

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA
LACASA AISLADA DEL MICROORGANISMO TERMÓFILO
ANTÁRTICO GEOBACILLUS SP. ID17***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Bioquímica de proteínas y biotecnología y Memoria para optar
al Título de Bioquímico por:**

JOAQUÍN IGNACIO ATALAH ZÚÑIGA

Directora de Tesis: Dra. Jenny Blamey Alegría

Santiago-CHILE

Mayo 2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

JOAQUÍN IGNACIO ATALAH ZÚÑIGA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Directora de Tesis:

Dra. Jenny Blamey Alegría _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

M.S.c Davor Cotoras _____

Dra. Ana Preller _____

Dr. Sergio Lobos _____

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis sólo ha sido posible gracias a la presencia e intervención de muchas personas, a quienes reconozco como los verdaderos responsables de mis logros.

Y por eso quiero agradecer, en primer lugar, a mi padre, por inculcarme desde temprana edad el amor por el conocimiento y la naturaleza, y a mi madre, por ser siempre un ejemplo de dedicación, templanza, entrega y fortaleza.

A mis tres abuelos, por ser mis referentes éticos y dianoéticos, y por haberme educado siempre con su generosidad, y su sabiduría humana y académica. Y a toda mi familia por su apoyo constante e incondicional.

A todos mis compañeros de carrera, que estimularon constantemente mis ganas de seguir aprendiendo y seguir mejorando, pero especialmente a Álvaro, Claudia, Macarena, Javiera, Fabiola, Dixon, Vicente, Martín y Roberto, con quienes compartí todas las alegrías y todas las frustraciones que implican intentar convertirse en un científico. Su compañía y ejemplo fue quizás lo más determinante en mi formación como bioquímico.

A todos en Fundación Biociencia, porque todos contribuyeron material y emocionalmente a la realización de esta tesis.

A la profe Jenny, que siempre me transmitió la seguridad de confiar en mí, y creer en mis capacidades, y eso siempre me motivó a seguir adelante.

Por supuesto a todos mis amigos, por tenerme paciencia en mis atrapes y tener una fe probablemente sobredimensionada en mi éxito y mi valor.

Al Instituto Antártico Chileno, INACH, por contribuir al financiamiento de esta Tesis.

A Sasha, HOFFIE, Nichols, Charli, Niche y Euterpe, por la inspiración metafísica.

A Francisca Moraga, por su amable disposición sin la cual me hubiera perdido en la burocracia administrativa.

Y en fin, a todos los que me han enseñado algo, me han dado una mano, o me han hecho dudar cuando ha sido necesario hacerlo.

INDICE GENERAL

1.INTRODUCCIÓN	11
1.1 DISTRIBUCIÓN EN LA NATURALEZA	12
1.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS LACASAS BACTERIANAS	13
1.3 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE SU SITIO ACTIVO	15
1.4 MECANISMO DE REACCIÓN.....	18
1.5 REACTIVIDAD Y SUSTRATOS DE LAS LACASAS	20
1.6 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.....	22
1.7 EL INTERÉS DE ENCONTRAR NUEVAS LACASAS BACTERIANAS.....	25
2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1.1 OBTENCIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS.....	28
3.1.2 MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	28
3.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD LACASA.....	28
3.3 OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LACASA MEDIDA EN EL EXTRACTO CRUDO DE <i>Geobacillus</i> sp. ID17	29
3.4 GENERACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO	30
3.5 PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA	30
3.6 EFECTO DEL PH Y LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	32
3.7 TERMOESTABILIDAD DE LA ENZIMA PURIFICADA	32
3.8 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	32
3.9 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR	33
3.10 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS	33
3.11 ENSAYOS DE ACTIVIDAD PEROXIDASA	35
3.12 CINÉTICA ENZIMÁTICA	37
4.RESULTADOS	38
4.1.1 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	38
4.1.2 OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD MEDIDA EN EL EXTRACTO CRUDO....	42
4.2 PURIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS PRESENTES EN EL EXTRACTO CRUDO	44
4.2.1 PURIFICACIÓN DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD LACASA.....	44
4.2.2 PURIFICACIÓN DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD POLIFENOL OXIDASA DEPENDIENTE DE COBRE	52

