



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE



CARACTERIZACIÓN DE UNA LACASA PRODUCIDA POR *Agrocybe pediades* EN MEDIO LÍQUIDO Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE COBRE Y HEXACLOROBENCENO COMO POSIBLES INDUCTORES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA:

PAULINA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

BAJO LA CODIRECCIÓN DE:

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

DR. SAÚL GÓMEZ MANZO

TUTORES:

DRA. EDELMIRA GARCÍA NIETO

DR. JAIME MARCIAL QUINO

Agradecimientos

Hoja de financiamiento

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de investigación en Genética y Ambiente (CIGyA) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx) y el Laboratorio de Bioquímica Genética del Instituto Nacional de Pediatría (INP) bajo la dirección de la Dra. Alba Mónica Montiel González y el Dr. Saúl Gómez Manzo con financiamiento propio.

Índice

Agradecimientos.....	1
Hoja de financiamiento.....	2
Índice de tablas.....	5
Índice de figuras.....	6
1. Resumen.....	7
2. Abstract.....	8
3. Introducción.....	9
3.1. Fuentes de enzimas utilizadas en temas ambientales.....	11
3.2. Los hongos como recursos ambientales.....	12
3.3. Los hongos saprótrofos.....	14
3.4. Enzimas fúngicas extracelulares.....	16
3.5. Enzimas lacasas.....	19
3.6. Importancia de las enzimas lacasas en remediación ambiental.....	22
4. Antecedentes.....	25
4.1. Actividad enzimática lacasa.....	25
4.2. Purificación y caracterización de lacasas.....	26
4.3. Propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales de lacasas.....	26
4.4. Comparación catalítica de lacasas.....	26
4.5. <i>Agrocybe pediades</i>	28
5. Justificación.....	29
6. Preguntas de investigación.....	30
7. Objetivo general.....	30
8. Objetivos específicos.....	30
9. Metodología.....	31
9.1. Organismo de estudio.....	32
9.2. Propagación del hongo.....	32
9.3. Cultivo en medio líquido.....	32
9.4. Análisis de actividad enzimática y zimografía.....	34
9.5. Purificación de la enzima con actividad lacasa.....	36
9.6. Caracterización funcional de la enzima con actividad lacasa.....	37
9.6.1. Determinación del estado nativo de la enzima con actividad lacasa.....	37
9.6.2. Curva de pH.....	37
9.6.3. Efecto de la temperatura sobre la enzima con actividad lacasa.....	38

9.6.4. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima con actividad lacasa	38
10. Resultados	39
10.1 Descripción de la expresión de enzimas con actividad lacasa producidas por <i>Agrocybe pediades</i> en medio líquido con la presencia de cobre y hexaclorobenceno	39
10.1.1. Cultivo en medio líquido y actividad enzimática lacasa	39
10.1.2. Zimografía	43
10.2. Purificación de las enzimas con actividad lacasa	46
10.4. Caracterización funcional de la enzima con actividad lacasa	53
10.4.1. Curva de pH	53
10.4.2. Efecto de la temperatura sobre la enzima con actividad lacasa	54
10.4.3. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima con actividad lacasa	55
11. Discusión	56
11.1. Descripción de la expresión de enzimas con actividad lacasa producidas por <i>Agrocybe pediades</i> en medio líquido con la presencia de cobre y hexaclorobenceno	56
11.2. Purificación de la enzima con actividad lacasa producida por <i>Agrocybe pediades</i>	58
11.3. Caracterización de la enzima con actividad lacasa producida por <i>Agrocybe pediades</i>	59
12. Conclusiones	61
13. Literatura citada	63

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del medio de cultivo.	33
Tabla 2. Tabla de purificación de la enzima con actividad lacasa.	47
Tabla 3. Características de enzimas con actividad lacasa de hongos del orden Agaricales	60

Índice de figuras

Figura 1. Árbol filogenético de <i>Woose</i>	12
Figura 2. Hongo saprótrofo <i>Panaeolus semiovatus</i>	15
Figura 3. Representación esquemática de los centros coordinados de cobre de una enzima lacasa.....	20
Figura 4. Estructuras tridimensionales de lacasas de bacteria, hongo y planta.....	22
Figura 5. Ejemplo de degradación de colorante sintético.	23
Figura 6. Decoloración de Azure B por distintas lacasas.....	27
Figura 7. Basidiomas y micelio de <i>Agrocybe pediades</i>	29
Figura 8. Esquema de la metodología general de la investigación.....	31
Figura 9. Diseño experimental.	34
Figura 10. Generación de biomasa de <i>Agrocybe pediades</i>	40
Figura 11. Constante específica de velocidad de crecimiento.	41
Figura 12. Actividad enzimática lacasa específica de los cuatro tratamientos.	42
Figura 13. Zimogramas de los cuatro tratamientos.	44
Figura 14. Comparación de zimogramas.....	45
Figura 15. Zimograma del ECEE concentrado.	46
Figura 16. Purificación de la enzima con actividad lacasa.....	47
Figura 17. Electroforesis en gel de poliacrilamida.	48
Figura 18. Purificación de la enzima con actividad lacasa.....	49
Figura 19. Curva de calibración de proteínas estándares.....	50
Figura 20. Determinación de la masa molecular de la enzima con actividad lacasa.	51
Figura 21. Electroforesis en gel SDS-PAGE sin y con adición de DTT.	52
Figura 22. Comportamiento de la actividad lacasa en ausencia y presencia de DTT.....	53
Figura 23. Curva de pH de la enzima con actividad lacasa.	54
Figura 24. Efecto de la temperatura en la actividad lacasa de la enzima purificada.....	55
Figura 25. Curva de saturación ajustada a la ecuación de Michaelis-Menten.	56

1. Resumen

Los hongos saprófitos producen enzimas extracelulares que son de interés en temas de remediación ambiental, ya que pueden inmovilizar, transformar o degradar compuestos xenobióticos persistentes en el ambiente. Un tipo particular de estas enzimas son las lacasas, que debido a su baja especificidad de sustrato y a que emplean oxígeno como aceptor de electrones, suponen una buena alternativa ecológica para el tratamiento de diversos compuestos xenobióticos; el tipo de compuesto sobre el que pueden llevar a cabo su catálisis estas enzimas depende del organismo que las produce, por lo cual la búsqueda de enzimas con actividad lacasa producidas por especies aún no estudiadas en este ámbito, es de suma importancia para conocer si sus propiedades son más afines a compuestos particulares, a diferencia de las ya conocidas. En este sentido, el fenómeno de inducción de la expresión de dichas enzimas es fundamental, al imponer una condición intencional que promueve la expresión de enzimas que en condiciones habituales de cultivo los hongos no producen.

En el presente trabajo se realizó la caracterización de una enzima con actividad lacasa producida por la cepa CIGyA-002 de *Agrocybe pediades*, un hongo saprófito recolectado y aislado de un bosque de *Juniperus deppeana* ubicado en el municipio de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros del estado de Tlaxcala. Se determinó el efecto de cobre y hexaclorobenceno en el medio de cultivo como posibles inductores, concluyendo que estos compuestos no inducen la producción de enzimas con actividad lacasa en *Agrocybe pediades*. Se empleó el sustrato 2,6-dimetoxifenol para la determinación de la actividad lacasa. Se purificó y caracterizó la enzima con actividad lacasa que se presentó con mayor frecuencia en los ensayos; su tamaño molecular es de alrededor de 70 kDa, es un monómero que en presencia de DTT pierde la actividad enzimática; el pH al que se alcanza la mayor actividad con 2,6-dimetoxifenol como sustrato a 39 °C es 5.0; y a 61.7 °C aún conserva el 50% de su actividad, a pH 5; los valores de los parámetros cinéticos V_{max} y K_m son $285 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ y $100 \mu\text{M}$, respectivamente, lo que significa que la enzima con actividad lacasa producida por *Agrocybe pediades* tiene una alta

afinidad por el sustrato 2,6-dimetoxifenol, mayor a la de otras enzimas con actividad lacasa producidas por hongos del orden Agaricales, al que pertenece *Agrocybe pediades*, por lo cual se puede inferir que puede realizar una catálisis más eficiente sobre compuestos similares al 2,6-dimetoxifenol que las otras enzimas.

2. Abstract

Saprotrophus fungi produce extracellular enzymes that are of interest in environmental remediation issues, since they can immobilize, transform or degrade persistent xenobiotic compounds in the environment. A particular type of these enzymes are laccases, which due to their low substrate specificity and the fact that they use oxygen as an electron acceptor, represent a good ecological alternative for the treatment of various xenobiotic compounds. The type of compound on which these enzymes can carry out their catalysis depends on the organism that produces them, so the search for enzymes with laccase activity produced by species not yet studied in this field is of great importance to know if their properties are more related to particular compounds, unlike those already known. In this sense, the phenomenon of induction of the expression of these enzymes is fundamental, by imposing an intentional condition that promotes the expression of enzymes that fungi do not produce under normal cultivation conditions.

In this research, the characterization of an enzyme with laccase activity produced by the *Agrocybe pediades* strain CIGyA-002, a saprotrophic fungus collected and isolated from a *Juniperus deppeana* forest located in the municipality of Ixtacuixtla de Mariano Matamoros in the state of Tlaxcala, was carried out. . The effect of copper and hexachlorobenzene in the culture medium as possible inducers was determined, concluding that these compounds do not induce the production of enzymes with laccase activity in *Agrocybe pediades*. The substrate 2,6-dimethoxyphenol was used for the determination of laccase activity. The enzyme with laccase activity that occurred most frequently in the assays was purified and characterized. Its molecular size is around 70 kDa. It is a monomer that loses its

enzymatic activity in the presence of DTT. The pH at which the highest activity is reached, with 2,6-dimethoxyphenol as substrate at 39 °C is 5.0; and at 61.7 °C it still retains 50% of its activity, at pH 5. The values of the kinetic parameters V_{max} and K_m are $285 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ and $100 \mu\text{M}$, respectively, which means that the enzyme with laccase activity produced by *Agrocybe pediades* has a high affinity for substrate 2,6-dimethoxyphenol, higher than that of other enzymes with laccase activity produced by fungi of the order Agaricales, to which *Agrocybe pediades* belongs, for which it can be inferred that it can perform a more efficient catalysis on compounds similar to 2,6-dimethoxyphenol than the other enzymes.

3. Introducción

En la actualidad, es evidente que el estilo de vida y los procesos mediante los cuales la humanidad se provee de productos para satisfacer sus necesidades, han generado subproductos o desechos que ejercen diversos efectos sobre la biota (Porta *et al.*, 2008). Mientras que en los humanos y en muchos otros organismos los efectos de estos desechos son indeseables, como daños genéticos, mutaciones oncogénicas, modificaciones epigenéticas, disrupción endócrina, disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplásmico y alteración en la respuesta a proteínas mal plegadas, entre otros trastornos moleculares y fisiológicos que pueden terminar en el deterioro y muerte de los organismos (Castro-Castro *et al.*, 2005; Edineldo-Lans *et al.*, 2011; Mostafalou y Abdollahi, 2013; Vakonaki *et al.*, 2013; Sanhueza-Guevara *et al.*, 2018). Existen especies que presentan mecanismos metabólicos y estructurales que les permiten sobrevivir en presencia de contaminantes. Estas especies por lo general son microorganismos, quienes para realizar las actividades químicas necesarias en su crecimiento y reproducción, deben tomar materiales del ambiente que los rodea, que pueden ser compuestos complejos o incluso recalcitrantes, y transformarlos mediante una serie de reacciones. Para lograr este fin, en sus estructuras celulares producen diversos metabolitos, los cuales desempeñan un papel particular durante el proceso, que va

desde la obtención de compuestos del medio, su transformación para obtener energía, el almacenamiento de ésta y su empleo en la elaboración de compuestos adaptados a las necesidades del organismo (Sánchez *et al.*, 2000). Esto a su vez les da la capacidad, ya sea por metabolismo o co-metabolismo de reconocer, usar, transformar o inmovilizar, compuestos xenobióticos que tienen un parecido químico a los compuestos complejos y recalcitrantes propios del ambiente (Arbeli, 2009).

Un tipo de metabolitos muy importante son las enzimas, las cuales son un conjunto principal de proteínas, que participan en la mayoría de las reacciones químicas que se efectúan en el interior de las células y en el caso de los organismos heteroquimiótrofos también en el medio extracelular (Jiménez y Merchant, 2003). Una clase de enzimas que ha sido valorada por su amplia especificidad, capacidad catalítica y utilidad en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética, y principalmente en el campo de la recuperación de ambientes contaminados a través de procesos de biorremediación, son las enzimas con actividad lacasa de origen fúngico (Madhavi y Lele, 2009). En una diversidad de especies fúngicas se ha descrito que estas enzimas son codificadas por familias multigénicas, lo que redundante en la presencia de isoformas o de isoenzimas con características particulares, que les permiten una participación diferencial sobre procesos de biorremediación que involucran diferentes sustratos y condiciones ambientales, hecho que potencia a cada una en un ámbito particular para la realización de su catálisis sobre determinados compuestos (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013).

Debido a estas razones, la investigación sobre nuevas fuentes de lacasas, expresadas en condiciones naturales e inducidas por compuestos como el sulfato de cobre y su caracterización bioquímica y molecular es una actividad vigente. En el presente trabajo se pretende caracterizar a las enzimas extracelulares con actividad lacasa producidas por *Agrocybe pediades*, un hongo aislado de un bosque de *Juniperus deppeana* perturbado antropogénicamente por pastoreo, cambio de uso de suelo e incendios; en el municipio de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros del estado de Tlaxcala; con la finalidad de conocer sus posibles funciones catalíticas (Torres-González, 2017; Ortega-Ávila, 2018).

Para desarrollar este tipo de estudios y evidenciar el potencial que los hongos pueden tener en procesos de recuperación de ambientes contaminados, es necesario abordar algunos aspectos generales de sus características biológicas que hagan referencia a los mecanismos que les permiten su interacción con el ambiente.

3.1. Fuentes de enzimas utilizadas en temas ambientales

Diversos microorganismos, como bacterias, arqueas, algas y hongos son capaces de sobrevivir en ambientes contaminados, lo que supone que parte de las sustancias que toman de su entorno provienen de los contaminantes que los rodean y como consecuencia, en muchos casos transforman estos compuestos en otros menos perjudiciales, tanto para ellos como para otros organismos que habitan en su entorno. Esta característica resulta ser de suma importancia en la recuperación de ambientes, como lo han evidenciado estudios en este ámbito, en los que se observan los efectos de algunos metabolitos microbianos sobre determinados compuestos tóxicos (Vitorino y Bessa, 2017). Este es el caso de las enzimas microbianas, las cuales juegan un papel importante en numerosos tratamientos de residuos persistentes (Durán y Esposito, 2000).

Todos los organismos producen enzimas como parte de las reacciones que se llevan a cabo para realizar los procesos vitales. Sin embargo, en cuanto al empleo de enzimas en temas ambientales, las de origen microbiano a menudo son más útiles que las enzimas derivadas de plantas o animales debido a la gran variedad de actividades catalíticas en las que participan, la facilidad de manipulación genética y el rápido crecimiento de los microorganismos. Además, las enzimas microbianas son más estables, es decir, que mantienen su actividad o conformación estructural cuando son sometidas a almacenamiento, aislamiento, purificación u otras manipulaciones físicas o químicas incluyendo exposición a enzimas proteolíticas y calor (Tesauro, 2020), que sus enzimas análogas vegetales y animales y producirlas es más conveniente y seguro (Hasan *et al.*, 2006). Los hongos son microorganismos productores de enzimas que pueden transformar o degradar compuestos tóxicos para otros organismos, lo que los hace actores importantes en la dinámica de los

sistemas ambientales como recursos para la reincorporación de compuestos xenobióticos a las cadenas tróficas convencionales (Ponce-Andrade *et al.*, 2012).

3.2. Los hongos como recursos ambientales

Los hongos pertenecen al dominio Eukarya y al reino Fungi (Figura 1; Otero, 2017; Ocara *et al.*, 2019), del que se calcula existen alrededor de 100,000 especies (Gerald y Gerald, 2015). Son organismos heterótrofos que se alimentan por absorción, después de digerir extracelularmente los nutrientes por acción de enzimas secretadas al medio que los rodea. Se consideran organismos quimiorganótrofos ya que requieren compuestos orgánicos como fuente de energía. De acuerdo con la forma en que obtienen los nutrientes para su subsistencia se clasifican en: simbiontes, que pueden ser parásitos, comensales o mutualistas, y saprótrofos (Cepero de García *et al.*, 2012).

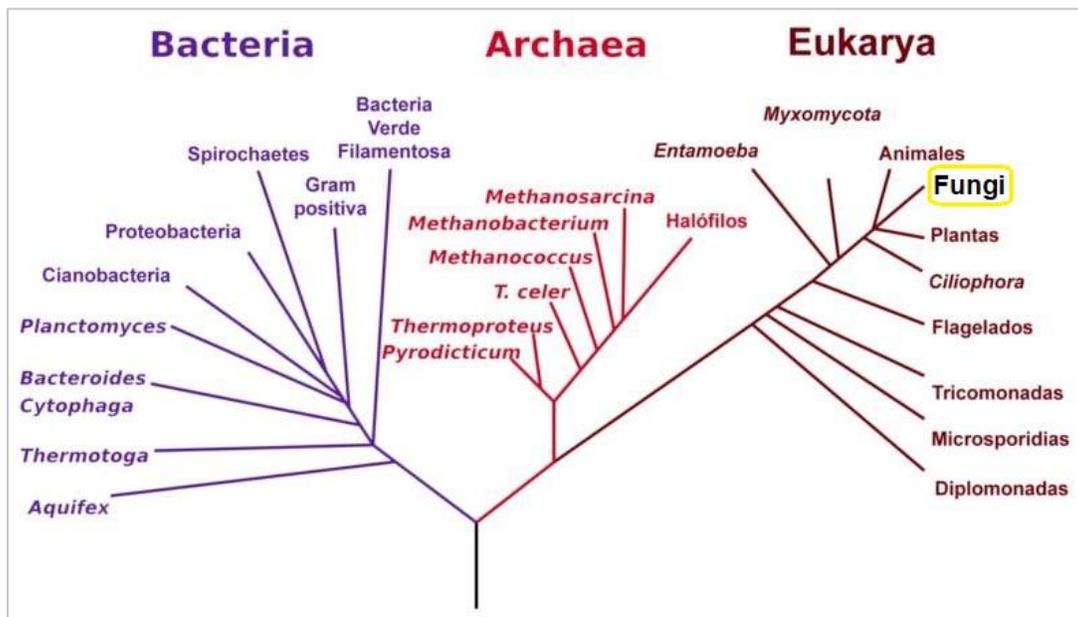


Figura 1. Árbol filogenético de los tres dominios de la vida obtenido a partir de la comparación del ARNr 16S por Woose (Otero, 2017). El reino Fungi resaltado en amarillo.

Los hongos parásitos se caracterizan por obtener algunos o todos sus nutrientes a partir del tejido vivo de su hospedero. Pueden ser biotróficos, lo que significa que

no matan a las células de las cuales se alimentan, ya que por lo regular producen estructuras nutricionales absorbentes especiales para aprovechar las reservas del hospedero; representantes de este tipo de patógenos son las royas (*Puccinia* Pers.) y los mildes vellosos y polvosos (*Peronospora* sp. y *Erysiphe* sp. respectivamente). O pueden ser necrotróficos, que causan la muerte de los tejidos del organismo como parte de su proceso de alimentación, por ejemplo, al producir toxinas o enzimas degradantes, como las que provocan tizones, que son lesiones que causan el marchitamiento repentino y la muerte de una planta o de alguna de sus partes (Deacon, 2006; Cepero de García *et al.*, 2012).

