

RECYT

Año 21 / Nº 32 / 2019 / 91–98

Efectos de pH, temperatura y tiempo de incubación sobre el crecimiento fúngico y la actividad lacasa en *Trametes villosa* BAFC 2755

Effects of pH, temperature and incubation time on fungal growth and laccase activity in *Trametes villosa* BAFC 2755

Mónica L. Barchuk^{1,*}, María I. Fonseca¹, Ernesto M. Giorgio¹, Pedro D. Zapata

1- Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones "María Ebe Reca",
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM. Posadas, Argentina.

* E-mail: lucre_barchuk@hotmail.com

Resumen

Los hongos de pudrición blanca, como *Trametes villosa* BAFC 2755, son los únicos organismos capaces de degradar eficientemente la lignina debido a que poseen un sistema enzimático oxidativo. Una de las enzimas más importantes en este proceso es la lacasa. Esta es una fenoloxidasas, que posee aplicaciones en varios procesos biotecnológicos incluyendo la deslignificación de la pulpa de papel, detoxificación de químicos recalcitrantes, degradación de compuestos policíclicos aromáticos, biorremediación de suelos y aguas contaminadas. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del pH, la temperatura y el tiempo de incubación sobre el crecimiento y el potencial oxidativo de *T. villosa* BAFC 2755. Para ello se llevaron a cabo ensayos en medio de cultivo ME y se determinó la actividad lacasa. Para complementar el análisis se caracterizó una región del gen que codifica para una lacasa. Los resultados obtenidos mostraron que las condiciones que mejoraron la producción de biomasa no fueron las que soportaron la mayor actividad lacasa. Los máximos niveles de actividad se registraron a 25° C al día 14 para pH 5,5 siendo de 200 U/L. El perfil de isoenzimas de lacasa fue afectado por el pH, la temperatura y el tiempo de cultivo, encontrándose tres isoenzimas de 64 kDa, 123 kDa y 132 kDa. Además, se obtuvo una secuencia nucleotídica de 779 pb de un gen que codifica para lacasa, cuya secuencia proteica mostró identidad de 90% con secuencias pertenecientes al gen *lacasa* de otras especies de *Trametes* sp.

Palabras clave: *Trametes* Lacasa, Isoenzimas. Biomasa fúngica.

Abstract

White rot fungi, such as *Trametes villosa* BAFC 2755, are the only organisms capable of efficiently degrading lignin due to their oxidative enzymatic system. One of the most important enzymes in this process is laccase. This is a phenol oxidase, which has applications in several biotechnological processes including pulp delignification, detoxification of recalcitrant chemicals, degradation of polycyclic aromatic compounds, bioremediation of contaminated soils and waters. The objective of this work was to evaluate the effect of pH, temperature and incubation time on the growth and oxidative potential of *T. villosa* BAFC 2755, for that were carried out a quantitative of tests in culture medium ME and activity in lacasa were determined, to complete the analysis a gene fragment of this enzyme were characterize. The results obtained showed that the conditions that improved biomass production were not those that supported the greatest activity laccase. Maximum activity levels (200 U/L), were recorded after 14 days, at pH 5.5 and 25° C. Laccase's isoenzyme profile was affected by pH, temperature and culture time, with three isoenzymes of 64 kDa, 123 kDa and 132 kDa. In addition, a nucleotide sequence of 779 bp was obtained from a gene coding for laccase, whose protein sequence showed 90% identity with sequences belonging to the laccase gene of other species of *Trametes* sp.

Keywords: enzymatic activity, fungal biomass, white rot fungus, isoenzymes.

Introducción

Entre los microorganismos que degradan eficientemente la lignina se encuentran los hongos de pudrición blanca,

que bajo condiciones naturales colonizan fustes vivos o muertos (Eriksson *et al.*, 1990). El crecimiento y la fisiología de los hongos ligninolíticos depende de su capacidad intrínseca de crecimiento y de degradación de la lignina,

para lo que es necesario un eficiente sistema enzimático (Fonseca *et al.* 2014). Las principales enzimas ligninolíticas son oxidasas (lacasa, E.C 1.10.3.2) y peroxidadas como lignino peroxidasa (EC 1.11.1.14) y manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13).