4.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS ENZIMAS	56
4.3.1 DEPENDENCIA POR LA TEMPERATURA	56
4.3.2 DEPENDENCIA POR EL PH.....	57
4.3.3 TERMOESTABILIDAD	59
4.3.4 BÚSQUEDA DE SUSTRATOS.....	60
4.3.5 MASA MOLECULAR	61
4.3.6 CONSTANTES CINÉTICAS	63
4.4 ENSAYOS DE ACTIVIDAD PEROXIDASA	64
5.DISCUSIÓN.....	65
6.CONCLUSIONES.....	76
7.REFERENCIAS	77

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1 – Representación esquemática de la reacción catalizada por las lacasas	11
Figura 2 – Representación del sitio activo de la lacasa CotA	17
Figura 3 – Estructura cristalográfica de CueO, CotA y SLAC.....	17
Figura 4 – Esquema del ciclo catalítico de las lacasas.	20
Figura 5 – Oxidación de la SGZ en presencia de concentraciones crecientes del extracto crudo del <i>Geobacillus</i> ID17.	38
Figura 6 – Dependencia por la temperatura de la actividad enzimática encontrada en el extracto crudo. ..	39
Figura 7 – Variación de la actividad enzimática observada en el extracto crudo a diferentes pH levemente alcalinos.....	40
Figura 8 – Ensayo de Inhibición con peróxido de hidrógeno	41
Figura 9 - Actividad medida en el extracto crudo al suplementar el medio de cultivo con diferentes inductores de expresión.....	42
Figura 10 – Efecto de la concentración de cobre del medio de cultivo en la actividad enzimática medida en el extracto crudo	43
Figura 11 – Efecto de agregar peróxido en el medio de la reacción con SGZ a las distintas fracciones obtenidas en el segundo paso cromatográfico	46
Figura 12 – SDS-PAGE de las fracciones obtenidas tras cargar y eluir el extracto crudo en una columna Q-Seph	48
Figura 13 – Actividad y concentración de proteína de las fracciones obtenidas en el segundo paso cromatográfico	50
Figura 14 – SDS-PAGE con las fracciones obtenidas de los últimos dos pasos cromatográficos	51
Figura 15 – SDS-PAGE con las fracciones obtenidas en cada paso de purificación del Frente Q-Sepharose (SC-Q)	54
Figura 16 – Actividad y concentración de proteínas de las fracciones que eluyen de la columna superdex-200 después de ser cargada con el frente Q-Sepharose	55
Figura 17 – Dependencia por la temperatura de la actividad enzimática de LID17.	56
Figura 18 – Dependencia por la temperatura de la actividad enzimática de O-SCQ.....	57
Figura 19 – Dependencia por el pH de la actividad enzimática de LID17	58
Figura 20 – Dependencia por el pH de la actividad enzimática de O-SCQ	58
Figura 21 – Termoestabilidad de la enzima lacasa LID17	59
Figura 22 - Relación entre la masa molecular y el factor de desplazamiento	62
Figura 23 - Curva de calibración para la determinación de la masa molecular en la columna Superdex-... ..	62
Figura 24 - Gráfico de doble recíproco de la oxidación de SGZ por LID17	63
Figura 25 – Estructura tentativa de una subunidad de la lacasa LID17.....	74
Tabla 1 - Absorción máxima de diferentes sustratos de las lacasas	34
Tabla 2 – Purificación de la enzima lacasa LID17	47
Tabla 3 – Protocolo de purificación de la enzima O-SCQ.....	53
Tabla 4 – Sustratos ensayados para las diferentes enzimas.....	60
Tabla 5 – Ensayos de actividad peroxidasa	64

ABREVIACIONES

ABTS :	Ácido azino bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
DEAE:	Dietilaminoetil
EDTA:	Ácido etilén diamino tetraacético
EPR:	Espectroscopía de resonancia electrónica paramagnética.
FPLC:	Cromatografía líquida rápida de proteínas
K _{av} :	Coefficiente de partición
K _m :	Constante de Michaelis-Menten
LID17:	Lacasa <i>Geobacillus</i> sp. ID17
MCO:	Multicobre oxidasa
ORF:	Marco de lectura abierto
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Q-Seph:	Q-Sepharose
RBB:	Remazol Brilliant Blue
SDS:	Dodecil sulfato sódico
SGZ:	Siringaldazina
Tris:	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U:	Unidades de actividad
UV-Vis:	Ultravioleta - Visible

RESUMEN

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA LACASA AISLADA DEL MICROORGANISMO TERMÓFILO ANTÁRTICO *GEOBACILLUS* SP. ID17.