Los hongos comensales realizan un tipo de simbiosis en la que obtienen beneficios de otra especie, la cual se llama hospedero, que no se ve perjudicada ni beneficiada por la asociación. Los hongos que se encuentran adheridos a la superficie externa del hospedero son denominados como ectocomensales y los hongos endocomensales son los que se hallan en el interior del hospedero. Como ejemplo de endocomensal nombraremos el género *Harpella*, que crece en el intestino de varios artrópodos y *Smittium culisitae*, que crece en intestino de larvas de Dípteros. En el hombre y algunos animales de sangre caliente los hongos del género *Malassezia* son ectocomensales de la piel en las zonas ricas en glándulas sebáceas. La especie *Candida albicans* es endocomensal de mucosas; bajo ciertas condiciones ambos hongos pueden volverse patógenos produciendo diferentes tipos de lesiones (Cepero de García *et al.*, 2012).

Los hongos mutualistas se caracterizan por formar una relación con organismos de otras especies, la cual brinda beneficios a las especies asociadas; existe una amplia gama de asociaciones mutualistas entre hongos y otros organismos. Algunos de los ejemplos sobresalientes son los líquenes, los cuales constan de un organismo fotosintético (una alga verde o una cianobacteria) y un hongo, que forman en conjunto un talo, el cual puede resistir algunos de los ambientes más inhóspitos de la Tierra; pues crecen donde casi ningún otro organismo puede crecer, incluidos los flujos de lava enfriados y las áridas arenas del desierto. Y las micorrizas, que son asociaciones entre los hongos y las raíces u otros órganos subterráneos de las

plantas; en donde se denota la característica, en casi todos los casos, de la dependencia que los hongos muestran hacia la planta para el suministro de nutrimentos de carbono, mientras que las plantas dependen de los hongos para obtener un suministro de nutrientes minerales del suelo, como fósforo y nitrógeno (Deacon, 2006; Cepero de García *et al.*, 2012).

Finalmente, los hongos saprótrofos constituyen un importante recurso natural en nuestro entorno debido a su participación en el reciclamiento de carbono, por lo que suelen considerarse como recursos de vital importancia (Cepero de García *et al.*, 2012). La presente investigación centra su interés en las capacidades de este grupo de organismos ya que pueden ser herramientas potenciales para la recuperación de ambientes contaminados, por lo que se abordará de manera más extensa la descripción de sus características.

3.3. Los hongos saprótrofos

Los hongos saprótrofos son organismos que se alimentan de materia orgánica muerta. Uno de sus hábitats naturales es la superficie de hojas o tejidos del tallo en descomposición de las plantas, por lo que es común encontrarlos en los bosques, en plantaciones de árboles frutales, parques urbanos y madera empleada en la construcción; también se desarrollan en pastizales sobre el humus o sobre el tallo seco de pequeñas hierbas; asimismo, en las turberas donde viven sobre restos vegetales; en el estiércol principalmente de animales herbívoros (Figura 2); y sobre la materia orgánica carbonizada que queda después de un incendio forestal o de una hoguera (Cepero de García *et al.*, 2012).



Figura 2. Hongo saprófito *Panaeolus sphinctrinus* creciendo en su hábitat coprófila de estiércol de ganado bovino (Díaz, 2009).

Los hongos saprófitos desempeñan un papel muy importante en el reciclado de los nutrientes, ya que participan en la descomposición y simplificación de los sustratos sobre los que se desarrollan, logrando con esto reintegrar al suelo parte importante de los compuestos necesarios para el desarrollo de otros organismos, como las plantas, lo cual se traduce en un beneficio para otras especies en la cadena trófica, incluidos los humanos. Esta labor la llevan a cabo, gracias a que producen una amplia gama de enzimas que degradan polímeros complejos como almidón, celulosa, proteínas, quitina, queratina, los materiales lignificados más complejos como la madera e incluso compuestos xenobióticos recalcitrantes, como los restos de queroseno utilizado en la aviación. De hecho, existen pocos compuestos orgánicos naturales que no pueden ser degradados por una u otra especie de hongos. Son particularmente importantes en la descomposición de la celulosa, que representa aproximadamente el 40% del material de la pared celular vegetal y es el polímero natural más abundante en la Tierra (Deacon, 2006).

La descomposición de polímeros por los hongos está estrechamente ligada al crecimiento fúngico, que proporciona la liberación coordinada de enzimas extracelulares y la subsecuente reabsorción de los productos de degradación enzimática. Diferentes hongos son capaces de degradar distintos tipos de polímeros, por lo que los hongos saprófitos a menudo crecen en comunidades complejas y mixtas que reflejan sus diferentes capacidades enzimáticas (Deacon, 2006). Los hongos degradadores de lignina, el polímero estructural clave de las plantas leñosas, se utilizan para degradar un amplio espectro de contaminantes ambientales, como hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas, colorantes azoicos y fenoles clorados (Madhavi y Lele, 2009; Viswanath *et al.*, 2014), debido a su sistema enzimático no específico, constituido principalmente por oxidasas. Las enzimas implicadas en estos procesos se conocen también como enzimas ligninolíticas, e incluyen lignina-peroxidasa, manganeso-peroxidasa, glioxal-oxidasa, aril-oxidasa y lacasa; las dos primeras pertenecen al grupo de las peroxidases, que son las enzimas de degradación más estudiadas; y las tres últimas pertenecen al grupo de las fenoloxidasas. En particular la lacasa posee una baja especificidad, por lo que muchas sustancias son sustratos susceptibles de ser catalizadas por estas enzimas, como los difenoles simples, el guayacol y el 2,6-dimetoxifenol; también pueden metabolizar polifenoles sustituidos, aminas aromáticas, bencenodiolos y otros compuestos similares (Tomasini *et al.*, 2005).

3.4. Enzimas fúngicas extracelulares

Las enzimas que participan en las reacciones químicas de las células tienen como función actuar como catalizadores de diversas reacciones químicas que se llevan a cabo en los seres vivos, esto significa que actúan en cantidades muy pequeñas, por lo general permaneciendo sin alteración después de actuar en una reacción y no afectan las concentraciones finales de los productos, pues sólo disminuyen la energía de activación requerida y así aumentan la velocidad de la reacción (Ondarza, 2017).

Como en el caso de todas las proteínas, las instrucciones para su síntesis se encuentran descritas en el genoma del organismo que las posee y son expresadas siguiendo los procesos de la expresión génica; la transcripción y traducción, que se desencadenan como consecuencia de la existencia de señales biológicas particulares para la síntesis de las proteínas requeridas por la célula (Jiménez y Merchant, 2003). Dependiendo de la importancia que represente un tipo de proteínas para el organismo, su síntesis puede ser constitutiva, es decir, su transcripción es constante y no depende de la activación de sus promotores por factores de transcripción especiales, lo que garantiza un suministro adecuado para satisfacer las necesidades celulares. Por otro lado, la síntesis de algunas proteínas puede ser regulada, cuando su presencia y función sólo son necesarias bajo ciertas circunstancias, en donde sus promotores pueden ser reprimidos o inducidos, según sea el caso (Mathews *et al.*, 2002).

Por lo general, las enzimas son un tipo de proteínas descritas estructuralmente como globulares, debido a que requieren de un espacio físico adecuado para ejercer su acción como catalizadores de reacciones bioquímicas celulares, es decir, un sitio activo para la catálisis, lo que logran conformándose como estructuras tridimensionales (3-D). La estructura 3-D es una conformación que se logra a través de las modificaciones postraduccionales que la enzima sufre en su tránsito posterior a la síntesis y que generalmente consiste en plegamientos que se logran mediante la formación de enlaces covalentes tales como los puentes disulfuro, modificaciones N y C terminales, con uniones de grupos glucósilo, fosforilaciones, hidroxilaciones, acilaciones, metilaciones y la unión con otras proteínas (ubiquitinación y sumoilación), en donde una sola enzima puede presentar más de un tipo de modificación. Todas las modificaciones están descritas dentro de la misma secuencia de la proteína y a estas regiones se les denomina secuencias consenso o motivos. La oportunidad que estas modificaciones le brindan a las enzimas consiste, entre otras cosas, en regular su funcionalidad, dirigir su ubicación espacial dentro de la célula y dirigir su interacción con otras proteínas o su acción sobre determinadas moléculas que funcionan como sustratos (Jiménez y Merchant, 2003; Berg, *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2010).

Así mismo, se sabe que la secuencia de aminoácidos de las enzimas, contienen la información puntual que indica si es dentro o fuera de la célula donde llevará a cabo la catálisis de los sustratos. En el segundo caso, se habla de enzimas extracelulares (Murray *et al.*, 2010). En los hongos, la producción de enzimas extracelulares cumple con una variedad de funciones vitales para ellos; transformar o descomponer en compuestos más simples los sustratos del entorno en el que se desarrollan, para obtener sus nutrientes. Otra función descrita, se refiere a una función de defensa o como un elemento que les da ventajas cuando compiten con otros organismos por alimento o hábitat (Deacon, 2006).

Por otra parte, en el caso particular de enzimas que son capaces de ejercer su actividad catalítica sobre sustratos comunes, se presentan dos condiciones. Una son las isoenzimas, las cuales actúan sobre el mismo sustrato, pero poseen diferencias en sus secuencias de aminoácidos, lo que promueve una diferencia en su tamaño al ser evaluadas electroforéticamente. Por otro lado, aquellas enzimas que catalizan la misma reacción y cuentan con la misma secuencia de aminoácidos, pero al probarse mediante electroforesis muestran diferencias en su tamaño, debido a la adición de otros grupos funcionales adquiridos durante el proceso de la modificación postraduccional, son denominadas isoformas (Scandalios, 1974; Griffiths y Black, 1978). En ambos casos, las diferencias resultan en respuestas distintas en el momento de la catálisis cuando funcionan bajo diferentes condiciones de reacción, como pueden ser distintos valores de pH, concentración, temperatura, acción de inhibidores y activadores o inductores que regulan la expresión génica; la cual es de dos tipos: positiva o negativa. Cuando un elemento regulador específico aumenta de manera cuantitativa la expresión de la información genética, se dice que la regulación es positiva; cuando la presencia de un elemento regulador específico disminuye la expresión de la información genética, se considera que la regulación es negativa. Un inductor o activador es una señal reguladora positiva específica, que produce el aumento en la expresión de un gen inducible, este tipo de genes en general tienen índices de transcripción basales relativamente bajos a diferencia de la expresión constitutiva de algunos genes que se expresan a un índice

razonablemente constante, y no se sabe que estén sujetos a regulación (Murray *et al.*, 2010).

3.5. Enzimas lacasas

Un tipo particular de enzimas extracelulares que son producidas por hongos de hábitos saprótrofos y que se aprecian por tener aplicación en diferentes áreas de interés humano está conformado por las oxidorreductasas, de las cuales las lacasas han mantenido un creciente interés, debido a su baja especificidad de sustrato, a que emplean oxígeno como aceptor de electrones y generan agua como subproducto, lo que supone una buena alternativa ecológica para el tratamiento de diversos compuestos xenobióticos (Arregi *et al.*, 2019).

La lacasa (p-benzenediol: oxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2) es una enzima miembro del grupo de proteínas conocidas como azul multicobre oxidasas. Estas proteínas contienen en sus moléculas cuatro átomos de cobre (Figura 3) involucrados en mecanismos de reacción catalítica. El cobre se distribuye de manera diferenciada dentro de la molécula, de acuerdo con estudios espectroscópicos, se clasifican en tres diferentes tipos; tipo 1 o azul, tipo 2 o normal con dos enlaces de histidina y tipo 3 o acoplada con dos núcleos de cobre y tres enlaces de histidina; entre otras que se han descubierto recientemente. Los tipos 2 y 3 están involucrados en la reducción de oxígeno molecular, mientras que el tipo 1 no necesariamente (Montiel-González y Marcial, 2019).

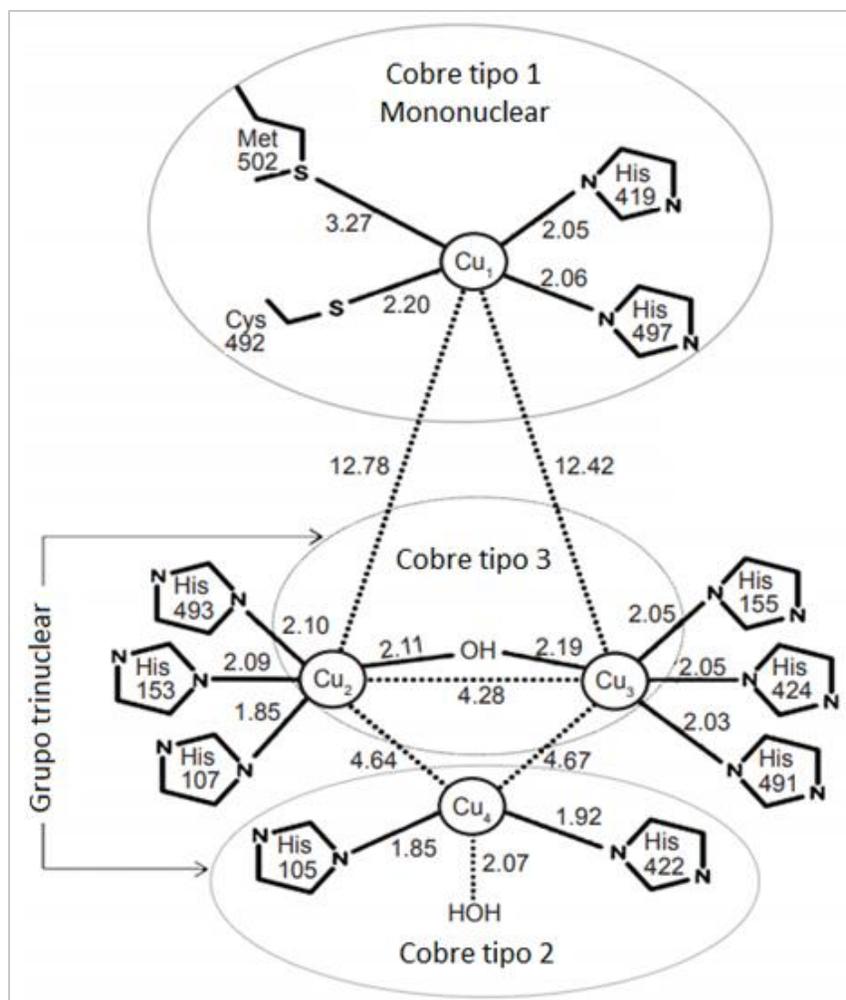


Figura 3. Representación esquemática de los centros coordinados de cobre de lacasa, incluidas las distancias interatómicas entre los ligandos relevantes (Dwivedi *et al.*, 2011).

Las lacasas se han aislado de diversos hongos, las cuales están involucradas en la esporulación, la producción de pigmentos, la formación del cuerpo fructífero, la defensa al estrés, la patogénesis en las plantas y la degradación de la lignina. Las lacasas existen en una variedad de estructuras; la mayoría son monoméricas, pero algunas también homodiméricas, heterodiméricas y multiméricas (Arregui *et al.*, 2019). Están presentes en múltiples isoformas o isoenzimas; las cuales pueden ser expresadas de forma constitutiva o inducida (Bertrand *et al.*, 2013). Con respecto a lo cual se han explorado compuestos que tienen la capacidad de funcionar como inductores en la síntesis de lacasas en una variedad de especies de hongos; algunos de estos compuestos tienen estructuras que son similares o análogas a la

lignina (Bertrand *et al.*, 2014). Existen varios informes sobre la expresión diferencial de lacasas en basidiomicetos fúngicos después de la adición de compuestos fenólicos y cobre a los medios de cultivo (Palmieri *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2002; Lu y Ding, 2010; Goudopoulou *et al.*, 2010; Bertrand *et al.*, 2013; Shrestha *et al.*, 2016; Akpinar y Ozturk-Urek, 2020).

El mecanismo de reacción que ejercen las lacasas fúngicas consisten en la oxidación de un electrón que produce un radical oxi-arilo, por ejemplo, el fenol es oxidado a un radical fenóxilo y el oxígeno molecular es reducido a agua. Las isoenzimas de lacasa muestran diferentes propiedades fisicoquímicas y catalíticas (Montiel-González y Marcial, 2019), por lo que ofrecen varias ventajas de interés para aplicaciones biotecnológicas; ya que son capaces de oxidar diversos compuestos xenobióticos que incluyen: fenoles clorados, tintes sintéticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos y pesticidas (Viswanath *et al.*, 2014).

Cabe mencionar que las lacasas han sido detectadas en diferentes organismos como bacterias, plantas, insectos y hongos, y que a pesar de su distinto origen taxonómico, de los sustratos sobre los que actúan y de las funciones diversificadas, incluidas las antagónicas, en la biosíntesis de lignina (en plantas) y la degradación de lignina (en hongos y bacterias), estructuralmente estos tres tipos de lacasas constan de una arquitectura 3-D similar, sin embargo, en el sitio catalítico tienen diferencias significativas de acuerdo con su diversidad funcional (Figura 4) (Dwivedi *et al.*, 2010). Además, las propiedades bioquímicas de las lacasas varían significativamente; en particular, la especificidad de sustrato de las enzimas es diferente dependiendo de la fuente de lacasa (Glazunova *et al.*, 2018). Debido a esto, no es trivial que el estudio de las estructuras y propiedades bioquímicas de enzimas provenientes de diferentes organismos sea un campo de investigación actual y en creciente desarrollo, pues el conocimiento de estructuras y propiedades diferentes, potencia nuevas aplicaciones a los diferentes recursos encontrados.

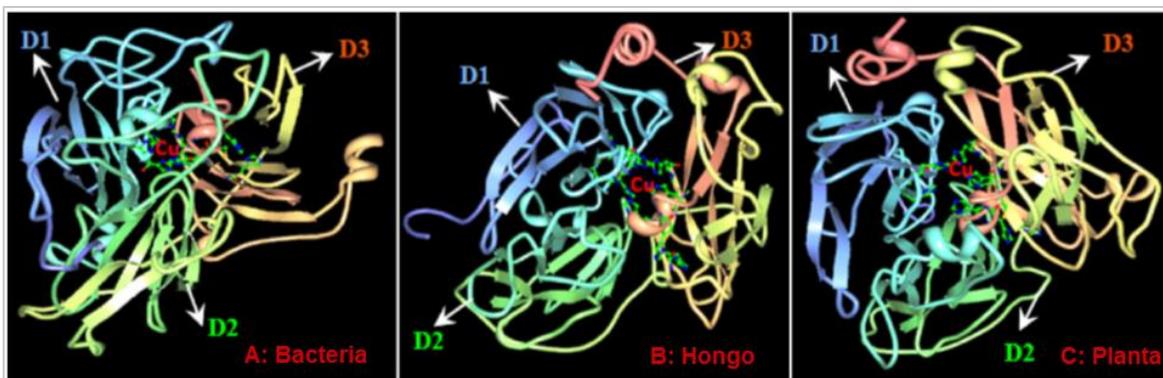


Figura 4. Estructuras tridimensionales de lacasas de (A) bacteria (*Bacillus subtilis*), (B) hongo (*Trametes versicolor*) y (C) planta (*Populus trichocarpa*). D1, D2 y D3 señalan los dominios 1, 2 y 3 respectivamente. El primer dominio presente en la región N-terminal en la lacasa de bacteria tiene una conformación algo distorsionada en comparación con el dominio equivalente en hongos y plantas. En A se muestra, la presencia de una sección en espiral, que conecta el dominio 1 y el dominio 2 en la lacasa de bacteria, la cual está ausente en la de hongo y planta. En hongo y planta, las regiones α -helicoidales cortas conectan el dominio 1 al dominio 2 y el dominio 2 al dominio 3. Estas hélices también conectan cadenas β en la topología de la estructura. El dominio 3 en todas las estructuras modeladas no solo contiene el centro de cobre mononuclear, sino que también contribuye a la formación del sitio de unión del centro de cobre trinuclear, que se encuentra en la interfaz entre los dominios 1 y 3. La región C-terminal se caracteriza por un estiramiento corto de la hélice α (13 residuos), estabilizado por dos puentes disulfuro, el primer puente conecta los dominios 1-3 y el segundo puente disulfuro conecta los dominios 1 y 2. Los motivos de unión al cobre están altamente conservados en las tres lacasas (Dwivedi *et al.*, 2010).

