SacI* y mantener el aminoácido ácido glutámico, en el par de base número 900 se cambió C por A para eliminar el sitio *NcoI* y mantener el aminoácido treonina, en el par de base número 1,239 se cambió C por A para eliminar el sitio *NcoI* y mantener el aminoácido treonina, en el par de base número 1,245 se cambió G por A para eliminar el sitio *SacI* y mantener el aminoácido ácido glutámico y en el par de base número 1,548 se cambió CCG por CCA para eliminar los sitios *XmaI/SmaI* y mantener el aminoácido prolina.

Posteriormente, a la secuencia de nucleótidos con las mutaciones se le adicionaron los sitios de restricción *EcoRV* (gatatc) en la región 5' anterior al codón de inicio, y los sitios *BglII* y *EcoRI* (agatct y gaattc, respectivamente) en la región 3' posterior al codón de terminación.

Una vez que la secuencia fue enviada a la empresa GenScript con las modificaciones mencionadas anteriormente, el ADN sintetizado con los sitios de restricción *SmaI/BglII-EcoRI* fue clonado en el vector pUC19 en los sitios *SmaI/EcoRI* para dar origen al plásmido pMBO1 y en el vector pET32a(+) en los sitios *EcoRI/EcoRV* para dar origen al plásmido pMBO2.

gatatcatggttgctcatcactctttcacgctactctcgcctcgcgccctcgcgctgggctctcctctcgggga**Act**ccagcag
agggccgagccccggattcagcaacgggctacatgcgaggaacaccgccaccacgcgctcgcagtggtgcgacttcga
catcaagagcgactactacactggccagcaccacaactggagtcaccagggagttctggcttgagcttacagacagcgt
caagctggcgcccgatggcgctcctcgcctatgttcaggccttaacggcaccgttcccggccgactctcgtgatggactggg
gcgacgacgtcgtcatccatgtcaccaacaactcaccagagcatcaacggcaccagtggtccactggcagggcctgcacc
agaaggacacggctcctcagcgtatggtgtcgtgtccgtcacccagtgcccctcgggtcccggcacgaccagacctacaagtt
caaggccacaaactatggctcctcgtggtaccactcgcactttgcgctgcaggcgtggcaggggtgtcttcggcgggcatcatca
tcaacgggtcccgcagcgcgaattacgacgaggacgtcggcatggctcgtgtagcgcactggggccacaagacgcccgcac
gagctttggcaccaggccgagagccagggcccgcacgcttgagaacgcctgatcaacggcatgaacgtctacggcgcc
gagggcaaccagaccggcaagcgtgggagacctcgttcgaggccggcaagtcttaccgcttccgattgtcaactgccc
atcgacaccacttaagttcggcatcgacaaccacacctgaccgtcatcgccttgacttcattcccgttgagccgtacga
gaccac**Aat**ggtcaacatcggcatgggcccagcgcgtcgcagctcattgtcaaggctgaccagggcgtgtcgcctccgacttc
tggtcgcgcgcatccccagagcgcctcggcaccatcgagatggccaagaacaccgcgcatcgtgcactacggcaac
agccagggcgtcccagcaccaccggccacacctacgtcgcagcgtgcgaggacgagccgctcgcagaagctcaagccat
catccgcatcgacgctgagcagtcacctaagcagcagctgaagatcgccaccgcccggcgtcaacggcaacggcgtcttccg
ctggtacctcaactccaccac**Aat**gga**Act**cgcactgggtccaaccccaccgtcagccagctcgcagcaacgccacggctcgc
cttctccaacagcaacgccgtcatggagctgcccgaggccgacaagtgggctacgtcatcatccagaccgactttggtgtc
gcccacccatccacctgcacggccagactactcggctcctcgcggggcagcggcgctaccagcccggcgtcaccaag
ctgatcaccaccaacccatgcgcccgcacacggccatcctgcccgcgcccggccacctggtcctggctttcaagaccgaca
accc**Agg**cgctggctcatgcaactgccacatcggctggcacacggcccagggcttcgcatgcagttcgtcgcagcggcga
gagatgttctccaagaacatcatcaacaacaacgacatcgagggcctcgcgagccctggaggacacacgtcggcaag
cacaacatcaagctcagagactcgggcatctaaagatctgaattc

Figura 31. Secuencia original del gen *Lac2* y los sitios que codifican para las enzimas de restricción *SacI*, *NcoI* y *SmaI/XmaI*. Dichos sitios fueron eliminados mediante mutaciones puntuales silenciosas. Con mayúscula se encuentran los nucleótidos que fueron cambiados por mutación puntual. La secuencia muestra subrayado los sitios de restricción de las enzimas *EcoRV* (5'), *BglII*, *EcoRI* (3').