Las lacasas son enzimas de la familia de las multi-cobre oxidasas que han suscitado mucho interés debido a su amplia especificidad de sustrato, la variabilidad de sus propiedades entre cada especie, y su todavía elusivo mecanismo de reacción.

La presencia de cuatro centros de cobre en su sitio activo la convierte en un modelo interesante para el estudio de la relación entre la estructura y la función de proteínas. Estos átomos de cobre son además responsables de las propiedades catalíticas de las lacasas y exhiben propiedades redox y espectroscópicas que son propias de estas enzimas.

Es posible encontrarlas en hongos, plantas y en procariontes. Las lacasas bacterianas poseen muchas ventajas desde el punto de vista aplicado por sobre las lacasas de hongos, que hasta hoy se encuentran mejor caracterizadas. En general poseen una mayor termoestabilidad, y exhiben un perfil de pH distinto, lo que permite ampliar el número de aplicaciones de estas enzimas.

Sus propiedades las hacen buenas candidatas para diversas aplicaciones biotecnológicas, que van desde la industria textil hasta la industria de alimentos, e incluyen su aplicación como biosensores, su uso en bioremediación de suelos y aguas entre otros.

En este trabajo se caracteriza una lacasa recientemente detectada en el microorganismo termófilo antártico *Geobacillus* sp. ID17. Esta es la primera lacasa caracterizada de una bacteria antártica, y la primera lacasa intracelular descrita de este género bacteriano.

La purificación de la enzima se logró utilizando cromatografía de intercambio aniónico y exclusión molecular. Luego de obtener una muestra pura se determinaron sus propiedades bioquímicas y su rango de sustratos.

La lacasa purificada demostró poseer una alta estabilidad térmica a pH neutro y 55 °C. Se detectó la mayor actividad enzimática en el rango entre 55 y 60 °C, a pH 7,5. Además la enzima posee una mayor selectividad de sustrato que otras lacasas descritas a la fecha.

Adicionalmente, se describe la purificación parcial de una segunda enzima presente en el extracto crudo del *Geobacillus* sp. ID17, que demostró poseer una actividad peroxidasa dependiente de cobre.

ABSTRACT

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL LACCASE ISOLATED FROM ANTARCTIC THERMOPHILIC MICROORGANISM *GEOBACILLUS* SP. ID17.

Laccases are enzymes from the Multi-Copper Oxidase family that have gathered high attention due to their wide range of substrates, their interspecies variability and their still elusive mechanism of action.

The presence of four copper atoms in their active site makes them an interesting model for the study of the relationship between the structure and function of proteins. These copper atoms are responsible for the catalytic properties of laccases and exhibit redox and spectroscopic features unique to this class of enzymes.

It is possible to find them in fungi, plants, and prokaryotes. Bacterial laccases display many advantages over fungal laccases for their application. They have, in general, a higher thermal stability and a different pH profile, which contributes to widen the possible application of laccases.

In this thesis a new laccase from an Antarctic microorganism, *Geobacillus* sp. ID17, is purified and characterized. This is the first Antarctic bacterial laccase to be functionally described, and the first intracellular laccase from this bacterial genus.

The pH profile, catalytic constants, and thermal behavior of the enzyme is described. A screening of different laccase substrates reveals that this new laccase has different substrate specificity than the commercial laccase from *Trametes versicolor*.

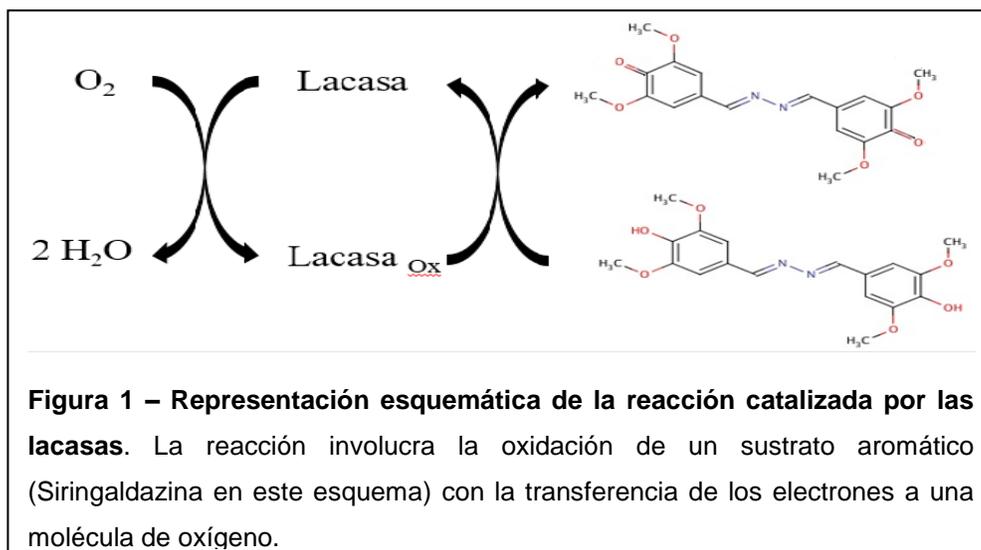
The enzyme was purified using anionic exchange and size-exclusion chromatography. After obtaining a pure enzyme, its biochemical parameters and substrate specificity were determined.