Las lacasas pertenecen a la familia de las multicobre oxidasas, que usualmente contienen varios átomos de cobre en su centro catalítico (Thurston, 1994). Debido a la baja especificidad de sustrato, las lacasas pueden tener varias aplicaciones biotecnológicas incluyendo la deslignificación de la pulpa, detoxificación de químicos recalcitrantes, degradación de compuestos policíclicos aromáticos, biorremediación de suelos y de aguas contaminadas (Mayer y Staples, 2002). Una alternativa para superar esta dificultad es aislar microorganismos con alto potencial biotecnológico y optimizar las condiciones de cultivo tanto para el desarrollo micelial como para la producción y secreción de lacasas (Narashima *et al.*, 2005). Asimismo, la caracterización de la estructura génica y la identificación de las secuencias reguladoras y catalíticas permiten incursionar en otras formas de incrementar la producción de lacasa a través de la expresión homóloga y/o heteróloga de la misma (Fonseca *et al.*, 2018).

En objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del pH, la temperatura y el tiempo de incubación sobre el crecimiento y el potencial oxidativo de *T. villosa* BAFC 2755 mediante ensayos cuantitativos de actividad lacasa en medio líquido y caracterizar un fragmento génico de esta enzima.

Materiales y Métodos

Material biológico

En este estudio se utilizó el hongo de pudrición blanca *T. villosa* BAFC 2755 autóctono de la Provincia de Misiones, proveniente del cepario del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Para el proceso de clonación molecular se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α .

Efectos del pH, temperatura y día de cultivo sobre la biomasa fúngica y la actividad lacasa producida

Para la preparación de tacos fúngicos se utilizaron cultivos primarios en medio de cultivo extracto de malta-agar (MEA) conteniendo 12,7 g/L de extracto de malta y 20 g/L de agar en placas de Petri de 90 mm de diámetro, las cuales se inocularon por punción con ansa aguja en el centro de la placa y los cultivos se incubaron durante 5 días a 29° C en estufa. Posteriormente los tacos de agar con micelio se extrajeron a partir de los márgenes de la colonia

en crecimiento con la ayuda de un sacabocados de metal, de 0,5 cm de diámetro. Los tacos obtenidos se utilizaron para la inoculación de los medios de cultivo líquidos.

Los ensayos en medio de cultivo líquido para el estudio del efecto de pH, temperatura y días de cultivo sobre la producción de biomasa fúngica y la actividad lacasa producida se llevaron a cabo en erlenmeyers de 250 mL. A los cuales se les adicionó 50 mL de medio compuesto por 12,7 g/L de extracto de malta, 5 mL/L de concentrado soluble de maíz (ME). El medio de cultivo se ajustó a pH 3,5; 4,5 y 5,5 con 0,1 N de HCl y 0,1 N de NaOH. Estos medios se incubaron a 25, 29 y 33° C en estufa en condiciones estáticas colectando muestras a los 7, 10 y 14 días.

Determinación de biomasa fúngica

Para determinar la biomasa fúngica, se llevaron a cabo muestras destructivas, para ello el micelio se separó utilizando filtros de papel con fibra de vidrio (GF/C) y se secó a 80° C/24 h.

Determinación de actividad lacasa producida

La determinación de actividad lacasa se realizó empleando la técnica descrita por Field *et al.* (1993) con 2,6-dimetoxifenol (DMP) 5 mM como sustrato en *buffer* acetato de sodio 0,1 mM (pH 3,6). La absorbancia se cuantificó a 469 nm ($E_{469} = 27,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-3600. La actividad enzimática se expresó en unidades enzimáticas (U), donde 1 U es equivalente a 1 $\mu\text{M}/\text{min}$ de producto a 30° C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

La presencia de isoenzimas se determinó mediante electroforesis no desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 7,5% p/v (ND-PAGE; Laemmli, 1979; Murugesan *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2010). Se sembraron 20 μg de proteínas totales por carril (cuantificadas por el método de Bradford). La corrida electroforética se realizó a 100 V por 120 min en *buffer* Tris-Glicina 1,5 M, pH 8,3. Los geles se fijaron en una solución conteniendo 40% v/v de metanol, 10% v/v de ácido acético y se revelaron con una solución de DMP 5 mM en *buffer* acetato de sodio 0,1 M (pH 3,6) durante 10 min para detectar la actividad lacasa (Murugesan *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2010).