3.6. Importancia de las enzimas lacasas en remediación ambiental

Las lacasas se han utilizado para degradar de manera oxidativa o eliminar varios contaminantes xenobióticos aromáticos, que se encuentran en los desechos industriales y en el suelo o el agua contaminados. Los ejemplos de degradación directa por lacasas incluyen descloración directa, escisión de anillos aromáticos, mineralización de hidrocarburos aromáticos policíclicos y decoloración de tintes textiles. Los contaminantes polimerizados a menudo se vuelven insolubles o inmovilizados, lo que facilita su eliminación por adsorción, sedimentación o filtración (Madhavi y Lele, 2009, Bertrand *et al.*, 2013; Antošová *et al.*, 2017).

Dentro de los compuestos que causan mayores problemas de contaminación encontramos a los colorantes o tintes. Aproximadamente 10,000 colorantes y pigmentos diferentes se producen anualmente en todo el mundo y se utilizan ampliamente en las industrias de teñido e impresión. La producción mundial total de colorantes se estima en 80,000 toneladas por año, y al menos el 10% del colorante

usado entra al medio ambiente a través de los desechos. La mayoría de los tintes son muy estables a la luz, a la temperatura y al ataque microbiano, lo que los vuelve recalcitrantes. Estos efluentes industriales son tóxicos y se caracterizan por altas demandas químicas y biológicas de oxígeno, sólidos suspendidos y color intenso. Los hongos de podredumbre blanca son los organismos ligninolíticos con mayor eficacia en degradar varios tipos de colorantes, como los azoicos, heterocíclicos, reactivos y poliméricos. La capacidad de los hongos ligninolíticos para degradar varios tintes se debe al sistema enzimático extracelular no específico compuesto de lacasas (EC 1.10.3.2), peroxidasas de lignina (EC 1.11.10.14) y manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13) (Madhavi y Lele, 2009). Las lacasas catalizan la oxidación de compuestos tanto fenólicos como no fenólicos y pueden mineralizar una amplia gama de tintes sintéticos (Figura 5) (Bertrand *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2016; Antošová *et al.*, 2017; Arregui *et al.*, 2019).



Figura 5. Ejemplo de degradación de colorante sintético. Degradación del colorante rojo ácido 88 por el hongo *Phanerochaete chrysosporium* (Deveci *et al.*, 2016).

Entre otros compuestos de efecto tóxico, están los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) que son compuestos orgánicos que comprenden anillos de benceno dispuestos linealmente, angulares o en racimos. Estos son contaminantes ambientales ubicuos que se encuentran en aire, suelo y agua. La mayoría son tóxicos para diversos organismos vivos, y algunos de ellos, en conjunto con sus metabolitos, son mutagénicos y cancerígenos para los seres humanos. Los HAPs son resistentes a la biodegradación y, por lo tanto, tienden a acumularse a niveles

altos en el ambiente, lo que causa su detección en una amplia gama de suelos y sedimentos, en particular los de cuatro y cinco anillos tienen una solubilidad muy baja en agua, y a menudo, están estrechamente unidos a las partículas del suelo lo que da como resultado una biodisponibilidad muy baja para la degradación bacteriana (Levin *et al.*, 2003; Madhavi y Lele, 2009).

Sin embargo, los hongos de pudrición blanca mediante las enzimas extracelulares ligninolíticas como las peroxidases de lignina, manganeso peroxidases y lacasas, pueden oxidar HAPs a sus quinonas correspondientes y posteriormente degradarlas a CO₂. Por ejemplo, se ha encontrado que una lacasa de *Trametes versicolor* oxida la mayoría de los 16 HAPs numerados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos como principales sustancias químicas contaminantes. El benzo[α]pireno y el perileno se convierten parcialmente en productos poliméricos; pequeñas cantidades de quinonas y cetonas son los principales productos de oxidación del antraceno, benzo[α]pireno y fluoreno; la lacasa en combinación con 1-hidroxibenzotriazol oxida acenafteno y acenaftileno a 1,2-acenaftenediona y ácido 1,8-haftílico (Madhavi y Lele, 2009).

Otros compuestos que se conocen por su efecto carcinogénico y mutagénico y que son persistentes en el ambiente son los bifenilos policlorados (PCBs), como la atrazina y los clorofenoles. Se han estudiado algunos hongos en la degradación de estos compuestos. Keum y Li (2004) probaron enzimas lacasas de *Trametes versicolor* y de *Pleurotus ostreatus* para degradar PCBs y encontraron que la lacasa de *Trametes versicolor* los degrada más rápidamente que la de *Pleurotus ostreatus*, también que al aumentar el número de cloros, la tasa de degradación disminuye y concluyeron que el 3-hidroxi bifenilo era más resistente a la degradación de lacasa que los análogos 2 o 4-hidroxi bifenilo. De igual manera, *Trametes versicolor* se ha utilizado en la biorremediación de atrazina en suelos con bajo contenido de humedad y compuestos orgánicos que normalmente se encuentran en ecosistemas semiáridos y de tipo mediterráneo (Bastos y Magan, 2009). Se ha mostrado que una enzima lacasa obtenida de *Trametes villosa* puede degradar el 2,4-diclorofenol en suelo (Shraddha *et al.*, 2011).

En muchos de los estudios se atribuye la degradación de los compuestos al conjunto de enzimas extracelulares producidas en los cultivos de prueba y se asume la participación predominante de algunas de ellas, como es el caso de las enzimas lacasas; sin embargo, es necesario confirmar la acción transformadora que dichas enzimas ejercen, para esclarecer los mecanismos implicados en el proceso de transformación y potenciar de este modo el desarrollo de tecnología ambiental basada en la acción de estas enzimas. El principal desafío para el campo de la biorremediación enzimática es la selección de las enzimas óptimas enfocadas en un compuesto particular, así como el establecimiento de condiciones fisicoquímicas de operación para el proceso de biorremediación (Montiel-González y Marcial, 2019), por lo cual en este trabajo se pretende caracterizar las enzimas con actividad lacasa producidas por *Agrocybe pediades* y así sentar las bases para estudios de biorremediación de algunos compuestos específicos sobre los cuales estas enzimas puedan realizar su acción catalítica.

4. Antecedentes

A continuación se presentan algunos estudios que muestran un panorama general acerca de las características de lacasas provenientes de diferentes hongos.

4.1. Actividad enzimática lacasa

Rodríguez *et al.* (2002) describen el comportamiento de la actividad enzimática lacasa del hongo *Pleurotus ostreatus*, para diferentes tiempos de crecimiento y en dos cultivos líquidos: vinaza de destilería (V) y extracto acuoso de la pasteurización de pulpa de café (ELP); observaron los mayores valores de actividad enzimática en vinaza para diez días de fermentación. Así mismo, la enzima fue purificada; se obtuvieron buenos valores de rendimiento y se observó la posible presencia de dos isoenzimas al realizar el espectro UV-V del producto final de la purificación; también

evaluaron la actividad enzimática al añadir cobre a los medios de cultivo, observándose un aumento significativo de la actividad en el ELP.

4.2. Purificación y caracterización de lacasas

Daroch *et al.* (2014) purificaron y caracterizaron dos lacasas amarillas glicosiladas del hongo *Stropharia aeruginosa* y probaron la degradación de varios colorantes; concluyeron que las lacasas amarillas de *Stropharia aeruginosa* muestran especificidades de sustrato y propiedades bioquímicas típicas de otras lacasas, y que al comparar secuencias de lacasas no encuentran un claro patrón de aminoácidos con respecto a lacasas azules, lo cual suponen puede explicar la diferencia de color entre lacasas amarillas y azules al darse un plegamiento alternativo que cause diferencias en el sitio de cobre T1.

4.3. Propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales de lacasas

Kameshwar *et al.* (2017) analizaron las propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales de lacasas de hongos de pudrición blanca, marrón y blanda, también realizaron modelos tridimensionales de éstas; observando que los hongos de pudrición blanca y marrón exhibieron eficiencias de unión claras y fuertes hacia los compuestos del tipo de la lignina en comparación con las lacasas de hongos de pudrición blanda; también observaron que las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los hongos de pudrición blanda mostraron pocas pero significativas diferencias en comparación con los de pudrición blanca y marrón.

4.4. Comparación catalítica de lacasas

Glazunova *et al.* (2018) purificaron enzimas lacasas de los hongos basidiomicetos de pudrición blanca *Junghuhnia nitida* y *Steccherinum bourdotii* y compararon sus propiedades con las de lacasas de *Trametes hirsuta* y *Coriolopsis caperata*;

encontraron diferencias significativas entre las propiedades fisicoquímicas de las lacasas, como la temperatura máxima, la temperatura óptima, el pH óptimo con distintos sustratos y el contenido de carbohidratos. Sus pesos moleculares fueron de 63 kDa excepto para la lacasa de *T. hirsuta* que tuvo un peso molecular de 66 kDa. Las lacasas de *T. hirsuta* y *C. caperata* decoloraron de manera más eficiente el compuesto Azure B con respecto a las lacasas de *S. bourdotii* y *J. nitida* (Figura 6) lo cual atribuyen a que los potenciales de óxido reducción de las lacasas de *T. hirsuta* y *C. caperata* son mayores que los de las lacasas de *S. bourdotii* y *J. nitida*. Midieron parámetros cinéticos K_m y K_{cat} de las cuatro lacasas con distintos compuestos (ABTS, pirocatecol, ácido gálico, guayacol, ácido ferúlico, pinosresinol, 2,6-dimetoxifenol, ácido sinapínico y siringaldazina) y obtuvieron que la lacasa de *C. caperata* tuvo mayor afinidad por el sustrato siringaldazina, menor por el sustrato pirocatecol y fue la que tuvo mayor afinidad por el sustrato ABTS; la lacasa de *T. hirsuta* tuvo mayor afinidad al sustrato ácido sinapínico, menor por el sustrato ácido gálico y fue la que tuvo mayor afinidad al sustrato pinosresinol; la lacasa de *S. bourdotii* tuvo mayor afinidad al sustrato siringaldazina, menor afinidad al sustrato guayacol y fue la que tuvo mayor afinidad al sustrato ácido sinapínico; y la lacasa de *J. nitida* tuvo mayor afinidad al sustrato siringaldazina, menor al sustrato ácido gálico y fue la que tuvo mayor afinidad a los sustratos 2,6-dimetoxifenol, pirocatecol y guayacol.

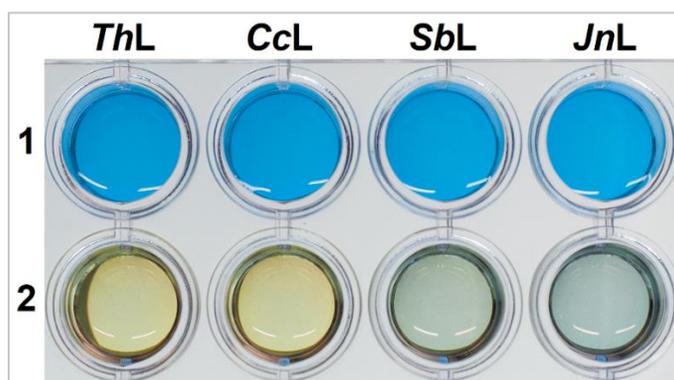


Figura 6. Decoloración de Azure B por distintas lacasas. La fila 1 corresponde al colorante Azure B y la fila 2 al colorante Azure B con adición de la enzima lacasa indicada en la parte superior de cada columna. *ThL* es la enzima lacasa de *Trametes hirsuta*, *CcL* la enzima lacasa de *Corioloopsis caperata*, *SbL* la enzima lacasa de *Steccherinum bourdotii* y *JnL* es la enzima lacasa de *Junghuhnia nitida* (Glazunova et al., 2018).

4.5. *Agrocybe pediades*

Como antecedente directo de este trabajo se tiene el realizado por Torres-González (2017), quien seleccionó la cepa CIGyA-002 de *Agrocybe pediades* un hongo saprófito recolectado y aislado de un bosque perturbado de *Juniperus deppeana* ubicado en el municipio de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, Tlaxcala (Figura 7). En una fase inicial del trabajo, la cepa fue cultivada en cinco medios sólidos con diferentes composiciones de nutrimentos a los cuales se les añadieron los sustratos: 2,6-dimetoxifenol (DMP) para la determinar la presencia de la enzima lacasa; DMP + MnSO₄ + H₂O₂ para evidenciar la presencia de la enzima manganeso peroxidasa; y carboximetilcelulosa teñida con rojo Congo para confirmar la presencia del complejo enzimático de celulasas. Se evaluaron los parámetros de velocidad de crecimiento e índice de potencia. Con lo cual se determinó el medio de cultivo que se utilizó para realizar los cultivos en líquido para la segunda fase en la que se evaluaron los parámetros de biomasa, pH, actividad enzimática lacasa, manganeso peroxidasa y perfil de enzimas, usando la cepa PoB de *Pleurotus ostreatus*, productor conocido de dichas enzimas, como referente. La máxima actividad lacasa que mostró *A. pediades* fue de 16.40 UI/mg y de manganeso peroxidasa de 149.25 UI/mg. Además, se expresaron dos enzimas con actividad lacasa localizadas a la altura del marcador de peso molecular para proteínas de 72 y 95 kDa y una enzima con actividad manganeso peroxidasa posicionada a la altura de 72 kDa del marcador. *P. ostreatus* expresó una isoenzima de lacasa y una de manganeso peroxidasa localizadas a la altura de 36 kDa en el marcador. Las medias de los parámetros evaluados de la cepa de *A. pediades* y *P. ostreatus* mostraron diferencias significativas en todos los parámetros evaluados. Las enzimas producidas por *A. pediades* aparentemente son de mayor tamaño, lo que podría estar indicando que son proteínas más grandes o cuentan con mayor nivel de glicosilación para protección de la enzima para poder realizar su función, probablemente a consecuencia de las condiciones de perturbación del ambiente del que provienen. Finalmente, se han realizado experimentos que muestran que *A. pediades* tiene la capacidad para crecer en presencia de hexaclorobenceno (Hernández-Sirio, 2021).

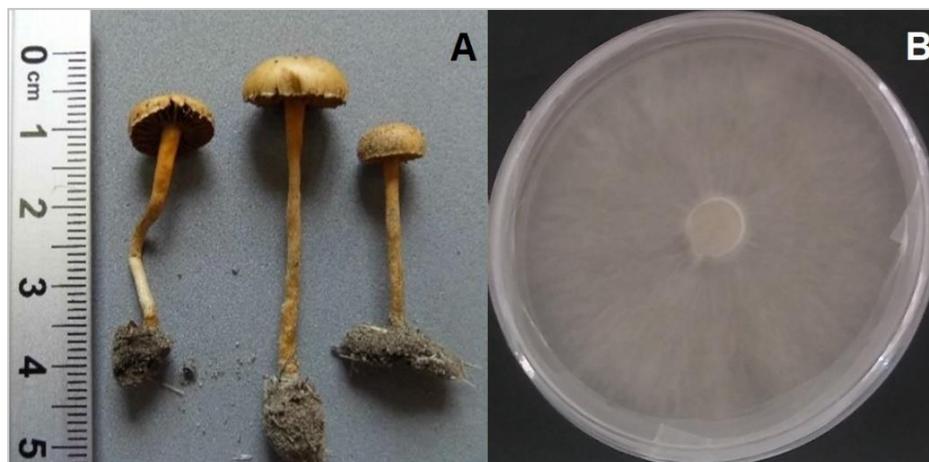


Figura 7. (A) Basidiomas de *Agrocybe pediades* recolectados de un bosque de *Juniperus deppeana* de Ixtacuixtla, Tlaxcala (Ortega-Ávila, 2018). (B) Micelio de *Agrocybe pediades* en extracto de malta agar, cepa CIGyA-002.

En este trabajo se pretende determinar si al añadir cobre o hexaclorobenceno al medio de cultivo líquido, en *Agrocybe pediades* se induce la expresión de otras enzimas con actividad lacasa y/o incrementa la producción de éstas; además de realizar la caracterización de las enzimas con actividad lacasa con la finalidad de inferir sus capacidades catalíticas.

5. Justificación

Considerando la relevancia que tienen las enzimas lacasas como una alternativa ecológica para el tratamiento de compuestos xenobióticos aromáticos presentes en ambientes acuáticos y terrestres; generados por el procesamiento de productos industriales y el uso de agroquímicos, y que las capacidades catalíticas de las enzimas lacasas dependen de sus características estructurales particulares, las cuales difieren dependiendo de los distintos organismos que las sintetizan, como es el caso de distintas especies de hongos, es de gran importancia el estudio de estas características y sus capacidades en enzimas de organismos silvestres que se desarrollan en ambientes perturbados, con la finalidad de sentar las bases para futuras investigaciones, en particular, en el campo de la recuperación de suelos contaminados. Por esta razón, en esta investigación se realizó la caracterización de

una enzima con actividad lacasa producida por *Agrocybe pediades* y se exploró si el cobre y el hexaclorobenceno tienen un efecto inductor o potenciador de enzimas con actividad lacasa en esta especie.

6. Preguntas de investigación

En este trabajo de investigación se pretenden encontrar las respuestas a las siguientes preguntas:

¿El cobre y el hexaclorobenceno inducen la producción o aumentan la actividad de enzimas lacasa extracelulares en *Agrocybe pediades*?

¿Cuáles son las características funcionales de las enzimas con actividad lacasa producidas por *Agrocybe pediades*?

7. Objetivo general

Determinar si el cobre y hexaclorobenceno incrementan la producción de enzimas con actividad lacasa por *Agrocybe pediades* en medio líquido, y realizar la caracterización funcional de la enzima con actividad lacasa expresada de manera más constante.

8. Objetivos específicos

1. Describir la expresión de enzimas con actividad lacasa producidas por *Agrocybe pediades* en medio líquido con la presencia de cobre y hexaclorobenceno; por medio de la medición de la actividad lacasa específica en el extracto crudo enzimático extracelular y zimografía, para determinar si el cobre y hexaclorobenceno inducen la producción o aumentan la actividad de enzimas lacasa extracelulares en *A. pediades*.

2. Determinar las condiciones para la purificación de las enzimas con actividad lacasa producidas por *A. pediades* mediante cromatografía líquida de proteína de alta velocidad (FPLC), con la finalidad de purificar la enzima con actividad lacasa expresada de manera más constante.
3. Caracterizar funcionalmente la enzima con actividad lacasa producida por *A. pediades* expresada de manera más constante; en cuanto a su actividad enzimática determinado su estado nativo, curva de pH, efecto de la temperatura y parámetros cinéticos, para sentar las bases de futuras investigaciones sobre esta enzima y *A. pediades* en el campo de la remediación ambiental.

9. Metodología

En la Figura 8 se muestra un esquema de la metodología que se siguió en la presente investigación, cada uno de los pasos se explican a continuación.