The purified laccase showed high thermal stability at neutral pH and 55 °C. The highest activity was detected between 55 °C and 60 °C, at pH 7,5. Additionally, this enzyme shows higher substrate selectivity than other previously described laccases.

Additionally, the partial purification of a second enzyme present in the crude extract of *Geobacillus* sp. ID17, which seems to display a copper dependent peroxidase activity, is described.

1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas (Benzenodiol:oxígeno oxidoreductasas, EC 1.10.3.2) son metaloenzimas de la familia de las multi-cobre oxidasas (MCOs) que catalizan la oxidación de una gran variedad de compuestos aromáticos, particularmente aquellos que poseen grupos nucleofílicos como fenoles y anilinas. Debido a su amplio rango de sustratos, son de gran relevancia como modelo para el estudio de la relación entre la estructura y función de proteínas, y más recientemente, como herramienta verde para la biocatálisis de procesos industriales. El hecho de que este tipo de enzimas requiera de oxígeno molecular como sustrato siendo agua el principal residuo de la reacción (Figura 1), las vuelve particularmente atractivas para éste último fin. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y sus propiedades varían notoriamente entre diferentes especies, a pesar de que sus estructuras parecen ser muy conservadas. Una característica relevante de las lacasas es que poseen tres núcleos de cobre en su sitio activo que participan en el traspaso de electrones desde el sustrato al oxígeno diatómico, y pueden ser identificados mediante técnicas espectroscópicas. Las diferencias en el potencial redox de estos cationes de cobre parecen ser determinantes de las propiedades catalíticas de las MCOs.



1.1 DISTRIBUCIÓN EN LA NATURALEZA

La primera lacasa descrita fue aislada desde el árbol *Toxicodendron vernicifluum* en 1883 (Yoshida H., 1883), y hasta la fecha es la lacasa vegetal mejor descrita. Otras lacasas se han encontrado y caracterizado en diferentes especies vegetales como *Rhus succedanea* (Omura T., 1961), *Acer pseudoplatanus* (Sterjiades y cols., 1992), *Pinus taeda* (Bao W. y cols., 1993), *Populus euramericana* (Ranocha P. y cols., 1999), *Liliodendron tulipifera* (Lafayette P.R. y cols., 1999), *Nicotiana tobacco* (Kiefer-Meyer M.C. y cols. 1996), y *Zea mays* (Caparros-Ruiz D. y cols., 2006). En plantas, se ha observado que están involucradas en la síntesis de lignina y catalizan la polimerización de radicales libres resultantes de la oxidación de las unidades estructurales de la lignina: Alcoholes sinapílico, coniferílico y p-cumarílico (Gavnholt B. y Larsen K., 2002). Las lacasas de origen vegetal tienen pH óptimo generalmente neutro, o relativamente alcalino. Se ha descrito lacasas vegetales, como la de *Opuntia vulgaris*, que poseen una alta termoestabilidad y retienen su actividad a temperaturas de hasta 80°C (Kumar G.N. y Srikumar K., 2010).

La mayoría de las lacasas descritas, sin embargo, han sido encontradas en hongos basidiomicetos y ascomicetos, principalmente en aquellos que participan en la descomposición de la madera, pero incluso en algunos hongos cultivables como *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* (Morozova O.V. y cols. 2007). Las lacasas de hongos participan en la degradación de la lignina, en la patogénesis y procesos de detoxificación, así como en el desarrollo y morfogénesis del hongo (Baldrian P., 2006). La lacasa mejor descrita hasta la fecha es la que proviene del hongo *Trametes versicolor* (Addleman K. y Archibald F.S., 1993; Jönsson, Sjöström, Häggström y Nyman, 1995; Waldner, Leisola y Fiechter, 1988; Forootanfar H. y cols. 2012) de la cual se conocen seis isoformas (Mikuni J. y Morohoshi N., 1997; Brown M.A., Zhao Z., Mauk A. G., 2002). Es una lacasa de alto potencial de reducción y alta actividad actividad específica,

por lo cual se ha impuesto como el modelo para la mayor parte estudios funcionales y estructurales que se han hecho con las lacasas.