El peso molecular se determinó mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) utilizando un patrón de masa molecular preteñido (*Prestained Kaleidoscope* SDS-PAGE *standard broad range* de BioRad; Laemmli, 1979; Murugesan *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2010). Se sembraron 20 μg de proteínas totales por carril. La corrida electroforética se realizó a 100 V por 120 min en *buffer* Tris-Glicina 1,5 M, pH 8,3. Para la detección de las bandas el gel se trató previamente con una solución de acetato de sodio 50 mM

y Tritón X-100 0,2% v/v durante 30 min para eliminar el SDS y permitir el replegamiento del dominio catalítico. Luego se reveló con DMP 5 mM en *buffer* acetato de sodio pH 3,6 durante 10 min (Murugesan *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2010).

Análisis estadístico

El análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el test de Bonferroni se realizó utilizando *GraphPad Prism* versión 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Aislamiento de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio crecido en medio líquido ME durante 5 días siguiendo el protocolo propuesto por Fonseca *et al.*, 2015.

Amplificación y purificación de un fragmento del gen *lacasa*

Para la amplificación de la región del gen que codifica para *lacasa* se utilizaron cebadores que hibridan en la región de unión al cobre II: 5'-ACNTTTTGGTAYCA-YAGYCA-3' (Fonseca *et al.*, 2018) y región de unión al cobre IV: 5'-TGRAARTCDATRTGRCARTG-3' (Hoshida *et al.*, 2001). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 μ L, conteniendo 2,5 mM de Cl_2Mg , 200 μ M dNTP's, 10 pmol de cada cebador, 1 U de *Pfu* polimerasa y 30 ng de ADN templado. El ciclado consistió en una desnaturalización a 94° C por 3 min, 35 ciclos de 94° C por 40 s, 50° C por 40 s y 72° C por 40 s y una elongación final a 72° C por 10 min.

La banda de interés fue recortada a partir del gel de agarosa y purificada con el kit *Wizard SV gel and PCR Clean-Up System* (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Clonación y secuenciación del fragmento del gen *lacasa* amplificado

Las células *E. coli* DH5 α se hicieron competentes con el método de $CaCl_2$ (Sambrook, 1989). Los fragmentos de interés con extremos romos se procesaron para contener la *A-tailing* y se ligaron con el vector pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor. Diez colonias con el inserto se seleccionaron, los plásmidos se purificaron por lisis alcalina (Sambrook, 1989) y se secuenciaron (Macrogen-Corea y ArgenINTA).

Análisis bioinformático

El análisis *in silico* de los resultados de la secuenciación se llevó a cabo mediante distintas herramientas bioinfor-

máticas. En primer lugar, todas las secuencias fueron contrastadas con las bases de datos del NCBI mediante Blastn (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast). Los tres posibles marcos de lecturas se obtuvieron con EXPASY TRASLATE (www.expasy.org) determinándose el correcto con Blastp. Para detectar los posibles sitios de glicosilación se empleó la herramienta disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/output.php>.

Resultados

Efecto del pH, temperatura y tiempo de incubación sobre el crecimiento fúngico, la actividad enzimática y el perfil isoenzimático de lacasas producidas

A 25° C la mayor biomasa fúngica ($0,161 \pm 0,018$ g) se observó a pH 4,5 a los 14 días de incubación. A 29° C el máximo crecimiento se observó ($0,313 \pm 0,008$ g) a pH 5,5 a los 7 días de incubación. Por otro lado, a 33° C los niveles promedios de biomasa máximos ($0,076 \pm 0,003$ g) se observaron a pH 4,5 y 5,5 a los 10 días de incubación (Figura 1). Respecto a la actividad enzimática los máximos niveles se observaron a 25° C, pH 5,5 a los 14 días (≈ 200 U/L); a 29° C, pH 3,5 a los 10 días (≈ 100 U/L); y a 33° C, pH 3,5 a los 14 días de incubación (≈ 150 U/L; $p < 0,05$, Figura 1).

El análisis de correlación mostró una asociación positiva a 25° C para pH 3,5 y 4,5 entre la biomasa y la actividad enzimática ($r=0,99$). A 33° C se observó correlación positiva a pH 3,5 con un aumento de biomasa asociado al aumento de actividad enzimática ($r=0,88$).