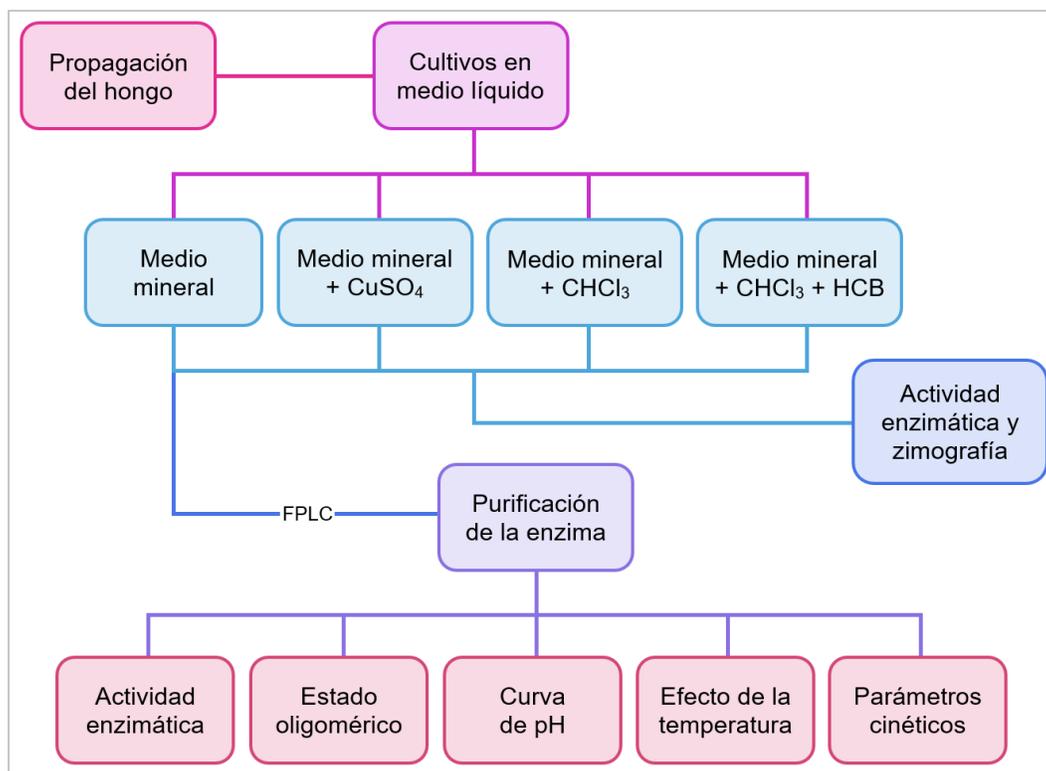


Figura 8. Esquema de la metodología general de la investigación.

9.1. Organismo de estudio

El organismo de estudio es el hongo saprótrofo *Agrocybe pediades* un basidiomiceto del orden Agaricales y la familia Strophariaceae. En esta investigación se emplea la cepa CIGyA-002 aislada de un bosque de *Juniperus deppeana* ubicado en el municipio de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros del estado de Tlaxcala, la cual forma parte de la colección de cepas fúngicas del Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y cuenta con número de registro CM-CNRG 700 de la Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP.

9.2 Propagación del hongo

El hongo se propagó en cajas de Petri con 20 mL de medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA), siguiendo las instrucciones del proveedor (BD Difco™ Malt Extract Agar). Se inocularon las cajas y se incubaron a 25 °C durante 15 días, después se cortaron pequeños cilindros con un horadador y se conservaron en tubos Eppendorf con glicerol al 15% a 4 °C como lo reportó Ortega-Ávila (2017), para su uso en las siguientes propagaciones. Para el inóculo del cultivo en medio líquido se propagó el hongo en 20 cajas de Petri con 20 mL de medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA).

9.3. Cultivo en medio líquido

El medio de cultivo líquido empleado para el crecimiento del hongo, fue un medio mineral que contenía glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno (Tabla 1), con cuatro condiciones diferentes: solo el medio mineral, con sulfato de cobre y con HCB (disuelto en CHCl_3) para probar si inducen o aumentan la producción de enzimas con actividad lacasa y con CHCl_3 como control del efecto del disolvente. Esto se llevó a cabo realizando el inóculo en matraces Erlenmeyer de 125 mL, que contenían 50 mL del medio líquido y se

incubaron con agitación orbital constante a 115 rpm a 27 °C, durante 13 días, tiempo en el cual se ha reportado, en este medio, que el hongo ya se encuentra en fase estacionaria (Torres-González, 2017).

Tabla 1. Composición del medio de cultivo líquido empleado en el estudio (Téllez-Téllez *et al.*, 2008).

Compuesto	Cantidad	Concentración
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10 g/L	55.51 mM
Extracto de levadura	0.6 g/L	
KH ₂ PO ₄	0.6 g/L	4.41 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g/L	2.03 mM
K ₂ HPO ₄	0.4 g/L	2.30 mM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g/L	0.18 mM
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.05 g/L	0.30 mM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.001 g/L	0.0035 mM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0031 g/L	0.0124 mM
C ₆ Cl ₆ (HCB)	0.0003 g/L	0.0105 mM
CHCl ₃	1 mL/L	12.48 mM

El diseño experimental se realizó en bloques al azar con 4 réplicas donde el tratamiento está dado por la presencia del sulfato de cobre, cloroformo y hexaclorobenceno y los bloques están determinados por el tiempo de incubación.

Al inicio del cultivo y a partir de las 72 h, se tomó una muestra aleatoria de cuatro matraces por tratamiento cada 48 h, hasta llegar al día 13 de cultivo, por lo que fueron requeridos 112 matraces (Figura 9); esto se consideró con base en el trabajo de Torres-González (2017), quien obtuvo mayor actividad lacasa entre los días 2 al 14, observando que no hubo diferencias significativas entre los muestreos realizados cada 24 horas. A partir de cada matraz se filtró el micelio producido, empleando papel filtro Whatman No. 1 estéril, un matraz Kitasato y una bomba de vacío, con lo cual se obtuvo el extracto crudo enzimático extracelular (ECEE). Los extractos se almacenaron en tubos falcón de 50 mL de capacidad y se resguardaron a -20 °C hasta el momento de su análisis. El micelio filtrado se secó para obtener el peso seco de la biomasa generada y se determinó la constante específica de velocidad de crecimiento (μ) para cada uno de los tratamientos, la cual se obtuvo mediante la fórmula:

$$\mu = \frac{\ln B_2 - \ln B_1}{t_2 - t_1}$$

Donde B_1 y B_2 son los pesos de la biomasa seca para los tiempos de cultivo t_1 y t_2 respectivamente (Madigan *et al.*, 2015), los cuales corresponden a los extremos del segmento de la curva de crecimiento donde se presenta la velocidad de crecimiento máxima. Se realizó análisis de varianza para ver si existían diferencias significativas entre tratamientos, con una significancia de $\alpha=0.05$. Los cálculos se realizaron de forma manual con apoyo del programa Microsoft Excel (2011) y las gráficas en el programa OriginPro (2010).

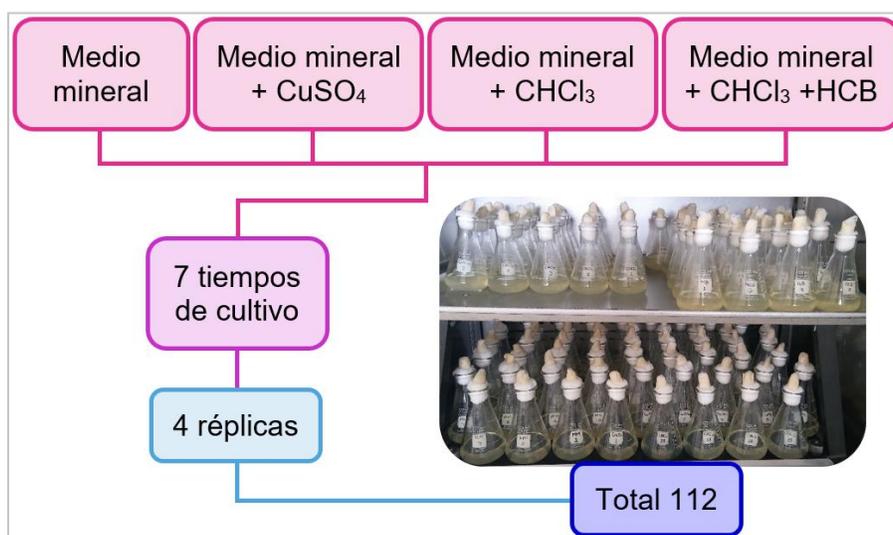


Figura 9. Diseño experimental que consiste en cuatro tratamientos de cultivo en medio líquido, siete tiempos de cultivo con cuatro réplicas cada uno.

9.4. Análisis de actividad enzimática y zimografía

Para evaluar la actividad enzimática extracelular se empleó el extracto crudo enzimático extracelular (ECEE), midiendo el cambio de absorbancia de luz por la oxidación del sustrato, detectado en un espectrofotómetro marca JENWAY 6715 UV/Vis Spectrophotometer. La cuantificación de la actividad enzimática se indica en Unidades Internacionales (UI), donde 1 UI se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μM de 2,6-dimetoxifenol en producto por minuto. Para la cuantificación de la actividad lacasa se empleó un blanco de calibración que constó de 200 μL de agua destilada estéril y 800 μL de 2,6-dimetoxifenol 2 mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.5. La mezcla de reacción consistió

en 200 μL de ECEE y 800 μL de 2,6-dimetoxifenol 2 mM. La reacción se incubó durante 4 minutos a 39 °C y se leyó la absorbancia a 468 nm (Sharma *et al.*, 2016). Se midió la proteína total en el ECEE, empleando el método de Lowry *et al.* (1951); en un volumen de 200 μL de la muestra de ECEE se le adicionó 1 mL de reactivo Lowry, esta mezcla se agitó en vórtex y se incubó durante 15 min a 25 °C, después se adicionaron 100 μL del reactivo Folin-Cicalteau, y la muestra fue agitada en vórtex y se incubó en obscuridad durante 30 min a 25 °C; posteriormente, se midieron los valores de absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro marca JENWAY 6715 UV/Vis Spectrophotometer. El blanco consiste en 200 μL de agua destilada estéril, 1 mL de reactivo Lowry, 100 μL del reactivo Folin-Cicalteau, al cual se le aplica el mismo procedimiento. Para la curva patrón se emplearon distintas concentraciones de albúmina bovina diluida en agua destilada y se siguió el mismo procedimiento.

La actividad enzimática específica se calculó con la siguiente fórmula:

$$A = \frac{m}{\varepsilon \cdot \text{proteína}}$$

Donde

m: es la pendiente del cambio en la absorbancia con respecto al tiempo en minutos.

ε : es el coeficiente de extinción molar, que en este caso para el 2,6-dimetoxifenol es de 0.0496 $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

proteína: es la cantidad en mg de proteína en la mezcla de reacción.

Se realizó un análisis de varianza para cada tiempo de muestreo, para ver si existen diferencias significativas en la actividad lacasa específica entre los cuatro tratamientos. También se realizó un análisis de varianza bidimensional para ver si existían diferencias significativas en la actividad lacasa entre los tiempos de muestreo, con una significancia de $\alpha=0.05$; y en caso de existir diferencias significativas se realizó una prueba post hoc de Tukey. Los cálculos se realizaron de forma manual con apoyo del programa Microsoft Excel (2011) y las gráficas en el programa OriginPro (2010).

A partir del ECEE se realizó la búsqueda de enzimas con actividad lacasa en una matriz polimérica. Se empleó la técnica de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condición semi desnaturalizante, para la obtención de zimogramas. La concentración de la acrilamida es del 4% en el gel de empaquetamiento y del 11% en el gel de corrimiento. Los zimogramas se revelaron utilizando el sustrato 2,6-dimetoxifenol 2 mM, en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH de 6.5.

9.5. Purificación de la enzima con actividad lacasa

Para realizar la purificación de las enzimas con actividad lacasa producidas por *A. pedicades* primero se concentró el ECEE correspondiente al tiempo de cultivo en el cual se detectó mayor actividad lacasa específica, en tubos concentradores Millipore Amicon™ Ultra-15 de 30000 MWCO (Merck™), centrifugando a $1700 \times g$ hasta lograr la mayor concentración de proteína posible. La purificación de la enzima con actividad lacasa se llevó a cabo mediante el método de cromatografía líquida de proteína de alta velocidad (FPLC) acoplado a un sistema de purificación Amersham Pharmacia Biotech AKTA FPLC, con una columna de exclusión Sephacryl 200, equilibrada con solución amortiguadora de fosfato de sodio dibásico 50 mM, pH 7.35. Entonces, se inyectaron 500 μL del ECEE concentrado y se eluyeron las proteínas de la columna de exclusión molecular con la misma solución amortiguadora de equilibrio, a un flujo de 0.5 mL/min y se colectaron fracciones de 500 μL cada una. Posteriormente, se midió actividad lacasa para cada una de las fracciones de manera proporcional a lo mencionado en la sección 9.4, con un volumen total de 200 μL . Usando como blanco 160 μL de 2,6-dimetoxifenol 2 mM y 40 μL de agua destilada y la mezcla de reacción consistió en 160 μL de 2,6-dimetoxifenol 2 mM como sustrato y 40 μL de fracción proteica. Se midió la absorbancia cada 30 segundos a 468 nm y a 39 °C en un espectrofotómetro MULTISKAN GO (Thermo Fisher SCIENTIFIC). Las fracciones proteicas consecutivas que presentaron actividad lacasa se unieron y se concentraron en tubos concentradores Ultra-15 de 30000 MWCO (Millipore Amicon™).

9.6. Caracterización funcional de la enzima con actividad lacasa

La enzima con actividad lacasa purificada se caracterizó en cuanto a su actividad enzimática sobre de 2,6-dimetoxifenol, determinando el estado nativo de la enzima, curva de pH, efecto de la temperatura y parámetros cinéticos (K_m y V_{max}).

9.6.1. Determinación del estado nativo de la enzima con actividad lacasa

El estado nativo de la enzima purificada del extracto enzimático crudo extracelular de *A. pediades* se determinó usando cromatografía de filtración en gel (GFC). El extracto proteico proveniente de la purificación de la enzima (el extracto obtenido al unir y concentrar las fracciones proteicas consecutivas que presentaron actividad en la fase de purificación) se cargó a una columna de filtración en gel sephacryl 200 (16/60) (GE Healthcare, Reino Unido) pre-equilibrada con solución amortiguadora de fosfato de sodio dibásico 50 mM, pH 7.35. La proteína se eluyó utilizando la misma solución amortiguadora de equilibrio a un flujo de 0.3 mL/min, monitoreando la señal de absorbancia a 280 nm. Después, se midió actividad lacasa a cada una de las fracciones de acuerdo con lo reportado en la sección 9.5. Usando las mismas condiciones para la enzima lacasa, se cargaron los estándares de filtración en gel # 151-1901 (Bio-Rad). En ambos casos, la columna se acopló al sistema de cromatografía líquida de proteína de alta velocidad (FPLC) AKTA (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.).

9.6.2. Curva de pH

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad de la enzima con actividad de lacasa de *A. pediades*, se midió la actividad en un intervalo de pH de 3.0 a 7.5 usando cuatro sistemas de amortiguadores diferentes: amortiguador McIlvaine (pH 3.0-6.0), amortiguador MES 50 mM (pH 6.0-6.75), amortiguador HEPES 50 mM (pH 6.75-

8.0), y amortiguador Tris 50 mM (pH 8.0-9.0). Se determinó la actividad lacasa, en un volumen total de 200 μ L, con 2 μ L de la enzima purificada (3.55 mg/mL de proteína) y 198 μ L de la mezcla de 2,6-dimetoxifenol con el amortiguador correspondiente al rango de pH. Se midió la absorbancia cada 30 segundos a 468 nm y a 39 °C en el espectrofotómetro MULTISKAN GO (Thermo Fisher SCIENTIFIC).

9.6.3. Efecto de la temperatura sobre la enzima con actividad lacasa

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima con actividad de lacasa de *A. pediades*. Se realizó un ensayo donde una concentración de 3.55 mg/mL de la enzima purificada se incubó a diferentes temperaturas, entre 20 a 80 °C durante 20 minutos de acuerdo con el método previamente reportado por Gómez-Manzo *et al.* (2014), y posteriormente se determinó la actividad lacasa de la misma forma mencionada en la sección 9.5, con en el espectrofotómetro MULTISKAN GO (Thermo Fisher SCIENTIFIC). La actividad residual se expresó en porcentaje. La muestra que fue incubada a 20 °C se ajustó al 100% de actividad enzimática. Todos los ensayos de inactivación térmica se realizaron por triplicado.

9.6.4. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima con actividad lacasa

Para la determinación de los parámetros cinéticos experimentales de estado estacionario, para la enzima con actividad de lacasa de *A. pediades*; se realizó la curva de saturación graficando los valores de la velocidad de la reacción enzimática para distintas concentraciones de sustrato, desde 0 hasta 2 mM. Se encontró la velocidad de la reacción enzimática con 2.5 μ L (8.875 μ g totales de proteína) de la enzima purificada y 197.5 μ L de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 5.0 con las diferentes concentraciones de 2,6-dimetoxifenol. La absorbancia se midió cada 30 segundos a 468 nm y a 39 °C en el espectrofotómetro MULTISKAN GO

(Thermo Fisher SCIENTIFIC). Con la velocidad inicial obtenida para cada concentración de sustrato se realizó, en el programa OriginPro (2010), mediante el cálculo del recíproco de cada dato para linealizar y la aplicación del método de mínimos cuadrados (Gómez-Manzo *et al.*, 2014), el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten (Berg *et al.*, 2007):

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Donde

V_0 : es la velocidad de la reacción al inicio de ésta.

V_{\max} : es la velocidad máxima de la reacción.

$[S]$: es la concentración del sustrato.

K_m : es la constante de Michaelis; para la cual se cumple que si $[S] = K_m$, entonces

$$V_0 = \frac{V_{\max}}{2}$$

A partir de la ecuación resultante del ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten se obtuvieron los parámetros cinéticos de la enzima K_m y V_{\max} . Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

10. Resultados

10.1 Descripción de la expresión de enzimas con actividad lacasa producidas por *Agroclybe pediades* en medio líquido con la presencia de cobre y hexaclorobenceno

10.1.1. Cultivo en medio líquido y actividad enzimática lacasa

Los resultados de la generación de biomasa se muestran en la Figura 10. Se observa que, a las 72, 168, 216 y 264 horas de cultivo no hubo diferencias significativas en la generación de biomasa entre los tratamientos ($F=2.87, 1.72, 0.54$

y $2.34 < F_{\alpha(3,12)}=3.49$). Solo se presentaron diferencias significativas a las 120 h de cultivo ($F=8.13 > F_{\alpha(3,12)}=3.49$) del tratamiento con adición de CHCl_3 con respecto a los tratamientos cultivo en medio mineral y cultivo con adición de CuSO_4 , pero sin diferencias significativas de estos con el tratamiento con adición de $\text{CHCl}_3 + \text{HCB}$. A las 312 h de cultivo, se observa que el tratamiento que contenía medio mineral más CuSO_4 fue el que menor biomasa generada presentó ($1.67 \pm 0.14 \text{ g/L}$), con valores de biomasa generada similares al cultivo en medio mineral control ($1.75 \pm 0.18 \text{ g/L}$); mientras que el tratamiento que contiene CHCl_3 fue el cultivo donde mayor cantidad de biomasa se presentó con $2.06 \pm 0.13 \text{ g/L}$, seguido por el tratamiento que contiene $\text{CHCl}_3 + \text{HCB}$ con $1.88 \pm 0.22 \text{ g/L}$. Sin embargo, solo hubo diferencias significativas entre el tratamiento de cultivo con adición de CHCl_3 con respecto al tratamiento de cultivo con adición de CuSO_4 y no existen diferencias significativas de estos tratamientos con respecto a los tratamientos cultivo en medio mineral y cultivo con adición de CHCl_3+HCB .