A pesar de que por más de un siglo se creyó que estas enzimas eran exclusivas de eucariontes, en las últimas décadas, se ha reportado un número cada vez mayor de lacasas en bacterias y arqueas. La primera actividad lacasa confirmada en un procarionte fue encontrada en *Azospirillum lipoferum* (Givaudan A. y cols. 1993). Esta última es una enzima multimérica compuesta de una subunidad catalítica de baja masa molecular y dos subunidades regulatorias de mayor tamaño. Se han encontrado variantes de esta enzima en *Marinomonas mediterranea* (Solano F. y cols., 1997), *E. coli* (Grass G. y Rensing C., 2001) y *Bacillus subtilis* (Martins L.O. y cols., 2002). Tras estos descubrimientos se han mostrado cada vez más evidencias de la distribución de esta enzima en diferentes genomas de bacterias (Alexandre G. y Zhulin I.B., 2000). Las funciones fisiológicas de las lacasas de procariontes todavía no están del todo claras, pero se ha visto que están involucradas en la pigmentación celular y en la oxidación de metales.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS LACASAS BACTERIANAS

La mayoría de las lacasas bacterianas hasta ahora descritas han sido aisladas de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, a pesar que se han reportado genes de la enzima en muchas especies (Ausec L. y cols., 2011). La lacasa bacteriana más estudiada, tanto en cuanto sus características como a sus aplicaciones, es la recombinante CotA de *Bacillus subtilis* (Martins L.O., 2002; Bento I. y cols., 2005; Brander S., Mikkelsen J.D., Kepp K.P., 2014; Martins L.O. y cols., 2015). Estudios estructurales y de rayos X de la lacasa CotA muestran las geometrías típicas de los centros de cobre y el plegamiento general de las multi-cobre oxidasas con tres dominios cupredoxina (Bento I., 2005; Enguita F.J., 2003). La mayoría de las lacasas identificadas en *Bacillus* que se han encontrado forman parte de la cubierta externa que protege las esporas. A la fecha se han caracterizado y

aislado lacasas de muchos otros bacilos (Ruijsenaars H.J. y Hartmans S., 2004; Sondhi S. y cols. 2014; Martins L.O. y cols., 2015).

Las lacasas de *Streptomyces* son extracelulares y han sido identificadas y caracterizadas de una variedad de especies como *S. cyaneus* (Moya R. y cols., 2010), *S. griseus* (Endo K. y cols., 2003), *S. lavendulae* (Suzuki T. y cols., 2003), *S. coelicolor* (Machczynski M.C. y cols. 2004; Skalova T. y cols. 2009) y muchas otras (Martins L.O. y cols., 2015). La más estudiada hasta ahora es la de *S. coelicolor*. Las lacasas de *Streptomyces* pueden ser triméricas o diméricas, y solo poseen dos de los tres dominios cupredoxina típicos de las lacasas (Skalova T. y cols., 2009).

También se han reportado lacasas en bacterias y arqueas termófilas, con actividades a temperaturas de hasta 80°C, muy por sobre las temperaturas de actividad presentes en lacasas de hongos. (Fernandes A.T. y cols., 2010; Fernandes A.T. y cols., 2007; Miyazaki K., 2005).

En general las lacasas bacterianas muestran una clara preferencia por pHs neutros o alcalinos, mientras que las lacasas de hongos tienen tasas de máxima actividad en pHs ácidos (Claus H., 2003). Los compuestos fenólicos exhiben transiciones ácido-base en los pH neutros y alcalinos, por lo que las lacasas de hongos los oxidan en las formas fenólicas mientras que las lacasas bacterianas son capaces de oxidar los fenolatos. Esto se ha atribuido a las diferencias estructurales que se observan en la vecindad del sitio de unión a sustrato. Sin embargo, todas las lacasas de hongos conocidas poseen un residuo aspártico o glutámico en este sitio, que se ha propuesto tiene un rol en la estabilización del radical fenoxi que se forma durante la catálisis (Madzak C., 2006; Kallio J.P. y cols., 2009), el cual no está presente en ninguna lacasa bacteriana encontrada hasta ahora. La eficiencia de oxidación de fenoles de las lacasas bacterianas que carecen de un residuo negativo en el sitio activo depende del equilibrio de

protonación/desprotonación, mostrando entonces una tasa máxima de catálisis a valores de pH cercanos o por sobre la pK_A del sustrato.