En tanto que, a 29° C no se observó correlación en ninguno de los pH analizados.

Respecto al perfil isoenzimático, se observaron 2 isoenzimas a 25 y 33° C cuya presencia varió con el pH y los días de cultivo. A 29° C predominó la fracción enzimática de mayor movilidad, mientras que en condiciones de pH 4,5 a 14 días de incubación se observó una banda de menor movilidad (Figura 1).

Para establecer una relación entre las variables se realizó un análisis de correlación (Tabla 1). Los resultados mostraron que el pH, la biomasa y la actividad enzimática dependieron del tiempo y temperatura de incubación.

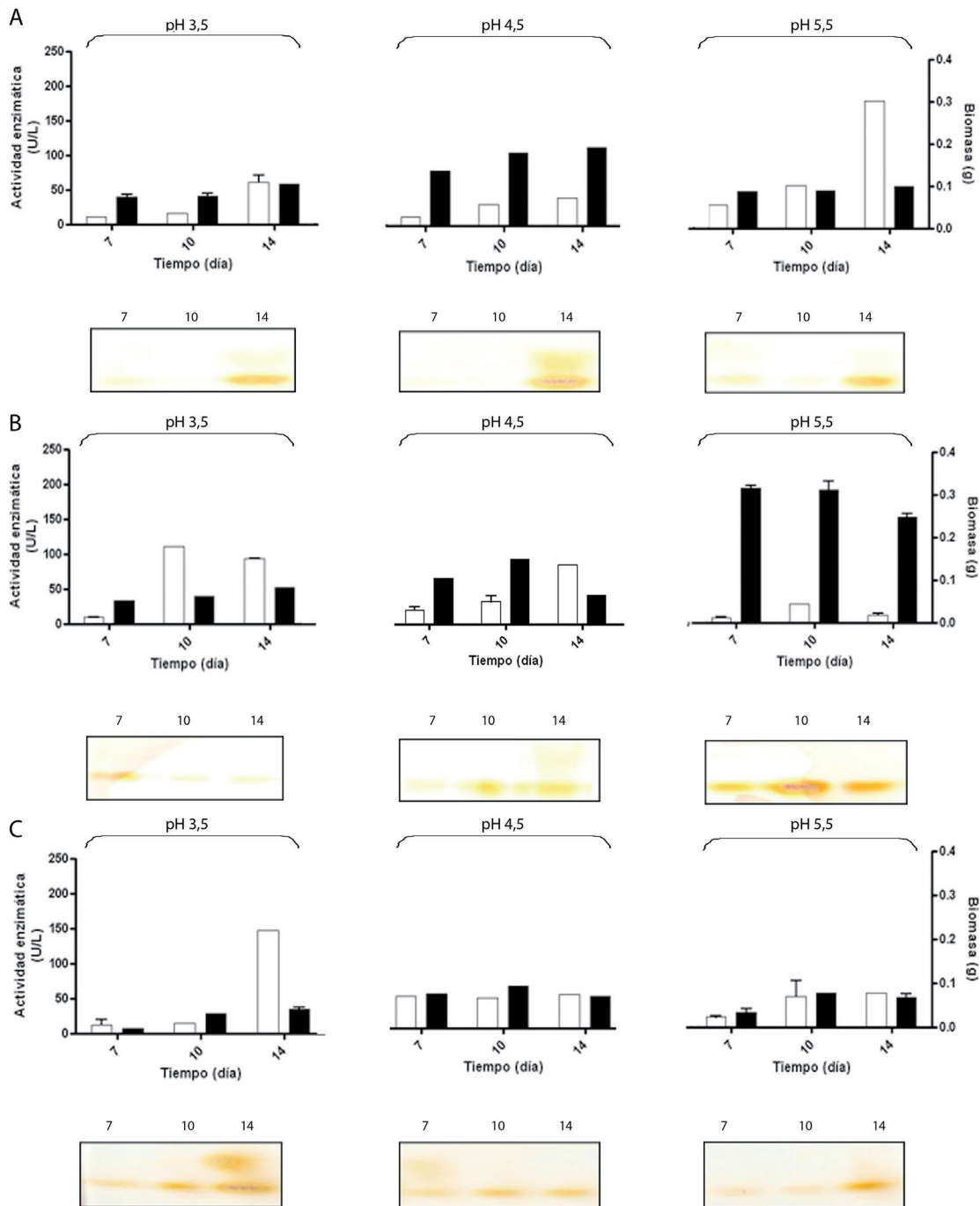


Figura 1: Efecto del pH, la temperatura y días de incubación sobre la producción de biomasa (■) y la actividad lacasa (□) de *T. villosa* BAFC 2755 a 25° C (A), 29° C (B), 33° C (C). Debajo de cada gráfico se muestran los respectivos zimogramas. Se sembraron 20 µg de proteínas/pocillo para cada condición evaluada, utilizando geles de poliacrilamida no desnaturalizantes (ND-PAGE) al 7,5% p/v los que se revelaron con DMP. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. La biomasa correspondió al procesamiento de 50 mL de cultivo.

Tabla 1: Análisis de correlación entre las variables Biomasa, pH y AE, teniendo en cuenta la temperatura y los días de incubación.

T (° C)	t (días)	BIOMASA-pH		AE-pH		BIOMASA-AE	
		CC	p-valor	CC	p-valor	CC	p-valor
25	7	0,38	0,4572	0,88	0,0213*	-0,10	0,8457
	10	0,23	0,65	0,97	0,0014*	-0,01	0,9806
	14	0,06	0,90	0,78	0,0654	-0,57	0,2426
29	7	0,96	0,0028*	-0,15	0,7744	-0,41	0,4250
	10	0,99	0,0002*	-0,89	0,0147*	-0,84	0,0363*
	14	0,84	0,0380*	-0,87	0,0252*	-0,99	0,0001*
33	7	0,32	0,537	0,05	0,9285	0,91	0,0114*
	10	0,61	0,2012	0,64	0,1699	0,69	0,1268
	14	0,58	0,2252	-0,87	0,0231*	-0,83	0,0427*