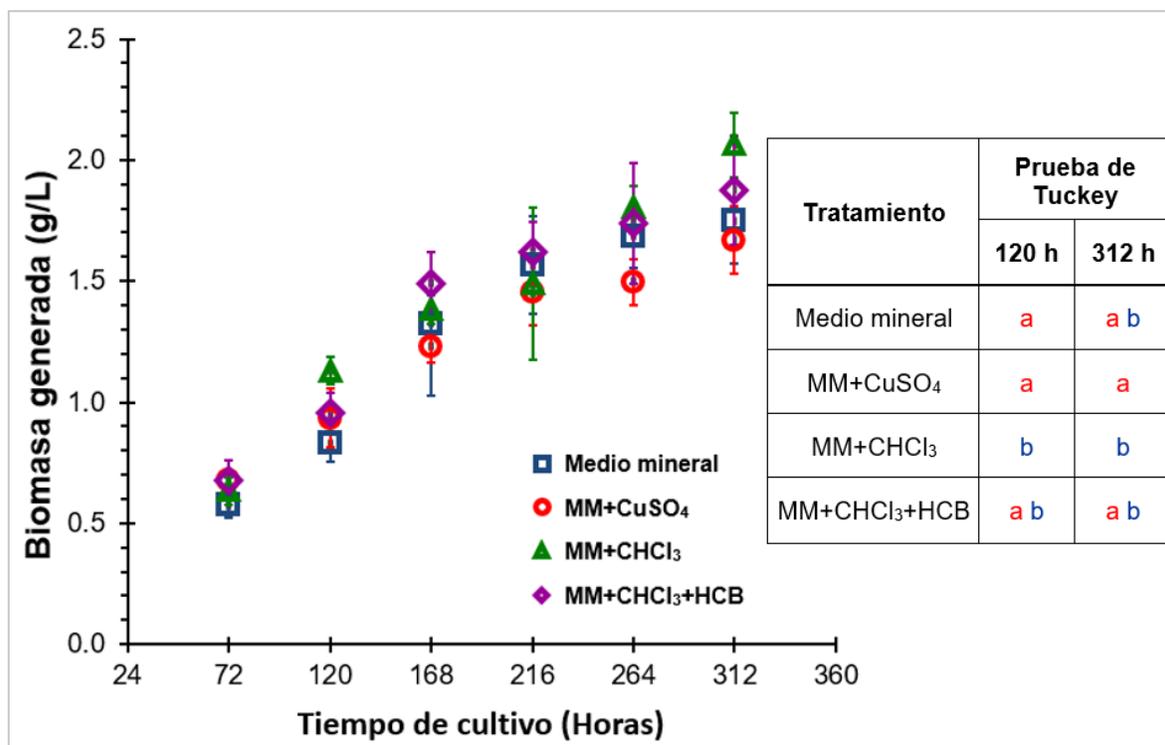


Figura 10. Generación de biomasa de *Agrocybe pediades* en cada uno de los tratamientos estudiados. El valor mostrado corresponde al promedio \pm SD del peso seco de la biomasa generada en g/L de las cuatro réplicas realizadas. MM+CuSO₄ es el tratamiento de cultivo en medio mineral con adición de CuSO₄, MM+CHCl₃ es el tratamiento de cultivo en medio mineral con adición de

CHCl₃ y MM+CHCl₃+HCB es el tratamiento de cultivo en medio mineral con adición de CHCl₃ y HCB. En la tabla de la derecha se muestran los resultados de la prueba de Tuckey para los tiempos de cultivo en los cuales hubo diferencias significativas entre algunos tratamientos, letras diferentes significa que existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

Para tener una mejor perspectiva del crecimiento de *A. pediades* en los cuatro medios de cultivo se procedió a calcular la constante de la velocidad específica de crecimiento (μ) de los cuatro tratamientos (Figura 11). Con el análisis de varianza se obtuvo que no hay diferencias significativas entre las constantes específicas de velocidad de crecimiento de los cuatro tratamientos ($F=3.31 < F_{\alpha(3,12)}=3.49$). Es decir que, a pesar de tener ligeras diferencias en la biomasa generada entre los 4 tratamientos en algunos tiempos de cultivo, el hongo *A. pediades* crece a la misma velocidad en los cuatro tratamientos analizados. Esto significa que los compuestos adicionados al medio de cultivo no tienen un efecto negativo sobre la generación de biomasa de *A. pediades*, por lo que los cambios que pudieran existir en la actividad enzimática se deben a los cambios en la expresión de las enzimas que se inducen o reprimen y no directamente de la biomasa generada.

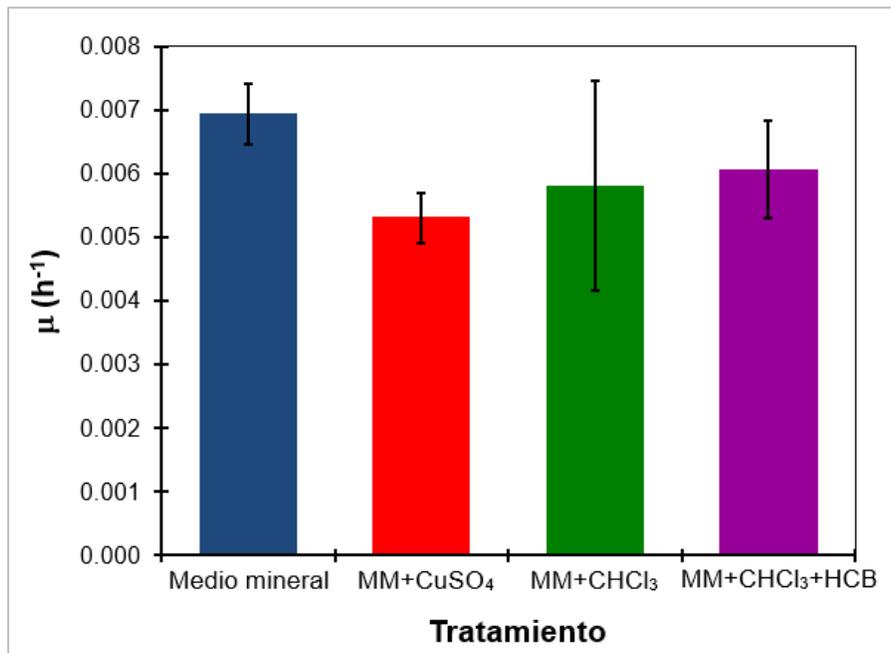


Figura 11. Constante específica de velocidad de crecimiento (μ) de los cuatro tratamientos. Cada barra representa el promedio \pm SD de la constante específica de crecimiento de las cuatro réplicas

que se realizaron de cada tratamiento. MM+CuSO₄ es el tratamiento de cultivo en medio mineral con adición de CuSO₄; MM+CHCl₃ es el tratamiento de cultivo en medio mineral con adición de CHCl₃ y MM+CHCl₃+HCB es el tratamiento de cultivo en medio mineral con adición de CHCl₃ y HCB.

Posteriormente, se midió la actividad lacasa del extracto crudo enzimático extracelular (ECEE) en cada una de las muestras obtenidas desde las 72 h las 312 h de crecimiento del cultivo de cada uno de los 4 tratamientos. Como se observa en la Figura 12, se encontró actividad enzimática lacasa específica en los cuatro tratamientos, presentándose la mayor actividad a las 216 h de cultivo. Se obtuvo que para todos los tiempos de cultivo no existen diferencias significativas entre tratamientos ($F=1.68, 2.35, 0.77, 0.12, 2.83$ y $2.35 < F_{\alpha(3,12)}=3.49$). Esto significa que el CuSO₄ y el HCB no participan como inductores de enzimas con actividad lacasa en *A. pedicades*, ni tampoco como potenciadores de actividad enzimática lacasa, es decir, no afectan directamente a la estructura de la enzima con actividad lacasa extracelular.

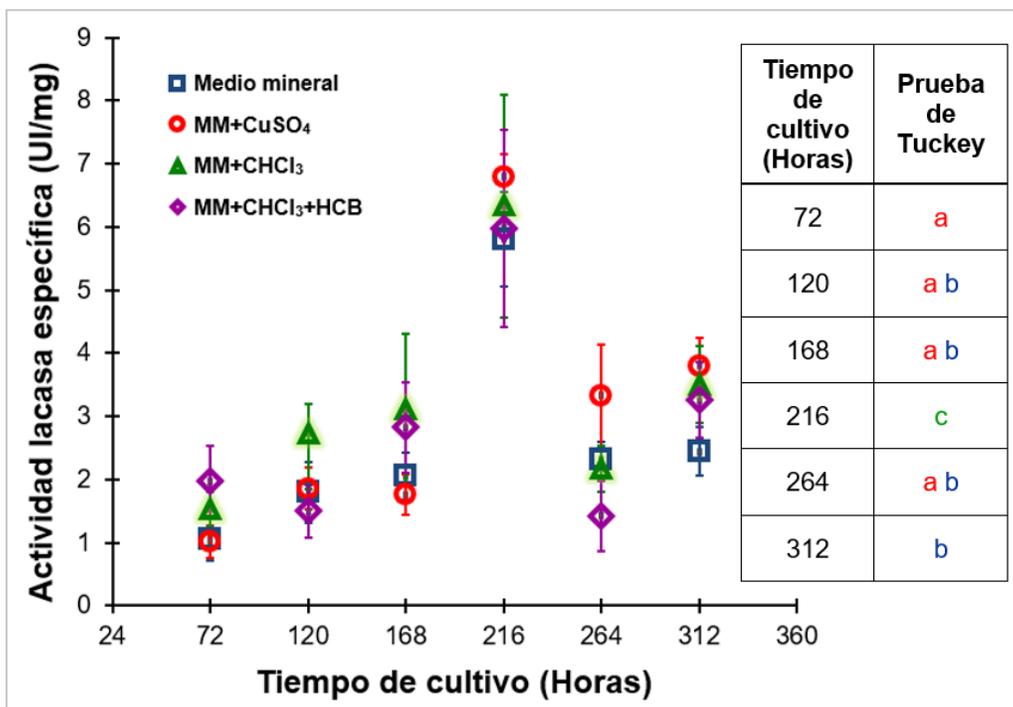


Figura 12. Resultados de la medición de la actividad enzimática lacasa específica de los cuatro tratamientos a partir del extracto crudo enzimático extracelular. El valor mostrado corresponde al promedio \pm SD de la actividad lacasa específica de las cuatro réplicas realizadas. MM+CuSO₄ es el tratamiento de cultivo en medio mineral con adición de CuSO₄, MM+CHCl₃ es el tratamiento de cultivo en medio mineral con adición de CHCl₃ y MM+CHCl₃+HCB es el tratamiento de cultivo en medio mineral con adición de CHCl₃ y HCB. En la tabla de la derecha se muestran los resultados de

la prueba de Tuckey, posterior al análisis de varianza bidimensional, para los tiempos de cultivo, letras diferentes significa que existen diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

Después, con el análisis de varianza bidimensional se obtuvo que existen diferencias significativas entre tiempos de cultivo ($F=26.72 > F_{\alpha(5,72)}=2.37$). Con la prueba post hoc de Tuckey (tabla de la derecha en la Figura 12) se encontró que la actividad lacasa específica es significativamente mayor a las 312 h con respecto a la actividad de los cultivos a las 72 h, pero sin diferencias significativas entre la actividad a las 312 h con respecto al resto de los tiempos de cultivo, tampoco existen diferencias significativas entre la actividad lacasa específica a las 72 h con respecto a los otros tiempos de cultivo. También se obtuvo que la actividad lacasa específica a las 216 h es significativamente mayor que la actividad en todos los demás tiempos de cultivo. De acuerdo con estos resultados, se eligió el ECEE obtenido a las 216 h de cultivo como la fuente de proteína para realizar la purificación de las enzimas con actividad lacasa.

10.1.2. Zimografía

Para determinar la presencia de isoenzimas o isoformas de enzimas con actividad lacasa en el ECEE producidas por *A. pedicades* en medio líquido se realizaron ensayos de zimografía para cada uno de los cuatro tratamientos. A partir de los extractos de cada tratamiento y tiempo de cultivo se realizó la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condición semi-desnaturalizante con lo que se obtuvieron los zimogramas que se muestran en la Figura 13. Se observa una sola banda a la altura del marcador de masa molecular de 70 kDa en los cuatro tratamientos, lo cual indica que la adición de CuSO_4 o HCB no induce la expresión de otras enzimas con actividad lacasa en *A. pedicades*. Sin embargo, no se sabe si por el grosor de las bandas es posible que haya dos enzimas con actividad lacasa de distintas masas moleculares muy cercanas entre ellas, lo cual solo se confirmaría o descartaría obteniendo las secuencias de las enzimas.

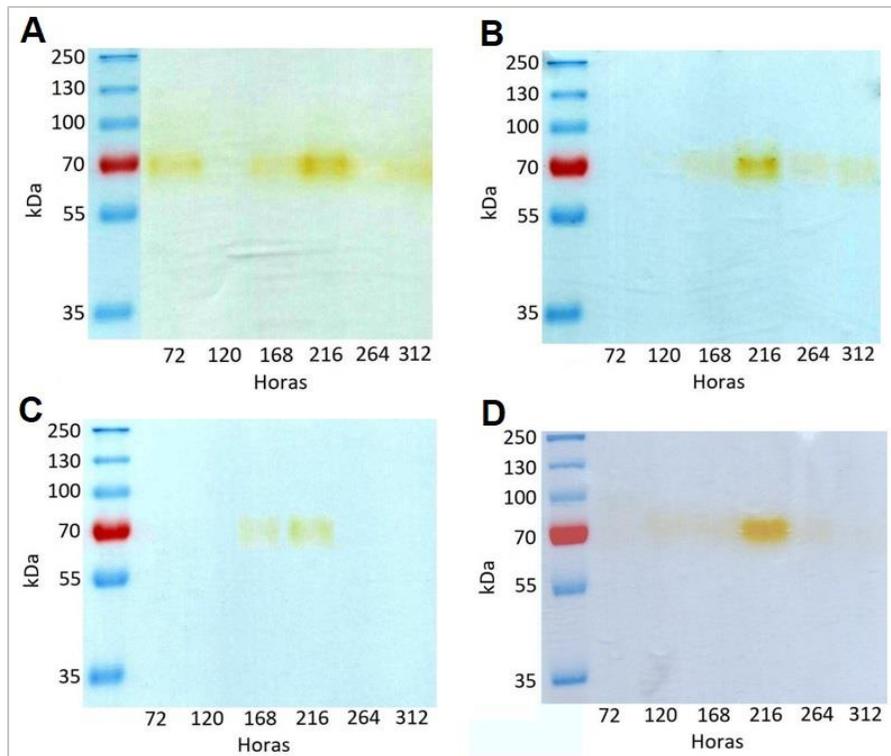


Figura 13. Zimogramas de los cuatro tratamientos (Los geles están editados, se muestran de los que se pudo obtener una mejor imagen de las 4 réplicas realizadas para cada tratamiento). Se cargaron 7 μg de proteína total en cada carril. (A) Tratamiento del cultivo en medio mineral. (B) Tratamiento del cultivo en medio mineral con adición de CuSO_4 . (C) Tratamiento del cultivo en medio mineral con adición de CHCl_3 . (D) Tratamiento del cultivo en medio mineral con adición de HCB disuelto en CHCl_3 .

Posteriormente, se llevó a cabo la concentración del ECEE de los seis tiempos de cultivo de los cuatro tratamientos, para verificar si al tener mayor concentración de proteína se podrían visualizar otras bandas, diferentes a las de 70 kDa. En las distintas réplicas se observó que las bandas que se lograron visualizar fueron a la altura del marcador de peso molecular de 70 kDa. Excepto que en una réplica del tratamiento de cultivo en solo el medio mineral se observa la presencia de tres bandas que dan positivo a la actividad lacasa para las 120 h de cultivo (Figura 14), lo cual coincide con el antecedente de Torres-González (2017) para el tiempo de cultivo de 120 h, en el que aparecen por lo menos 3 bandas positivas con actividad de lacasa en el ECEE producidas por *A. pedicades* en medio líquido. Las bandas con actividad lacasa se observan con masas moleculares relativas de 45 kDa, 70 kDa y 110 kDa. Por las grandes diferencias de tamaño entre estas enzimas puede inferirse

que las secuencias de aminoácidos son diferentes y por lo tanto es posible que sean isoenzimas de lacasa y que probablemente son diferentes proteínas que actúan sobre el mismo sustrato, pero sobre todo poseen diferencias en su secuencia de aminoácidos, lo que promueve una diferencia en su tamaño al ser evaluadas electroforéticamente.

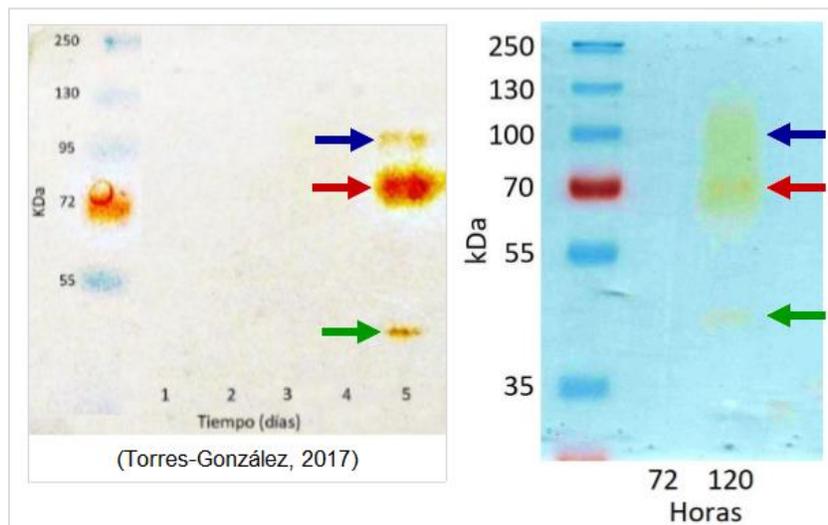


Figura 14. Comparación de un zimograma obtenido de una muestra concentrada correspondiente a una réplica de las 120 h de cultivo del tratamiento de cultivo en medio mineral (derecha) comparado con el antecedente de Torres-González (2017) (izquierda). Las fechas del mismo color en ambos zimogramas indican las bandas que son análogas.

También para una de las réplicas del tratamiento con adición de CuSO_4 se presenta una banda a la altura de 100 kDa para las 72 h de cultivo (Figura 15), análoga a la banda que se muestra en la Figura 14 para las 120 h en el tratamiento de cultivo en medio mineral. Sin embargo, no en todas las réplicas se obtuvo esta banda, por lo cual en la siguiente fase del trabajo se dio prioridad a la purificación de la enzima que se presentó de manera más estable en todas réplicas, es decir la que en los zimogramas se encuentra a la altura del marcador de peso molecular de 70 kDa.

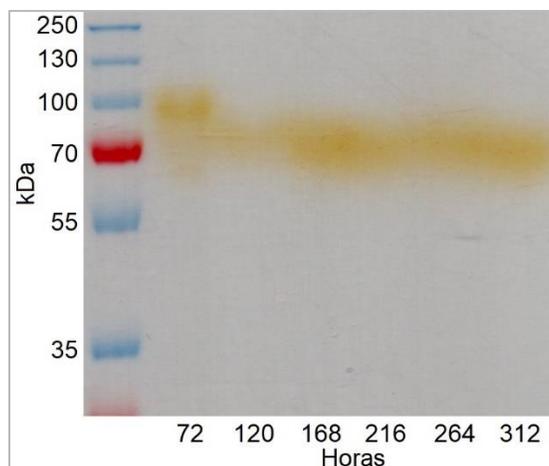


Figura 15. Zimograma del ECEE concentrado obtenido del tratamiento del cultivo en medio mineral con adición de CuSO_4 . Se cargaron 10 μg de proteína en cada carril.