1.3 ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE SU SITIO ACTIVO

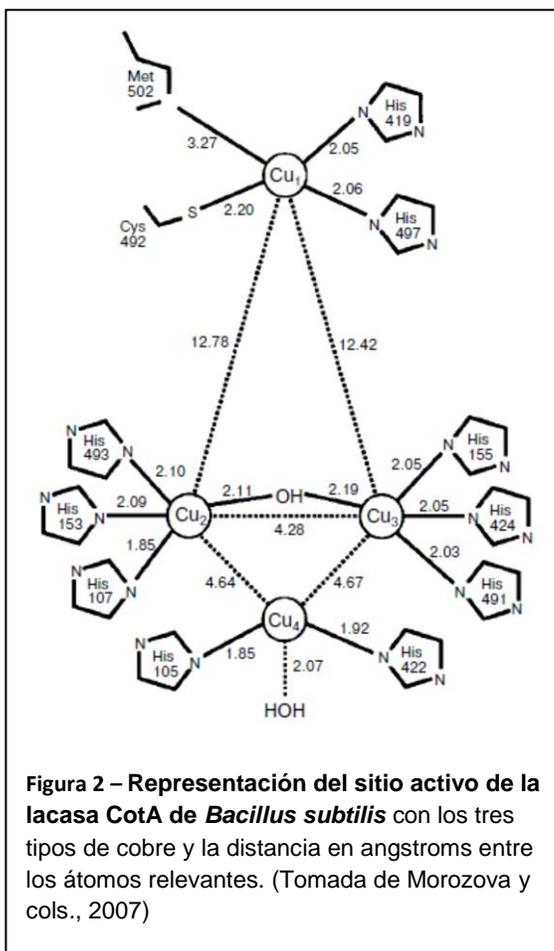
La estructura de las lacasas se ha deducido principalmente de los estudios en hongos. Éstas enzimas poseen glicosilaciones (que corresponden del 10 al 45% de su masa total) y cuatro átomos de cobre con distinta absorbancia y propiedades electroparamagnéticas. El alineamiento de secuencias de lacasas de hongos demuestra que los dominios de unión a cobre presentes en el sitio activo son altamente conservados, aunque el resto de los aminoácidos tenga poca similitud (Cullen D., 1997; Dean J.F.D y Eriksson K.E.L., 1994). La mayoría de las lacasas bacterianas conocidas consisten en proteínas que contienen aproximadamente 500 residuos aminoácídicos. Están compuestas de tres dominios cupredoxina que se unen para formar los tres sitios Cu espectroscópicamente diferentes (Solomon E.I. y cols., 1996). Los sitios de cobre T1 están en el dominio 3, y el cluster trinuclear en la interfase entre los dominios 1 y 3 con ligandos en cada dominio. Las estructuras de rayos X de las lacasas CotA muestran geometrías típicas de centros de cobre y el plegamiento general de las multi-cobre oxidasas con tres dominios cupredoxina (Bento I., 2005; Enguita F.J., 2003). Las lacasas de *Streptomyces* son lacasas de dos dominios que no poseen el segundo dominio típico de las MCOs (Skalova T. y cols., 2009). Aun así, conservan los cuatro átomos de cobre y las propiedades cinéticas y espectroscópicas de las lacasas comunes (Gunne M. y cols., 2014). Sus estructuras cristalinas revelan un ensamblado trimérico de las cadenas peptídicas de dos dominios.