Para estimar el peso molecular de las diferentes isoenzimas observadas en los experimentos anteriores, se procedió a su separación electroforética mediante SDS-PAGE y posterior renaturalización y detección según técnica descripta previamente (Figura 2). Se detectaron tres isoenzimas, de 64 kDa, 123 kDa y 132 kDa.

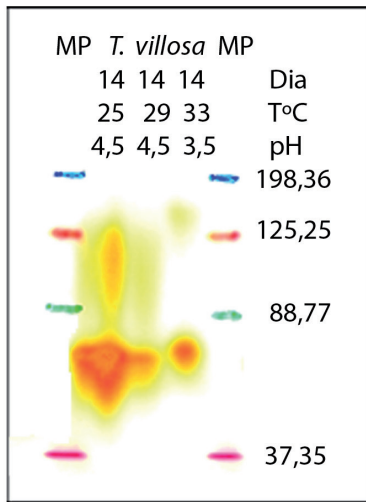


Figura 2: Estimación del peso molecular de isoenzimas lacasa de *T. villosa* BAFC 2755 producidas en medio ME a diferente pH, temperatura y día de incubación. Se sembraron 20 µg de proteínas/pocillo en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 7,5% p/v (SDS-PAGE), las proteínas se renaturalizaron y posteriormente se revelaron con DMP. Las flechas indican las isoenzimas. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

Aislamiento y caracterización de un fragmento del gen lacasa de *T. villosa* BAFC 2755

Con los cebadores que hibridan sobre la región de unión al cobre II y IV se obtuvo un amplicón que fue recortado, clonado, purificado y secuenciado. El amplicón secuenciado de 779 pb (GenBank: JQ844454.1, Figura 3) mostró identidad de 90% con secuencias pertenecientes al gen *lacasa* de otras especies de *Trametes* sp. (p. ej. GenBank AAW28934.1, AOX15704.1). En el análisis *in silico* se encontraron tres intrones y cuatro exones, los cuales codificarían para una proteína parcial de 205 aminoácidos. No se detectaron sitios de glicosilación en la secuencia proteica parcial.

Discusión

Como fue mencionado al analizar las relaciones entre biomasa y actividad enzimática producida para *T. villosa*

BAFC 2755 únicamente se observó una asociación positiva a 25° C (pH 3,5 y 4,5) y 33° C (pH 3,5) mostrando un comportamiento similar a los informados previamente en especies de *Pleurotus* sp. (Das *et al.*, 1997; Rodríguez, *et al.*, 2003). Sin embargo, no se observó un patrón definido en la mayoría de las condiciones evaluadas, lo que podría indicar que existe una regulación diferencial independiente del crecimiento del micelio con respecto a la actividad enzimática.