10.2. Purificación de las enzimas con actividad lacasa

Se realizó la purificación de las enzimas con actividad lacasa a partir del ECEE concentrado correspondiente a las 216 h de cultivo de *A. pedicades* en el medio mineral. Se eligió este tiempo debido a que en él se obtuvo significativamente una mayor actividad lacasa. El medio mineral se eligió porque no hubo diferencias significativas en la actividad lacasa entre los cuatro tratamientos. En la Figura 16 se muestra la gráfica de la separación de las proteínas presentes en el ECEE en la columna de exclusión Sephacryl 200. Se midió la actividad lacasa a cada una de las fracciones y se observa que las fracciones que corresponden al segundo pico de proteína (Absorbancia mAU) fueron las que presentaron actividad lacasa. La actividad lacasa porcentual es presentada en color rojo para cada una de las fracciones proteicas.

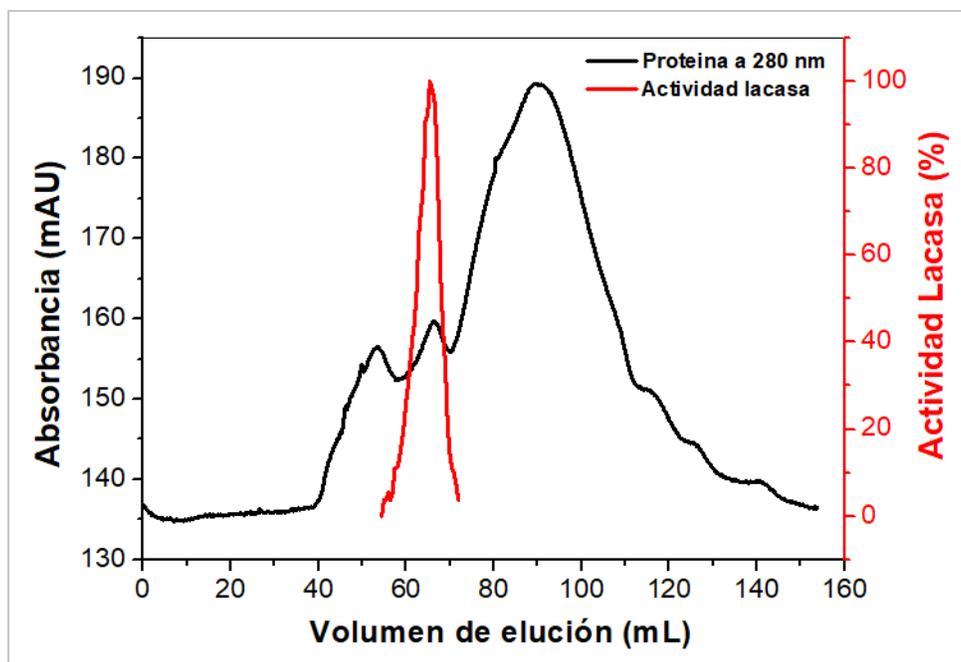


Figura 16. Purificación de la enzima con actividad lacasa. Cromatograma de la proteína separada por la columna de exclusión Sephacryl 200 (línea en color negro). Medición de la actividad lacasa de las fracciones obtenidas (línea en color rojo).

Posteriormente se realizó la tabla de purificación para determinar el rendimiento y la cantidad de proteína total purificada. Como se observa en la Tabla 2, se obtuvieron 1.3 mg de proteína total purificada con una actividad lacasa específica de $285 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ y con un rendimiento del 8.7% con respecto al ECEE inicial.

Tabla 2. Tabla de purificación de la enzima con actividad lacasa producida por *A. pedicades*.

Pasos	Proteína total (mg)	Actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Actividad total ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	Rendimiento (%)
ECEE	1518	2.8	4250	100
Sephacryl 200	1.3	285	370.5	8.7

Para corroborar la pureza de la proteína purificada se realizó un gel PAGE en condiciones semi desnaturizante (Figura 17), donde se observa principalmente una banda de 72 kDa en mayor intensidad. Así mismo, se observan dos bandas en menor intensidad con masas moleculares alrededor de 35 kDa y de 22 kDa. Sin

embargo, cuando al gel PAGE en condiciones semi desnaturizante se le realizó la zimografía, se observa que la banda de aproximadamente 72 kDa es la única que muestra actividad lacasa en el gel. Estos datos nuevamente nos muestran la presencia de una sola banda alrededor de 72 kDa que presenta actividad lacasa para las 216 h de cultivo en medio mineral, como en los zimogramas del ECEE de la Figura 13, donde una sola banda también fue observada. Es importante mencionar que de las dos bandas de menor masa molecular (35 y 22 kDa), hasta este momento desconocemos su función y sí podrían ser proteínas co-purificadas junto con la proteína con actividad lacasa.

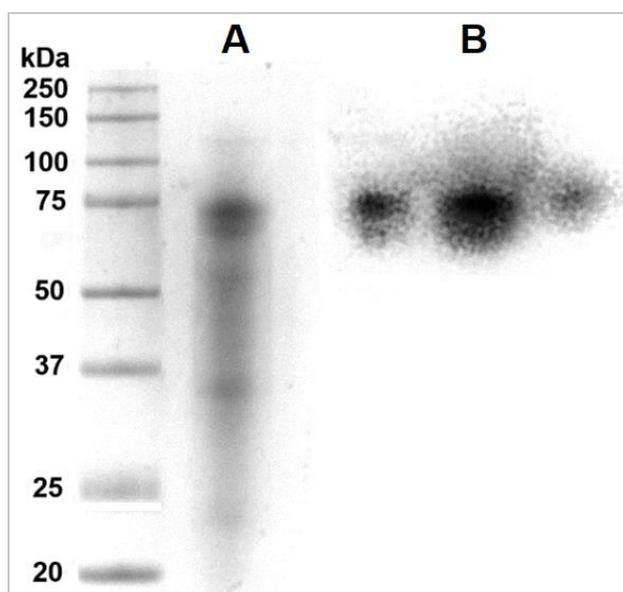


Figura 17. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condición desnaturizante de la enzima purificada. En cada carril se cargaron 40 μ g totales de la proteína purificada. (A) Perfil de proteínas obtenido al teñir el gel con azul de coomassie. (B) Zimograma obtenido al revelar con el sustrato 2,6-dimetoxifenol.

10.3. Determinación del estado nativo de la enzima con actividad lacasa

A partir de la proteína purificada que mostró actividad en la columna de Sephacryl 200 se cargó nuevamente a la columna de exclusión Sephacryl 200 previamente equilibrada. Esto se realizó para obtener el estado nativo de la proteína que presentó actividad lacasa. Como se observa en la Figura 18, la muestra concentrada que presentaba un solo pico en la columna de exclusión Sephacryl 200, ahora se

observa que se separó en dos picos de proteínas (Señalados con las flechas verde y azul). Se midió la actividad lacasa a los dos picos y se determinó que las fracciones proteicas que tuvieron actividad lacasa fueron las correspondientes al pico señalado con la flecha azul. Es interesante mencionar que, a pesar de que se había observado un solo pico con actividad de lacasa con un volumen de exclusión de 65 mL; cuando este pico se cargó nuevamente a la columna de Sephacryl 200, se observa que este pico se disocia en dos, el primero con un volumen de exclusión de 53 mL sin actividad lacasa, mientras que el segundo pico con actividad lacasa nuevamente presentó un tiempo de exclusión de 65 mL.

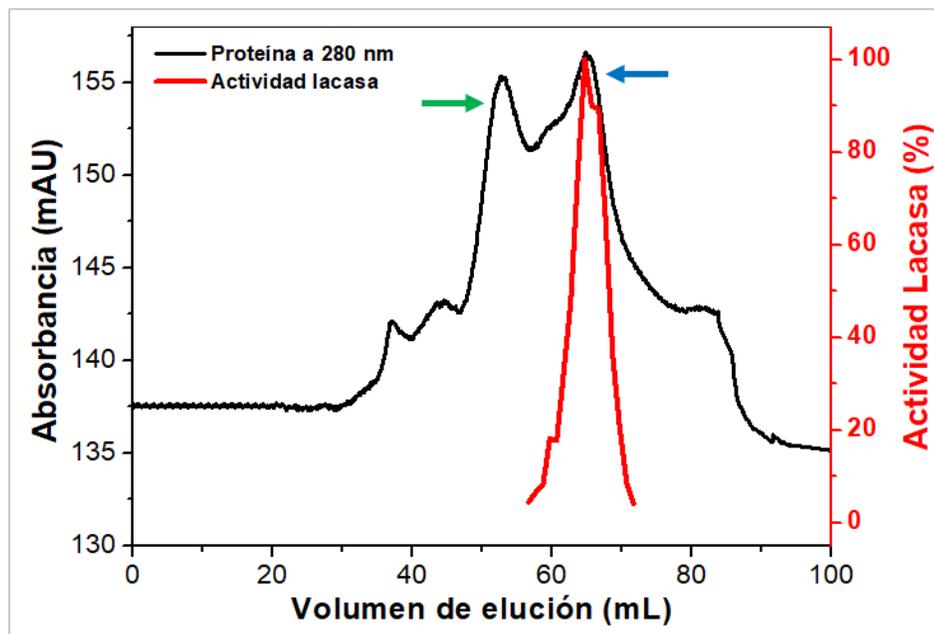


Figura 18. Purificación de la enzima con actividad lacasa. Cromatograma de la proteína separada por la columna de exclusión Sephacryl 200 (línea en color negro). Medición de la actividad lacasa de las fracciones obtenidas (línea en color rojo).

Para corroborar el estado oligómero de la proteína con actividad de lacasa, usando las mismas condiciones se cargaron a la misma columna (Sephacryl 200) los estándares de filtración, el cual contiene las siguientes proteínas: tiroglobulina 670 kDa (bovino), γ -globulina 159 kDa (bovino), ovoalbúmina 44 kDa (pollo), mioglobina 17 kDa (Caballo), y vitamina B12 1.25 kDa (Figura 19).

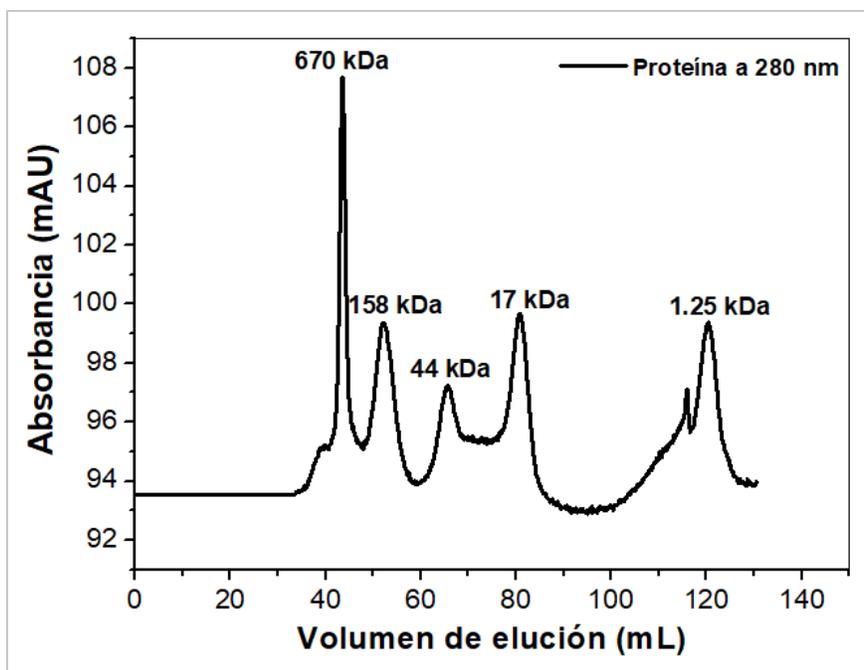


Figura 19. Curva de calibración de proteínas estándares con volúmenes de elución. En los picos se muestran las masas moleculares conocidas de cada una de las proteínas estándares: tiroglobulina 670 kDa (bovino), γ -globulina 158 kDa (bovino), ovoalbúmina 44 kDa (pollo), mioglobina 17 kDa (Caballo) y vitamina B12 1.25 kDa.

Posteriormente se calculó el logaritmo natural de la masa molecular conocida de cada una de las proteínas y se graficó contra el volumen de exclusión correspondiente a cada una de las proteínas. Como se observa en la Figura 20, los logaritmos naturales de las masas moleculares de las proteínas se ajustan a una línea recta, a partir de lo cual se obtuvo una regresión lineal; con la que se determinó la masa molecular aproximada de la enzima con actividad lacasa, la cual es de 71.5 kDa. Este resultado está en concordancia con lo previamente observado en el gel de acrilamida en condiciones semi desnaturizante (Figura 17).

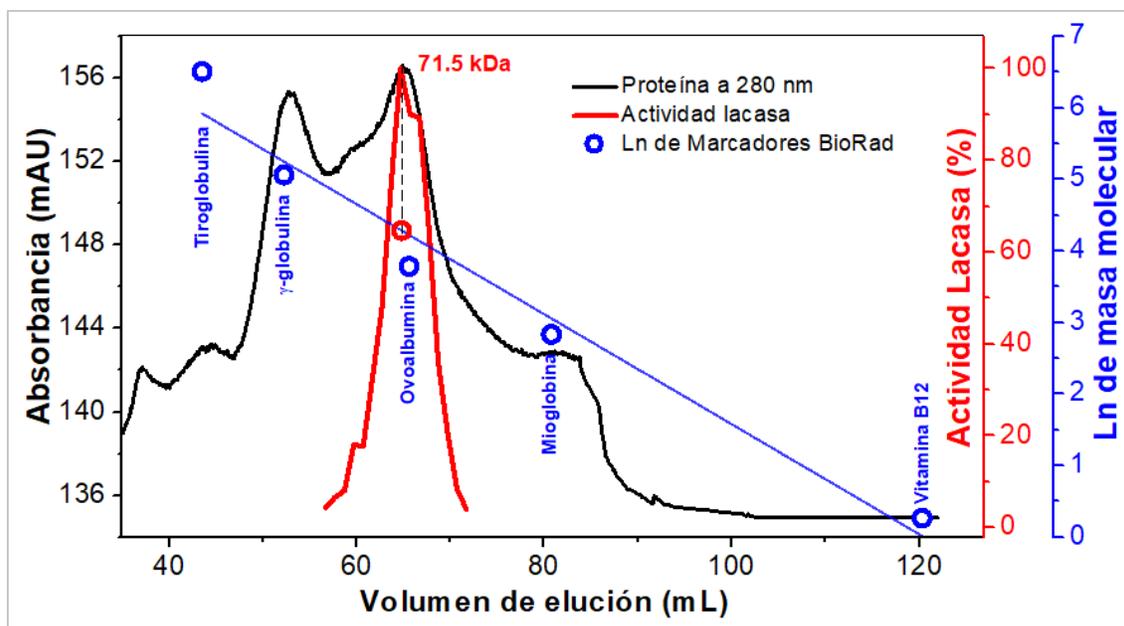


Figura 20. Determinación de la masa molecular de la enzima con actividad lacasa producida por *Agrocybe pediades*, realizando la interpolación en la recta de regresión lineal obtenida a partir de los logaritmos naturales de las masas moleculares de las proteínas estándar, graficados contra el volumen de elución de la curva de calibración (Figura 19).

Adicionalmente, para determinar si la enzima contiene puentes disulfuro en su estructura, se procedió a realizar, por duplicado, un gel SDS-PAGE al 12%, cargando una muestra de la enzima purificada con buffer de carga (como en los geles anteriores) y otra muestra con adición de ditriotritol (DTT) 25 mM incubando la muestra por cinco minutos, con lo cual se obtuvo el perfil de proteínas y el zimograma sin y con adición de DTT, como se muestra en la Figura 21. El perfil de proteínas es similar sin y con adición de DTT, la diferencia más notoria que se observa es que la banda a la altura de 22 kDa es más intensa con la adición de DTT (Figura 21A, carril 2). En el zimograma se obtiene que con la adición de DTT se pierde por completo la actividad de la enzima (Figura 21B, carril 2).

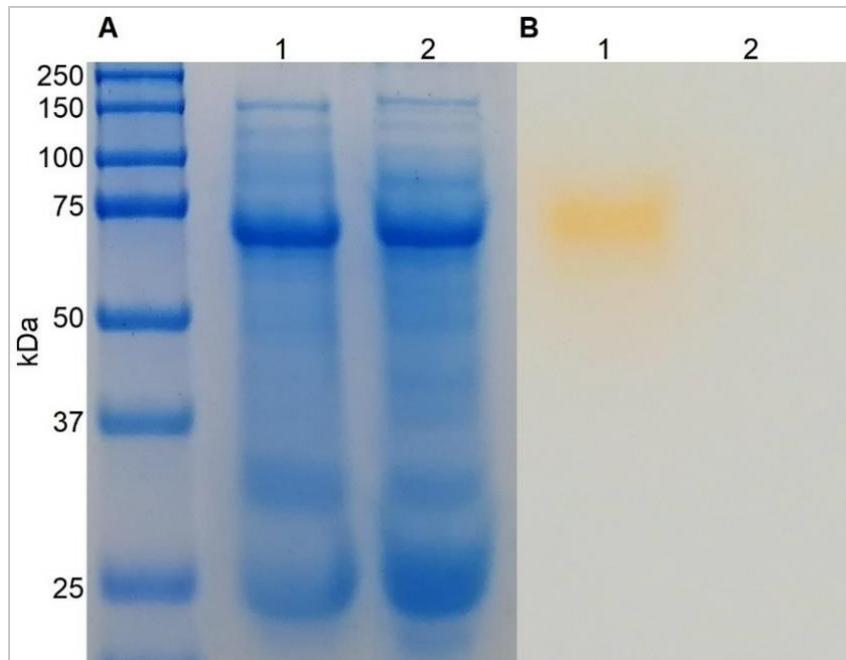


Figura 21. Electroforesis en gel SDS-PAGE de la enzima purificada sin y con adición de DTT. (A) Perfil de proteínas obtenido con azul de comassie, carril 1 sin adición de DTT y carril 2 con adición de DTT 25 mM. (B) Zimograma obtenido con el sustrato 2,6-dimetoxifenol, carril 1 sin adición de DTT y carril 2 con adición de DTT 25 mM. En cada carril se cargaron 20 μ g totales de enzima con actividad lacasa purificada.

Para corroborar que la enzima pierde su actividad al adicionarle DTT y por lo tanto que contiene puentes disulfuros en estado nativo, se midió la actividad del ECEE y de la enzima purificada en ausencia y presencia de DTT. El ECEE y la proteína purificada fueron incubados por 5 minutos con DTT 25 mM. Como se observa en la Figura 22, en ausencia de DTT tanto el ECEE y la proteína purificada presentan actividad lacasa; mientras que en presencia de DTT la enzima pierde totalmente su actividad y la absorbancia está en igual proporción a la presentada por el blanco (mezcla de reacción sin proteína). Así mismo, este resultado refuerza lo encontrado en el zimograma en presencia de DTT (Figura 21). Lo cual significa que la enzima contiene puentes disulfuro que al romperse con el DTT pierde su actividad. Esto concuerda con que las proteínas extracelulares generalmente contienen puentes disulfuro en su estado nativo; y como en el perfil de proteínas al agregar DTT se mantiene la banda a la misma altura que sin adición de DTT, entonces, lo más probable es que la enzima sea un monómero con puentes disulfuro que estabilizan

su estructura terciaria, la conformación del sitio activo o la zona de reconocimiento al sustrato; aunque también, es posible que la pérdida de actividad con DTT se deba a que en uno de los cobres del sitio activo se está coordinando con una cisteína que esta oxidada y que al adicionar DTT se reduce la cisteína ocasionando la pérdida de actividad.