Los sitios de cobre de las lacasas se clasifican según sus propiedades espectrales ópticas y de resonancia paramagnética electrónica (EPR) (Solomon E.I. y cols., 1996; Reinhammar B.R. y Vänngård T.I., 1971). Las MCOs son únicas en cuanto poseen tres núcleos de cobre de distintos tipos, con diferentes

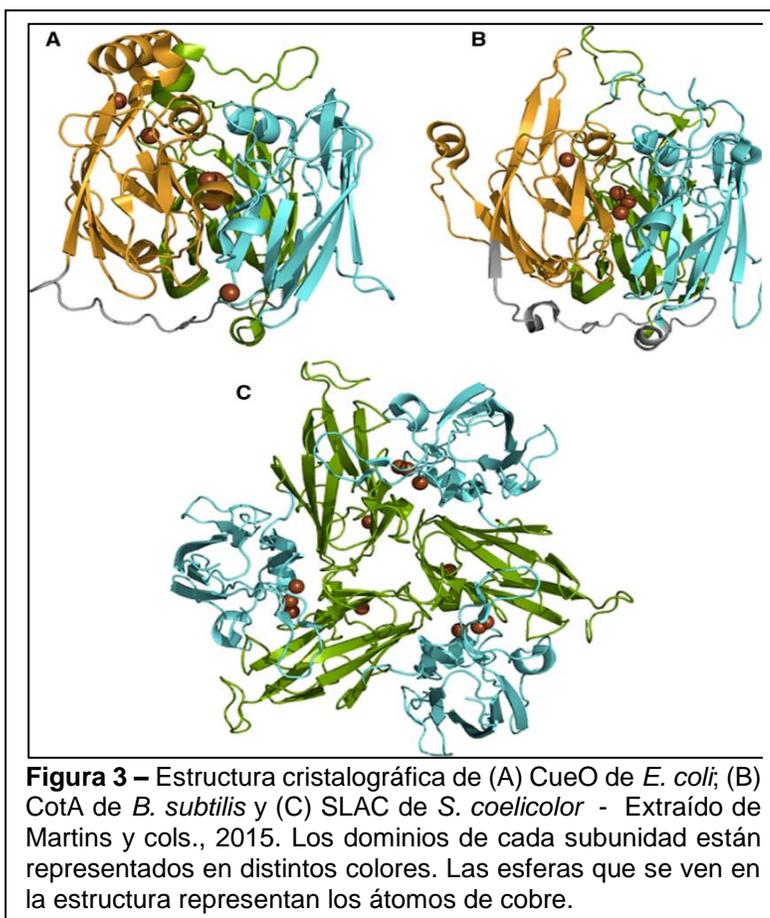
geometrías de coordinación (Figura 2). Las lacasas se componen de tres motivos tipo cupredoxina, y poseen dos centros de cobre. Cerca de la superficie de la proteína hay un centro monocúprico llamado sitio T1, el cual está coordinado por dos histidinas y una cisteína. Internalizado en la proteína existe un cluster trinuclear, llamado sitio T2-T3, el cual posee dos cobres T3 coordinados por tres histidinas cada uno y un centro T2 coordinado por dos residuos de histidina (Morozova O.V. y cols., 2007).

El sitio T1 le confiere a las lacasas una banda de absorción característica a 600 nm en el espectro UV-visible, por la cual han sido llamadas MCOs “azules”. Se presenta además en forma de una separación paralela superfina débil en el espectro EPR (Solomon E.I. y cols., 1996) que sugiere una geometría tetraédrica

(Colman P.M. y cols., 1978). Este sitio tiene como ligandos dos imidazoles de residuos de histidina y el sulfhidrilo de una cisteína. Algunas lacasas poseen además un residuo de metionina que genera una estructura tetraédrica distorsionada. Es interesante hacer notar que la lacasa de *T. versicolor* no presenta la absorbancia fuerte a 600 nm. Se han reportado muchas otras lacasas que tampoco lo hacen, y han sido llamadas lacasas “amarillas” y “blancas” (Chaurasia P.K., Bharati S.L., Singh S.K., 2013).



El cobre T2 mononuclear, invisible en el espectro de absorción, muestra una separación ultrafina en el EPR que es típico de los iones de cobre en complejos tetragonales (Quintanar L. y cols., 2005). Este sitio puede ser removido selectivamente de la enzima, lo que es acompañado por una pérdida de actividad enzimática. El sitio T3 es binuclear, posee dos iones de cobre apareados antiferromagnéticamente a través de un puente hidroxilo que hace de este un sitio diamagnético y lo vuelve indetectable por el espectro EPR. Este núcleo de cobre puede ser identificado por la presencia de un hombro a 330 nm en la región UV del espectro de absorción (Solomon E.I. y cols., 1996). Ocho imidazoles de histidina son ligandos del cluster T2/T3 (8,110).