En general en los hongos ligninolíticos la actividad enzimática se expresa e incrementa bajo concentraciones limitantes de nutrientes en el medio de cultivo, es decir durante la idiofase. Una mayor concentración de biomasa consume rápidamente los nutrientes presentes en el medio basal y, en condiciones limitantes se activa el metabolismo secundario donde se expresan las enzimas ligninolíticas (Eggert *et al.*, 1996; Galhaup *et al.*, 2002). Sin embargo, la producción de lacasa fúngica asociada con el metabolismo secundario presenta como desventaja la presencia de grandes cantidades de biomasa fúngica que dependen a su vez de las condiciones del medio de cultivo (Moreira *et al.*, 1998).

Para *T. villosa* BAFC 2755 bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas, probablemente la producción de lacasa no sería regulada por condiciones limitantes de nutrientes.

También se observó que los mayores niveles de biomasa a 29° C y pH 5,5, y en menor cantidad a pH 4,5, no aseguraron la máxima actividad de lacasa. Esta falta de relación podría deberse a la falta de expresión de lacasa debido a que diferencias en el pH pueden inducir o no a que determinadas enzimas se expresen (Mouso *et al.*, 2003) y también puede afectar el crecimiento micelial.

La falta de asociación positiva entre el crecimiento y la actividad lacasa observada a 25° C pH 5,5 puede deberse a un aumento de la producción o a una acumulación de la enzima con una vida media larga en estas condiciones. De modo similar, en *Trichoderma viride* y *T. longibrachiatum* crecidos en medio basal a 30° C y pH 6 con el agregado de diferentes concentraciones de glucosa, no se encontró

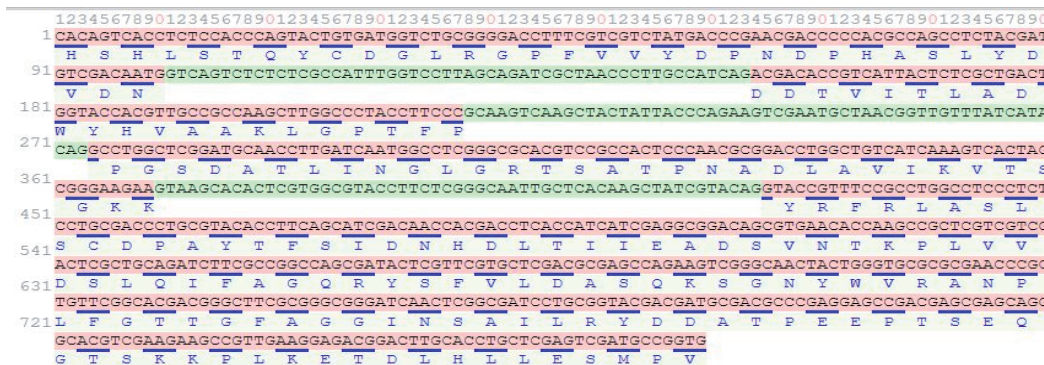


Figura 3: Secuencia parcial nucleotídica y aminoacídica de lacasa de *T. villosa* BAFC 2755 (JQ844454.1). Se muestra la secuencia de los exones (en rosa) y los intrones (en verde). La secuencia de cada codón se indica debajo con o sin el subrayado en azul y el aminoácido que codifica en letra del mismo color.

correlación entre el crecimiento y la actividad lacasa producida (Gochev & Krastanov, 2007). Por otro lado, a 33° C pH 4,5 y 5,5, las condiciones no favorecieron el crecimiento ni la secreción enzimática. Esto podría deberse a la falta de adaptación del hongo en estas condiciones con la consecuente disminución de la actividad lacasa producida.

Varios reportes demuestran que algunas especies de *Trametes* sp. son buenas productoras de lacasa (Nyanhongo *et al.*, 2002; Rancaño *et al.*, 2003; Baldrian, 2004), mientras que otros trabajos ponen en evidencia la incapacidad de ciertas especies de *Trametes* sp. para expresar niveles significativos de lacasa (Rajendran *et al.*, 2011). Estas diferencias en la capacidad de producción de lacasa pueden ser atribuidas a la variabilidad intra o interespecíficas (Quarantino *et al.*, 2008).