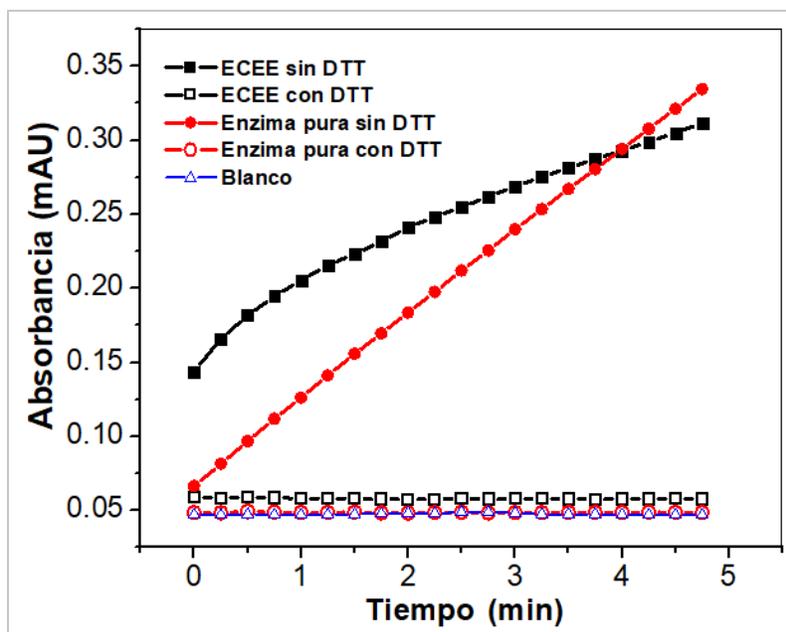


Figura 22. Comportamiento de la actividad lacasa en ausencia y presencia de DTT del extracto crudo enzimático extracelular (ECEE) y de la enzima purificada. Las curvas en negro corresponden a la actividad lacasa del ECEE sin y con adición de DTT, las curvas en rojo a la actividad lacasa de la enzima pura sin y con adición de DTT y la curva azul corresponde al blanco.

10.4. Caracterización funcional de la enzima con actividad lacasa

10.4.1. Curva de pH

Con respecto al efecto del pH sobre la actividad lacasa de la enzima producida por *A. pedíades*, en la Figura 23 se puede observar que a un valor de pH de 3.0, se encontró que la enzima no presentó actividad lacasa. Además, observamos una actividad relativa de 53% a pH 4.0, mientras que a pH 4.5, se observó una actividad residual de 71%. El 100% de la actividad lacasa fue encontrada a un valor de pH de 5.0. Conforme se incrementó el pH de 5 hasta 7.0, se observa que la actividad

lacasa fue disminuyendo hasta llegar a la pérdida total de la actividad a un pH de 7.5. Basado en el perfil de pH, sugerimos que esta enzima tiene un pH óptimo de 5.0 a las condiciones de la reacción probadas y a la temperatura utilizada para la determinación; por lo que las siguientes mediciones de actividad lacasa se realizaron a valor de pH de 5.0. Este valor de pH en el que se alcanza la máxima actividad lacasa de la enzima está en concordancia con el pH determinado a las 216 h de cultivo de *A. pediades* en el ECEE, donde el medio mostró un pH de 5.0. Esto significa que a este periodo de tiempo y a este valor de pH la proteína con actividad de lacasa está funcionando de manera extracelular al 100% de su actividad.

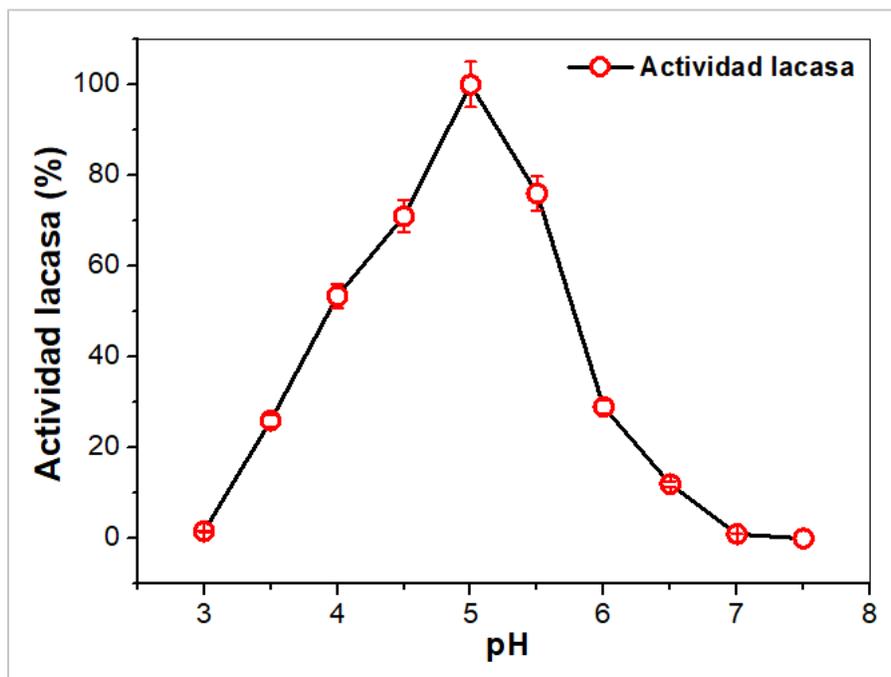


Figura 23. Curva de pH de la enzima con actividad lacasa purificada producida por *Agrocybe pediades*, con 2,6-dimetoxifenol como sustrato.

10.4.2. Efecto de la temperatura sobre la enzima con actividad lacasa

Para investigar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la proteína lacasa, se incubaron alícuotas de la enzima a diferentes temperaturas por 20 minutos (que varían de 20 a 80 °C), y posteriormente, se midió la actividad. Como se observa en la Figura 24, la actividad permaneció intacta de 20 a 45 °C y disminuyó lentamente

hasta los 50 °C, y posteriormente cayó bruscamente la actividad a partir de los 50 °C a los 70 °C, hasta llegar a no presentar actividad alguna. Se observa que a 61.7 °C la enzima pierde el 50% de su actividad, lo cual hace que sea una enzima resistente a la temperatura, lo que indica que esta proteína es más estable a altas temperaturas.

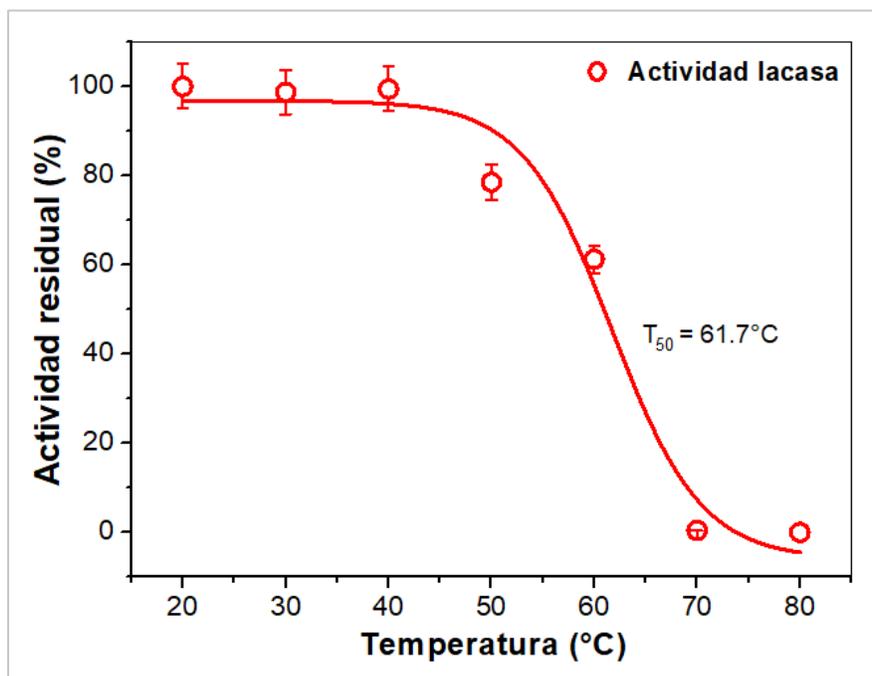


Figura 24. Efecto de la temperatura en la actividad lacasa de la enzima purificada producida por *Agrocybe pediades*, T_{50} es la temperatura a la cual la enzima pierde el 50% de su actividad.

10.4.3. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima con actividad lacasa

Los parámetros cinéticos de estado estacionario de la enzima lacasa se obtuvieron variando la concentración del sustrato 2,6-dimetoxifenol de 0 a 2 mM. La Figura 25 muestra el comportamiento hiperbólico de los valores de velocidad de reacción iniciales de la enzima con actividad lacasa obtenidos para cada una de las concentraciones de 2,6-dimetoxifenol. Por lo que se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten. El valor aparente de K_m determinado fue de 0.10 mM, con un V_{max} aparente de $285 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, que es la velocidad máxima que puede

alcanzar la reacción de la enzima cuando todos los sitios activos están saturados con sustrato.

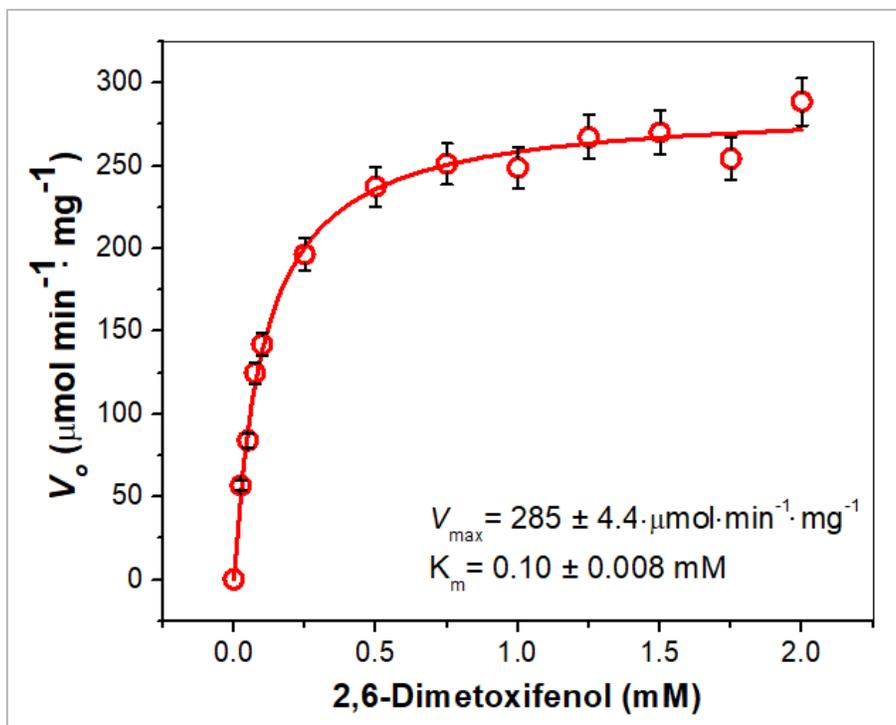


Figura 25. Curva de saturación ajustada a la ecuación de Michaelis-Menten. V_0 son las velocidades iniciales de reacción de la enzima con actividad lacasa a las distintas concentraciones de sustrato. La mitad de la velocidad máxima de reacción se alcanza a la concentración de sustrato K_m .

11. Discusión

11.1. Descripción de la expresión de enzimas con actividad lacasa producidas por *Agrocybe pediades* en medio líquido con la presencia de cobre y hexaclorobenceno

Con respecto al crecimiento de *A. pediades* en el medio mineral, se cuenta con la referencia de la investigación realizada por Torres-González (2017), en el cual obtuvo una biomasa máxima de 5.39 g/L y una constante específica de velocidad de crecimiento μ de 0.022 h^{-1} , estos resultados son tres veces mayores a los obtenidos en el presente trabajo, ya que para el cultivo en medio mineral la biomasa

máxima obtenida de las 4 réplicas fue de 1.75 g/L y $\mu = 0.0069$; considerando que se siguió la misma metodología en el cultivo, incluida la composición del medio, la cantidad de biomasa del inóculo y la cepa empleada. Es posible que el haber obtenido un menor crecimiento se deba a las generaciones que el hongo ha pasado en el laboratorio desde que fue aislado y esto le genere cambios metabólicos y probablemente genéticos (Estrada-Salazar y Ramírez-Galeano, 2019); pues en el trabajo de Torres-González (2017) *A. pediades* estaba recién aislado del bosque de *Juniperus*.

La actividad lacasa específica máxima del extracto extracelular crudo enzimático (EECE) obtenida en el presente trabajo, de 5.81 UI/mg a las 216 h de cultivo, también fue menor que la obtenida por Torres-González (2017) que fue de 16.40 UI/mg, casi tres veces (2.8 veces) más que en el presente trabajo. Suponemos que se debe a la misma razón mencionada en el párrafo anterior sobre las generaciones que el hongo ha pasado en el laboratorio. Sin embargo, con respecto a la actividad lacasa específica obtenida en el EECE para otros hongos del orden Agaricales, la obtenida en este trabajo es mayor, como en el caso de la actividad específica obtenida por Chen *et al.* (2004) de una lacasa producida por el hongo *Volvariella volvacea*, la cual fue de 1.3 UI/mg, cuatro veces menor que la obtenida en el presente trabajo. La menor cantidad de actividad lacasa específica obtenida en el presente trabajo con respecto al antecedente de Torres-González podría explicar por qué en los geles de la zimografía obtenidos con el EECE no se observan las bandas tan intensas como en el antecedente y que solo se pueda observar una banda a la altura aproximada del marcador de masa molecular de 70 kDa.

Para los cultivos con adición de CuSO_4 y HCB no se obtuvo un incremento significativo en la actividad lacasa, ni la presencia de otras enzimas con actividad lacasa, por lo que en las condiciones probadas no funcionan como inductores de enzimas con actividad lacasa. Sin embargo, es interesante el resultado que se obtuvo para las 72 h de cultivo con adición de CuSO_4 mostrado en la Figura 15, donde se visualiza una banda a la altura del marcador de 100 kDa, la cual se obtuvo

en el cultivo en medio mineral a las 120 h; esto puede sugerir que el cobre tuvo algún efecto en la producción de esta enzima en un momento de cultivo más temprano.

El hecho de que en algunas réplicas, como las mostradas en la Figuras 14 y 15, se obtuvieron otras bandas que no se lograron visualizar en las otras réplicas; es acorde a los zimogramas obtenidos por Torres-González, quien para distintas réplicas reporta en algunas la visualización de más bandas que para otras. Posiblemente debido a que en algunas réplicas la concentración de las enzimas con actividad lacasa es mayor que en otras, por tratarse de enzimas producidas por un organismo vivo que no necesariamente responde de manera exactamente igual a las mismas condiciones.

11.2. Purificación de la enzima con actividad lacasa producida por *Agrocybe pediades*

La obtención de un solo pico con actividad lacasa en la separación de las proteínas presentes en el ECEE (Figura 16) concuerda con la presencia de una sola banda con actividad lacasa a las 216 h de cultivo en la zimografía.

El rendimiento de 8.7%, con respecto al ECEE inicial, en la purificación de la enzima con actividad lacasa producida por *A. pediades* (Tabla 2); es acorde a lo reportado en trabajos donde también emplearon una columna de exclusión Sephacryl 200. Por ejemplo, Wu *et al.* (2010) obtuvieron un rendimiento del 9%, con respecto al extracto crudo inicial, en la purificación de una lacasa extracelular de *Fusarium solani*. Y Chen *et al.* (2013) tuvieron un rendimiento del 7.49%, con respecto al extracto crudo inicial, en la purificación de una lacasa extracelular de *Thermobifida fusca*.

11.3. Caracterización de la enzima con actividad lacasa producida por *Agrocybe pediades*

El tamaño de la enzima con actividad lacasa producida por *A. pediades*, de 71.5 kDa es significativamente mayor a los reportados para las lacasas de varios hongos del orden Agaricales (Chen *et al.*, 2004; Ullrich *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2015) y también al reportado de una lacasa del producida por el hongo *Stropharia aeruginosa*, de 55 kDa (Daroch *et al.*, 2014), que pertenece a la familia Strophariaceae, a la cual pertenece *A. pediades*. Las lacasas producidas por otros hongos del género *Stropharia* presentaron tamaños de 66 y 67 kDa (Schlosser y Höfer, 2002; Steffen *et al.*, 2002); también se encontró la referencia de una lacasa producida por *Agrocybe praecox* con un tamaño de 66 kDa (Steffen *et al.*, 2002). Son menos los trabajos donde reportan tamaños de lacasas producidas por hongos del orden Agaricales que sean mayores al de la enzima con actividad lacasa producida por *A. pediades* (Palmieri *et al.*, 2003). El hecho de que la enzima con actividad lacasa producida por *A. pediades* tenga un mayor tamaño que el de enzimas lacasas producidas por otros hongos del mismo orden puede significar que posea un mayor número de grupos funcionales adheridos o que su secuencia de aminoácidos sea más extensa, lo cual podría proporcionarle ciertas ventajas en determinadas circunstancias, como en el caso de que *A. pediades* crece en un lugar sin cobertura vegetal, por lo cual está más expuesto a la radiación solar en comparación con otros hongos (Arregui *et al.*, 2019).

En cuanto a las características funcionales de la enzima con actividad lacasa producida por *A. pediades*, las referencias de hongos filogenéticamente más cercanos que se encontraron, donde emplearon el mismo sustrato (2,6-dimetoxifenol) para realizar las mediciones, son de enzimas lacasas producidas por hongos del orden Agaricales (Tabla 3). No se encontraron referencias con este sustrato para hongos de la misma familia que *A. pediades*.

Tabla 3. Características de enzimas con actividad lacasa de hongos del orden Agaricales

Familia	Especie	Masa molecular (kDa)	pH óptimo	K _m (μM)	Temperatura óptima (°C)	Referencia
Agaricaceae	<i>Agaricus blazei</i>	66	5.5	1026	nd	Ullrich <i>et al.</i> (2005)
Marasmiaceae	<i>Lentinula edodes</i>	72	4.0	557	40	Nagai <i>et al.</i> (2002)
Marasmiaceae	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	57	6.5	nd	55	Liu <i>et al.</i> (2015)
Pleurotaceae	<i>Pleurotus ostreatus</i>	83-85	5.5	8800	35	Palmieri <i>et al.</i> (2003)
Pluteaceae	<i>Volvariella volvacea</i>	58	4.6	570	45	Chen <i>et al.</i> (2004)
Strophariaceae	<i>Agrocybe pediades</i>	71.5	5.0	100	40	

nd = no determinado

El pH óptimo para el sustrato 2,6-dimetoxifenol, en las condiciones probadas de la enzima con actividad lacasa de *A. pediades* es intermedio con respecto al de las lacasas reportadas, con el mismo sustrato (Tabla 3). Este pH obtenido con el sustrato 2,6-dimetoxifenol es un referente para considerar la catálisis sobre compuestos con estructuras parecidas, como el 2,4,6-trimetilfenol y el tetrametil bisfenol, que se encuentren en ambientes con un pH similar, como el suelo o agua contaminados (Manahan, 2010). El 2,4,6-trimetilfenol, usado como agente adyuvante en alimentos, es un compuesto tóxico puede provocar quemaduras cutáneas, lesiones oculares e irritación del tracto respiratorio, y es tóxico para organismos acuáticos (NCBI, 2021). Ardelean *et al.* (2012) reportaron que metilfenoles, como el 2,4,6-trimetilfenol, están presentes en el medio ambiente a menudo en concentraciones considerables, las más altas se han encontrado en aguas situadas cerca de plantas que producen alquitrán de hulla. El 4,4'-metilbis (2,6-dimetilfenol) (tetrametil bisfenol) utilizado en la fabricación de resinas y reportado por Cook *et al.* (2004) como un subproducto de refinerías de aceite de resina, es un compuesto que puede causar irritación cutánea y de vías respiratorias, lesiones oculares graves y es muy tóxico para organismos acuáticos (NCBI, 2021).