Con respecto al análisis de isoenzimas, muchos autores han reportado la existencia de isoenzimas de lacasas en varias especies de hongos de la pudrición blanca con masas moleculares de 60 kDa a 80 kDa (Salas *et al.*, 1995; Ko *et al.*, 2001; Dong & Zhang, 2004; García *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; García *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2007; Dantán-González *et al.*, 2008). Giardina *et al.*, (1999) concuerdan en que muchas especies de hongos producen más de una isoenzima lacasa según las condiciones de cultivo siendo estas importantes para la eficiente colonización del sustrato y que algunas están asociadas al crecimiento (Das *et al.*, 1997). En este trabajo se describe la presencia de tres nuevas isoenzimas para una cepa autóctona de la provincia de Misiones *T. villosa* BAFC 2755. Quedándose por analizar el papel que desempeña cada una de estas isoenzimas en el proceso de maduración de las hifas y en la capacidad adaptativa de esta cepa a distintos ambientes y condiciones.

Por último, las lacasas fúngicas poseen secuencias de unión al cobre altamente conservadas que posibilitan el diseño de cebadores degenerados, y con estos cebadores obtener secuencias génicas de diferentes basidiomicetes (D'Souza *et al.*, 1996). Basados en este conocimiento, un fragmento del gen de *T. villosa* BAFC 2755 fue clonado y secuenciado. Esta secuencia parcial permitirá, en trabajos posteriores, profundizar sobre la regulación de la expresión genética de la enzima lacasa codificada-secretada en *T. villosa* BAFC 2755.

Conclusiones

El efecto combinado del pH, la temperatura y el tiempo de incubación mostró una marcada influencia sobre el crecimiento y la actividad lacasa producida por *T. villosa* BAFC 2755. No fue posible establecer una relación clara entre los niveles de biomasa y la actividad enzimática en la mayoría de las condiciones evaluadas. Las condiciones que mejoraron la producción de biomasa no necesariamente fueron las que soportaron la mayor actividad enzimática

lacasa. El perfil isoenzimático de lacasa también se vio influenciado por el pH, la temperatura y el tiempo de incubación, describiéndose hasta tres isoenzimas para la cepa BAFC 2755 de *T. villosa*. La secuencia nucleotídica obtenida mostró un 90% de identidad con lacasas de otros basidiomicetes. Estos resultados sentarán las bases para futuras investigaciones de la proteína, como así también para su aplicación en diferentes procesos.

Bibliografía

1. Baldrian P. 2004. *Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus Daedalea quercina and decolorization of synthetic dyes by the enzyme*. Applied Microbiology and Biotechnology, 63: 560-3.
2. Das N, Sengupta S, Mukherjee M. 1997. *Importance of laccase in vegetative growth of Pleurotus florida*. Applied and Environmental Microbiology, 63: 4120-4122.
3. Dantán-González E, Vite-Vallejo O, Martínez-Anaya C, Méndez-Sánchez M, González MC, Palomares LA, Folch-Mallol J. 2008. *Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of Pycnoporus sanguineus isolated from an oil-polluted tropical habitat*. International Microbiology, 11: 163-9
4. Dong JL & Zhang YZ. 2004. *Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a ligninolytic fungus Trametes gallica*. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 34:179-94.
5. Eggert C, Temp U, Eriksson E. 1996. *The ligninolytic system of the white rot fungus Pycnoporus cinnabarinus: purification and characterization of the laccase*. Applied and Environmental Microbiology, 62: 1151-1158
6. Eriksson KE, Blanchette RA, Ander P. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1990. 397 p.
7. Field JA, Jong ED, Costa GF, Bont JAM. 1992. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi*. Applied and Environmental Microbiology, 58: 2219-2228.
8. Fonseca MI, Molina MA, Winnik DL, Busi MV, Fariña JI, Villalba LL, Zapata PD. 2018. *Isolation of a laccase-coding gene from the lignin-degrading fungus Phlebia brevispora BAFC 633 and heterologous expression in Pichia pastoris*. J Appl Microbiol. 124(6):1454-1468.
9. Fonseca MI., Fariña JI., Sadañoski MA., D'Errico Roger, Villalba LL., Zapata PD. *Decolorization of Kraft liquor effluents and biochemical characterization of laccases from Phlebia brevispora BAFC 633*. Internat Bietet Biodeg. 104 (2015) 443-451.
10. Fonseca MI, Fariña JI, Castrillo ML, Rodríguez D, Nuñez C, Villalba LL, Zapata PD. *Biopulping of wood chips with Phlebia brevispora BAFC 633 reduces lignin content and improves pulp quality*. Internat Bietet Biodeg 2014; 90:29-35.