Con respecto al efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima, el comportamiento es muy similar al reportado por Daroch *et al.* (2014) de una lacasa amarilla glicosilada producida por *Stropharia aeruginosa*, la cual pierde su actividad

a los 70 °C y una T_{50} aproximada de 62 °C, lo cual es acorde con que las enzimas de *S. aeruginosa* y *A. pediades* tengan características en común, considerando que pertenecen a la misma familia. Por otra parte, el hecho de que la enzima con actividad lacasa producida por *A. pediades* posea puentes disulfuros puede explicar su estabilidad a esas temperaturas, ya que estos puentes estabilizan las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas que los contienen (Murray *et al.*, 2010).

Los parámetros cinéticos V_{max} y K_m obtenidos para la enzima con actividad lacasa producida por *A. pediades* muestran que esta enzima tiene significativamente mayor afinidad por el sustrato 2,6-dimetoxifenol que las lacasas de los hongos de orden Agaricales. Puesto que la enzima con actividad lacasa producida por *A. pediades* tiene un K_m entre cinco y diez veces menor que las lacasas producidas por los otros hongos mostrados en la Tabla 3. Con lo cual se infiere que puede realizar una catálisis más eficiente sobre compuestos similares a este sustrato que las otras enzimas. Considerando el antecedente de Glazunova *et al.* (2018) donde las enzimas que presentaron mayor afinidad por el 2,6-dimetoxifenol también tuvieron una afinidad similar por el ácido sinapínico y la siringaldazina, es probable que la enzima con actividad lacasa producida por *A. pediades* también presente una afinidad similar, a la que tiene por el 2,6-dimetoxifenol, con estos sustratos. Y debido a que estos tres sustratos tienen una parte de su estructura en común, es probable la enzima con actividad lacasa de *A. pediades* también pueda presentar una afinidad similar por los compuestos xenobióticos 2,4,6-trimetilfenol y tetrametil bisfenol.

12. Conclusiones

Con los resultados obtenidos para la enzima con actividad lacasa producida por *Agrocybe pediades* que se identificó, purificó y caracterizó en este trabajo se puede concluir que la adición de $CuSO_4$ o HCB en el medio de cultivo líquido no induce la producción de enzimas con actividad lacasa en *A. pediades* ni una mayor actividad enzimática extracelular de la que se obtiene con solo el medio mineral.

Las características que se determinaron de esta enzima sugieren que puede tener capacidades catalíticas sobresalientes sobre sustratos similares al 2,6-dimetoxifenol, comparada con enzimas lacasas producidas por hongos del mismo orden al que pertenece *A. pediades*.

Este trabajo sirve como referencia para investigaciones posteriores con relación a posibles sustratos sobre los que puede realizar catálisis esta enzima, la forma de purificarla, las vías que ocupan este hongo para degradar ciertos compuestos fenólicos, entre otras.

13. Literatura citada

- Akpinar, M. y Ozturk-Urek, R. 2020. Decolorization and degradation potential of enhanced lignocellulolytic enzymes production by *Pleurotus eryngii* using cherry waste from industry. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 67:760–773. doi: 10.1002/bab.1846.
- Antošová, Z., Herkommerová, K., Pichová, I. y Sychrová, H. 2017. Efficient secretion of three fungal laccases from *Saccharomyces cerevisiae* and their potential for decolorization of textile industry effluent—A comparative study. *Biotechnol Progress*. 34:69–80. doi: 10.1002/btpr.2559.
- Arbeli, Z. 2009. Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): I. El caso de los bifenilos policlorados (PCB). *Acta Biológica Colombiana*. 14(1):55–86.
- Ardelean, R., Davidescu, C. M., Popa, A. y Ilia, G. 2012. Removal of Phenol, 2,3-dimethylphenol, 2,6-dimethylphenol and 2,4,6-trimethylphenol from Aqueous Solutions by Polymeric Sorbents having Olefin Groups. *Revista de Chimie*. 63(10):1065–1068. Disponible en: <http://www.revistadechimie.ro>.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera de los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán M. A. y Valdez-Cruz, N. A. 2019. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*. 18(200):1–33. doi: 10.1186/s12934-019-1248-0.
- Bastos, A. C. y Magan, N. 2009. *Trametes versicolor*: potential for atrazine bioremediation in calcareous claysoil under low water availability conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 63(4):389–394. doi: 10.1016/j.ibiod.2008.09.010.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer, L. 2007. *Bioquímica*. Editorial Reverté. 6ª ed. Barcelona, España. ISBN: 9788429176001.
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F. y Trejo-Hernández, M. R. 2013. Fungal laccases: Induction and production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12(3):473–488. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966010>.

- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco, R., Rojas-Trejo, S., Serrano-Carreón, L., y Trejo-Hernández, M.R. 2014. Induction of laccases in *Trametes versicolor* by aqueous wood extracts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30:135–142. doi: 10.1007/s11274-013-1420-3.
- Castro-Castro, V., Siu-Rodas, Y., González-Huerta, L. V. y Sokolov, M. Y. 2005. Efecto tóxico de DDT y endosulfan en postlarvas de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) de Chiapas, México. *Revista de Biología Tropical*. 53(1):1–12. ISSN: 0034-7744.
- Cepero de García, M. C., Restrepo, S., Franco-Molano, A. E., Cárdenas, M. y Vargas, N. 2012. *Biología de Hongos*. Universidad de los Andes. Ediciones Uniandes. 1ª ed. Bogotá D. C. Colombia. ISBN: 9789586957014.
- Chen, C. Y., Huang, Y. C., Wei, C. M., Meng, M., Liu, W. H. y Yang, C. H. 2013. Properties of the newly isolated extracellular thermo-alkali-stable laccase from thermophilic actinomycetes, *Thermobifida fusca* and its application in dye intermediates oxidation. *AMB Express*. 3(49):1–9. doi: 10.1186/2191-0855-3-49.
- Chen, S., Ge, W. y Buswell, J. A. 2004. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *European Journal of Biochemistry*. 271:318–328. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03930.x.
- Cook, D. L., Shamas, J. Y., Hockenbury, M. R., Baummer, J. C., McCulloch, W. L. y Botts, J. A. 2004. Phenolics Associated with Adverse Bioassays Responses at a Tall Oil Refinery. En: Borton, D. L., Hall, T., Thomas, J. y Fisher, R. *Pulp & Paper Mill Effluent Environmental Fate & Effects*. DEStech Publications, Inc. ISBN: 9781932078374. pp. 384–396.
- Daroch, M., Houghton, C. A., Moore, J. K., Wilkinson, M. C., Carnell, A. J., Bates, A. D. y Iwanejko, L. A. 2014. Glycosylated yellow laccases of the basidiomycete *Stropharia aeruginosa*. *Enzyme and Microbial Technology*. 58:1–7. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.02.003.
- Deacon, J. 2006. *Fungal Biology*. Blackwell Publishing. 4th ed. Edinburgh, UK. ISBN: 9781405130660.

- Deveci, E. Ü., Dizge, N. Yatmaz, H. C. y Tansel, B. 2016. Degradation of Recalcitrant Textile Dyes by Coupling Fungal and Photocatalytic Membrane Reactors. *Clean Soil, Air, Water*. 44(10):1345–1351. doi: 10.1002/clen.201500838.
- Díaz, J. A. 2009. *Panaeolus sphinctrinus* en Parque Nacional de Sierra Nevada, Jerez del Marquesado, Granada, España. Ficha técnica de Granada Natural. Disponible en: https://granadanatural.com/ficha_hongos.php?cod=233.
- Durán, N. y Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*. 28:83–99. doi: 10.1016/S0926-3373(00)00168-5.
- Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P. y Kumar, A. 2010. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 68:117–128. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.11.002.
- Edineldo-Lans, C., Basilio-Díaz, P. y Manuel-Paez, M. 2011. Compuestos organoclorados residuales en dos especies ícticas de la Ciénaga Grande del Bajo Sinú, Córdoba, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*. 16(1):2402–4209. doi: 10.21897/rmvz.299.
- Estrada-Salazar, G. I. y Ramírez-Galeano, M. C. 2019. *Micología general*. Centro Editorial Universidad Católica de Manizales. 1ª ed. Manizales, Caldas, Colombia. ISBN: 9789585233713.
- Gerald, M. C. y Gerald, G. 2015. *El Libro de la Biología: Del origen de la vida a la epigenética, 250 hitos de la historia de la biología*. Librero. 1ª ed. Kerkdriel. Países Bajos. ISBN: 9789089986030.
- Glazunova, O. A., Shakhova, N. V., Psurtseva, N. V., Moiseenko, K. V., Kleimenov, S. Y. y Fedorova, T. V. 2018. White-rot basidiomycetes *Junghuhnia nitida* and *Steccherinum bourdotii*: Oxidative potential and laccase properties in comparison with *Trametes hirsuta* and *Coriolopsis caperata*. *Plos One*. 13(6):1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0197667.
- Gómez-Manzo, S., Terrón-Hernández, J., De la Mora-De la Mora, I., González-Valdez, A., Jaime Marcial-Quino, García-Torres, I., Vanoye-Carlo, A., López-Velázquez, G., Hernández-Alcántara, G., Oria-Hernández, J., Reyes-Vivas, H. y Enríquez-Flores, S. 2014. The Stability of G6PD Is Affected by Mutations with Different Clinical

- Phenotypes. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(11):21179–21201. doi: 10.3390/ijms151121179.
- Goudopoulou, A., Krimitzas, A., y Typas, M. A. 2010. Differential gene expression of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* grown on olive oil mill wastewater. *Applied microbiology and biotechnology*. 88(2):541–551. doi: 10.1007/s00253-010-2750-9.
- Griffiths, J. y Black, J. 1978. Separation and identification of alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms in serum healthy persons by isoelectric focusing. *Clinical Chemistry*. 33(12):2171–2177. doi: 10.1093/clinchem/33.12.2171.
- Hasan, F., Shah, A. y Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microbial Technology*. 39:235–251. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.
- Jiménez, L. F. y Merchant, H. 2003. *Biología celular y molecular*. Pearson. 1ª ed. México. ISBN: 970-26-0387-0.
- Kameshwar, A., Barber, R. y Qin, W. 2017. Comparative modeling and molecular docking analysis of white, brown and soft rot fungal laccases using lignin model compounds understanding the structural and functional properties of laccases. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 79:15–26. doi: 10.1016/j.jmgm.2017.10.019.
- Keum, Y. S. y Li, Q. X. 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*. 56:23–30. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.02.028.
- Levin, L., Viale, A. y Forchiassin, A. 2003. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 52:1–5. doi: 10.1016/S0964-8305(02)00091-4.
- Liu, H., Tong, C., Du, B., Liang, S. y Lin, Y. 2015. Expression and characterization of LacMP, a novel fungal laccase of *Moniliophthora perniciosa* FA553. *Biotechnology Letters*. 37:1829–1835. doi: 10.1007/s10529-015-1865-6.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:265–275. ISSN: 0021-9258.

- Lu, X. y Ding, S. 2010. Effect of Cu^{2+} , Mn^{2+} and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus*. *Mycoscience*. 51:68–74. doi: 10.1007/s10267-009-0002-6.
- Madhavi V. y Lele S. 2009. Laccase: Properties and Applications. *Bioresources*. 4(4):1694–1717. ISSN: 1930-2126.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. y Stahl, D. A. 2015. BROCK: Biología de los microorganismos. Pearson. 14ª ed. Madrid, España. ISBN: 9788490352793.
- Manahan, S. E. 2010. Environmental chemistry. CRC Press. 9th ed. Boca Raton, Florida, USA. ISBN: 9781420059205.
- Mathews, C., Holde, K.E. y Ahern, K. G. 2002. Bioquímica. Pearson Addison Wesley. 3ª ed. Madrid, España. ISBN: 9788483226940.
- Microsoft Excel. 2011. Microsoft Office 365. Windows. Microsoft Corporation. Redmond, Whashington, USA.
- Montiel-González, A. M. y Marcial, J. 2019. Phenoloxidasas of Fungi and Bioremediation. En: Tomasini, A. y León-Santiesteban, H. Fungal Bioremediation. Fundamentals and Applications. CRC Press. London, New York. ISBN-13: 9781138636408. pp. 62–90.
- Mostafalou, S. y Abdollahi, M. 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 268:157–177. doi: 10.1016/j.taap.2013.01.025.
- Murray, R. K., Bender D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W. y Weil, P. A. 2010. Harper Bioquímica ilustrada. Mc Graw Hill Lange. 28ª edición. México. ISBN: 9786071503046.
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M. y 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*. 60:327–335. doi: 10.1007/s00253-002-1109-2.
- NCBI. 2021. PubChem Compound Summary for CID 10698, 2,4,6-Trimethylphenol. National Center for Biotechnology Information. Disponible en línea en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4_6-Trimethylphenol.

- NCBI. 2021. PubChem Compound Summary for CID 79345, 4,4'-Methylenebis(2,6-dimethylphenol). National Center for Biotechnology Information. Disponible en línea en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4_4_-Methylenebis_2_6-dimethylphenol.
- Ocara, M., Vieille, P., Carvajal, L. y Cruz, R. 2019. Los Hongos en la salud y la enfermedad. Parte I. Boletín Micológico. 33(2):01–09. doi: 10.22370/bolmicol.2018.33.2.1370.
- Ondarza, R. N. 2017. Biología Moderna: La célula, bioquímica, genética y biología molecular, biología general. Trillas. 12ª ed. España. ISBN: 9786071728937.
- OriginPro, 8.5.0 SR1 b161. 2010. Windows. OriginLab Corporation. Northampton, MA USA.
- Ortega-Ávila, R. 2018. Aislamiento, identificación, crecimiento in vitro y conservación de basidiomicetos saprótrofos de un bosque de *Juniperus* del estado de Tlaxcala. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Otero, P. A. 2017. Carl Woese y los dominios de la vida. Historia de la Biología. Revista Boletín Biológica. 37(11):27–33.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. y Sannia, G. 2000. Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 66(3):920–924; doi: 10.1128/AEM.66.3.920-924.2000.
- Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G. y Giardina, P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. Enzyme and Microbial Technology. 33:220–230. doi: 10.1016/S0141-0229(03)00117-0.
- Ponce-Andrade, G. I., Vázquez-Duhalt, R., Rodríguez- Vázquez, R., Medina-Ramírez, I. E., Lozano-Álvarez, J. A. y Jáuregui-Rincón, J. 2012. Evidencia de la Biodegradación de resinas fenólicas con hongos ligninolíticos por microscopía electrónica de barrido. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 28(2):159–166. ISSN: 0188-4999.
- Porta, M., Puigdomènech, E., Ballesterb, F., Selva, J., Ribas-Fitó, N. y Domínguez-Boada, L. 2008. Estudios realizados en España sobre concentraciones en humanos de compuestos tóxicos persistentes. Gaceta Sanitaria. 22(3):248–266.

- Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, D. M., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R. y Delgado-Boada, J. M. 2013. Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*. 27:67–82. doi: 10.1016/j.fbr.2013.07.001.
- Rodríguez, S., Fernández M., Bermúdez, R. C. y Morris, H. 2002. Purificación de la enzima de lacasa a partir del cultivo de *Pleurotus ostreatus* en medios residuales. *Revista Cubana de Química*. 14(3):83–90.
- Sánchez, M., Marmolejo, F. y Bravo, N. 2000. *Microbiología: Aspectos fundamentales*. Universidad Autónoma de Colombia. Sede Palmira. ISBN: 9588095069.
- Sanhueza-Guevara, S., Neira-Osses, K., Rojas, C., Genevière, A. M. y Fernandez, C. 2018. Effects of three pesticides used to control sea lice on the early development of *Choromytilus chorus*, *Sphaerechinus granularis*, and *Paracentrotus lividus*. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 46(5):969–980. doi: 10.3856/vol46-issue5-fulltext-10.
- Scandalios, J. G. 1974. Isozymes in development and differentiation. *Annual Review of Plant Physiology*. 25:225–258.
- Schlosser, D. y Höfer, C. 2002. Laccase-catalyzed oxidation of Mn²⁺ in the presence of natural Mn³⁺ chelators as a novel source of extracellular H₂O₂ production and its impact on manganese peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:3514–3521. doi: 10.1128/AEM.68.7.3514-3521.2002.
- Sharma, M., Chaurasia, P. K., Yadav, A., Yadav, R. S. S., Yadava, S. y Yadav, K. D. S. 2016. Purification and characterization of a thermally stable yellow laccase from *Daedalea flavida* MTCC-145 with higher catalytic performance towards selective synthesis of substituted benzaldehydes. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 42:59–68. doi: 10.1134/S1068162016010143.
- Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M. y Kumar, A. 2011. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research*. 2011:1–11. doi:10.4061/2011/217861.
- Shrestha, P., Joshi, B., Joshi, J., Malla, R. y Sreerama, L. 2016. Isolation and Physicochemical Characterization of Laccase from *Ganoderma lucidum*-CDBT1 Isolated from Its Native Habitat in Nepal. *BioMed Research International*. vol. 2016 doi: 10.1155/2016/3238909.

- Steffen, K. T., Hofrichter, M, y Hatakka, A. 2002. Purification and characterization of manganese peroxidases from the litterdecomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:550–555. doi: 10.1016/S0141-0229(01)00525-7.
- Téllez-Téllez, M., Fernández, J. F., Montiel-González, A. M., Sánchez, C. y Díaz-Godínez, G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81:675–679. doi: 10.1007/s00253-008-1628-6.
- Tesauro. 2020. Glosario de terminus agrícolas. Biblioteca Nacional de Agricultura. Servicio de Investigación Agrícola, Departamento de Agricultura de EE.UU. 10301 Baltimore Avenue Beltsville. USA. Disponible en: <https://www.nal.usda.gov>.
- Tomasini, A., Montiel-González, A. M. y Fernández, F. J. 2005. Fungal phenoloxidases for use in biorremediation. En: Mellado, E. y Barredo J. L. *Microorganisms for industrial enzymes and biocontrol*. Research Signpost. Kerala, India. pp. 181–191.
- Torres-González, D. 2017. Evaluación de la expresión de enzimas ligninocelulíticas de dos especies de hongos saprófitos aislados de un bosque de *Juniperus* en Tlaxcala. Tesis en Maestría en Ciencias Biológicas. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Ullrich, R., Huong, L. M., Dung, N. L. y Hofrichter, M. 2005. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67:357–363. doi: 10.1007/s00253-004-1861-6.
- Vakonaki, E., Androutopoulos, V. P., Liesivuori, J., Tsatsakis, A. M. y Spandidos, D. A. 2013. Pesticides and oncogenic modulation. *Toxicology*. 307:42–45. doi: 10.1016/j.tox.2013.01.008.
- Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A. P. y Narasimha, G. 2014. *Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation*. Hindawi Publishing Corporation. *Enzyme Research*. 2014:1–21. doi: 10.1155/2014/163242.
- Vitorino, L. y Bessa, L. 2017. Technological Microbiology: Development and Applications. *Frontiers in Microbiology*. 8:1–23. doi: 10.3389/fmicb.2017.00827.

- Wu, Y. R., Luo, Z. H., Chow, R. K. K. y Vrijmoed, L. P. P. 2010. Purification and characterization of an extracellular laccase from the anthracene-degrading fungus *Fusarium solani* MAS2. *Bioresourse Technology*. 101:9772–9777. doi: 10.1016/j.biortech.2010.07.091.
- Yuan, X., Tian, G., Zhao, Y., Zhao, L., Wang, H. y Ng, T. B. 2016. Biochemical Characteristics of Three Laccase Isoforms from the Basidiomycete *Pleurotus nebrodensis*. *Molecules*. 21(203):1–15. doi: 10.3390/molecules21020203.