11. Fonseca MI, Fariña JI, Sanabria NI, Villalba LL, Zapata PD. (2013). *Influence of culture conditions on laccase production, growth, and isoenzymes patterns in native white rot fungi from the Misiones rainforest (Argentina)*, *Bio-Resources*. 8, 2855-2866.
12. Fonseca MI, Shimizu E, Villalba LL, Zapata PD. (2010). *Laccase-producing ability and the inducing effect of Copper on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina)*. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(6): 534-539.
13. Galhaup C, Goller S, Peterbauer CK, Strauss J, Haltrich D. 2002. *Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions*. *Microbiology*, 148: 2159-2169.
14. Garcia TA, Santiago MF, Ulhoa CJ. 2006. *Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylidine*. *Biotechnology Letters*, 28: 633-6.
15. Garcia TA, Santiago MF, Ulhoa CJ. 2007. *Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75: 311-8.
16. Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G, Sannia G. 1999. *Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus**. *Biochemical Journal*, 341: 635-663.
17. Gochev VK & Krastanov AI. 2007. *Fungal Laccases*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13: 75-83
18. Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T. 1998. *Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae)*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1601-1606.
19. Ko EM, Leem YE, Choi HT. 2001. *Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 98-102.
20. Laemmli UK. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227, 680-685.
21. Lu L, Zhao M, Zhang BB, Yu SY, Bian XJ, Wang W. 2007. *Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 1232-9.
22. Mayer AM & Staples RC. 2002. *Laccase: new functions for an old enzyme*. *Phytochemistry*, 60: 551-565.
23. Moreira MT, Feijoo G, Mester T, Mayorga P, Sierra-Alvarez R, Field, JA. 1998. *Role of organic acids in the manganese-independent biobleaching system of *Bjerkandera* sp. strain BOS55*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2409-2417.
24. Mouso N, Papinutti L, Forchiasin F. 2003. *Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20: 176-8.
25. Murugesan K, Nam IH, Kim YM, Chang YS. 2007. *Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid culture*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1662-1672.
26. Narashima G, Sridevi A, Buddolla V, Subhosh CM, Rajasekhar RB (2005). *Nutrient effects on production of cellulotic enzymes by *Aspergillus niger**. *African journal of biotechnology* 5(5):472-476.
27. Nyanhongo GS, Gomes J, Gübitz G, Zvaury R, Read JS, Steiner W. 2002. *Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta**. *Bioresource Technology*, 84: 259-263.
28. Patel H, Gupte A, Gupte S. 2009. *Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by *Basidiomycetes* fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation*. *BioResources*, 4: 268-284.
29. Quaratino D, Ciaffi M, Federici E, D'annibale A. 2008. *Response surface methodology study of laccase production in *Panus tigrinus* liquid cultures*. *Biochemical Engineering Journal*, 39: 236-245.
30. Rajendran K, Annuar MSM, Karim MAA. 2011. *Optimization of nutrient levels for laccase fermentation using statistical techniques* *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 19: 73-81
31. Ranaño G, Lorenzo M, Molares N, Rodríguez S, Sanromán MA. 2003. *Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor*. *Process Biochemistry*, 39: 467-473.
32. Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez RC, Morris H. 2003. *Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp.* *Revista Iberoamericana de Micología*, 20: 164-168.
33. Salas C, Lobos S, Larraín J, Salas L, Cullen D, Vicuña R. 1995. *Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora**. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 21: 323-33.
34. Thurston CF. 1994. *The structure and function of fungal laccases*. *Microbiology*. 140: 19-26.
35. Tien M, Kirk TK. 1983. *Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds*. *Science*, 221: 661-663.
36. Zhang H, Hong YZ, Xiao YZ, Yuan J, Tu XM, Zhang XQ. 2006. *Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 89-94

Recibido: 08/01/2019.

Aprobado: 09/08/2019.