Las estructuras de los sitios activos de lacasas de distintas fuentes son muy parecidas. Comparando la secuencia de más de 100 lacasas, se encontraron cuatro regiones conservadas, específicas para lacasas (Kumar S.V.S. y cols., 2003). Una cisteína y diez residuos de histidina forman el ambiente de ligandos a iones de cobre del sitio

activo y están presentes en estas cuatro secuencias conservadas.

1.4 MECANISMO DE REACCIÓN

La oxidación de un sustrato reductor por parte de una lacasa involucra la pérdida de un electrón y la formación de un catión libre radicalario, el cual en general es inestable y puede sufrir un segundo paso oxidativo catalizado por la lacasa, para por ejemplo formar una quinona desde un fenol, o reacciones no enzimáticas como desproporción o polimerización (Madhavi V. y Lele S.S. 2009). La transferencia de electrones desde el sustrato al cobre T1 es controlada por una diferencia de potencial redox. Un menor potencial de oxidación de sustrato, o un mayor potencial redox del cobre T1 en general resulta en una tasa de oxidación más alta. Por esta razón el potencial redox de este sitio es un buen parámetro para predecir la capacidad de una lacasa de oxidar un sustrato.

Pareciera que el bolsillo de unión para el sustrato reductor es superficial y tiene un efecto estérico limitado para sustratos como fenoles simples. En contraste, el sitio de unión del oxígeno molecular, que está más hundido en la estructura y en contacto con el clúster trinuclear, parece restringir el acceso de otros agentes que no sean O₂. La activación del O₂ probablemente implica la formación de un enlace con el cluster trinuclear. Solomon E.I. y cols. (1996) propuso que, en condiciones de recambio, la transferencia desde el sustrato al sitio T1 es un paso determinante en la tasa de reacción.

Aunque el mecanismo catalítico exacto de las lacasas no se comprende por completo, se sabe que éste involucra la reducción del cobre T1 por el sustrato, el cual le transfiere uno a uno y directamente sus electrones. Se requieren cuatro electrones para la oxidación completa de la lacasa. Desde el sitio T3 diamagnético se transfieren los electrones en pasos de dos equivalentes al oxígeno molecular, lo que requiere la transferencia interna de electrones desde el núcleo T1 al núcleo T2/T3. En el cluster trinuclear ocurre la reducción del dióxigeno a agua y se ha identificado un intermediario peróxido para ésta

reacción (Solomon E.I. y cols., 2002). La reoxidación del cobre T1 es mediada por el cobre T2.

Se han descrito dos formas que la enzima adquiere durante el ciclo catalítico, llamadas intermediario peróxido e intermediario nativo (Shleev S. y cols., 2005; Lee S.K. y cols., 2002). Tras el paso de los primeros dos electrones desde la enzima al oxígeno molecular, se forma el intermediario peróxido, seguido por el segundo paso de dos electrones para formar el intermediario nativo, el cual es la forma catalíticamente relevante, completamente oxidada de la enzima. La naturaleza del sitio catalítico y las especies radicalarias formadas también ha sido explorada por EPR de multifrecuencia combinada (Pogni R. y cols. 2010). El intermediario nativo juega un rol importante en el ciclo catalítico de la lacasa. Durante la reacción con oxígeno molecular, este intermediario actúa como un radical de oxígeno. Vistos por EPR, los cuatro cobres se ven oxidados en el intermediario nativo (Enguita F.J. *et al*, 2003). La estructura de este intermediario es diferente de aquella de la enzima “en reposo”, y el cobre T2 no está conectado con los iones del sitio T3. El sitio T2/T3 completamente reducido interacciona con el oxígeno molecular produciendo el intermediario peróxido. Se ha supuesto que el intermediario peróxido contiene el ion O_2^{2-} con uno de sus átomos de oxígeno unidos al cobre T2 y T3 y el otro átomo coordinado con otro átomo de cobre T3 (Shleev S. y cols., 2005). La separación del puente peróxido O-O en la transición desde el intermediario peróxido al intermediario nativo incluye un mecanismo de transferencia de protones y electrones que no está claro en detalle. A su vez, el intermediario nativo puede transformarse lentamente a una forma completamente oxidada, la cual es generalmente considerada como la lacasa “en reposo”. El sitio T1 de esta forma de la enzima se puede reducir por un sustrato, pero la tasa de transferencia electrónica al cluster trinuclear es demasiado lenta para ser significativa para la catálisis. La Figura 4 muestra un esquema del ciclo catalítico recién descrito.

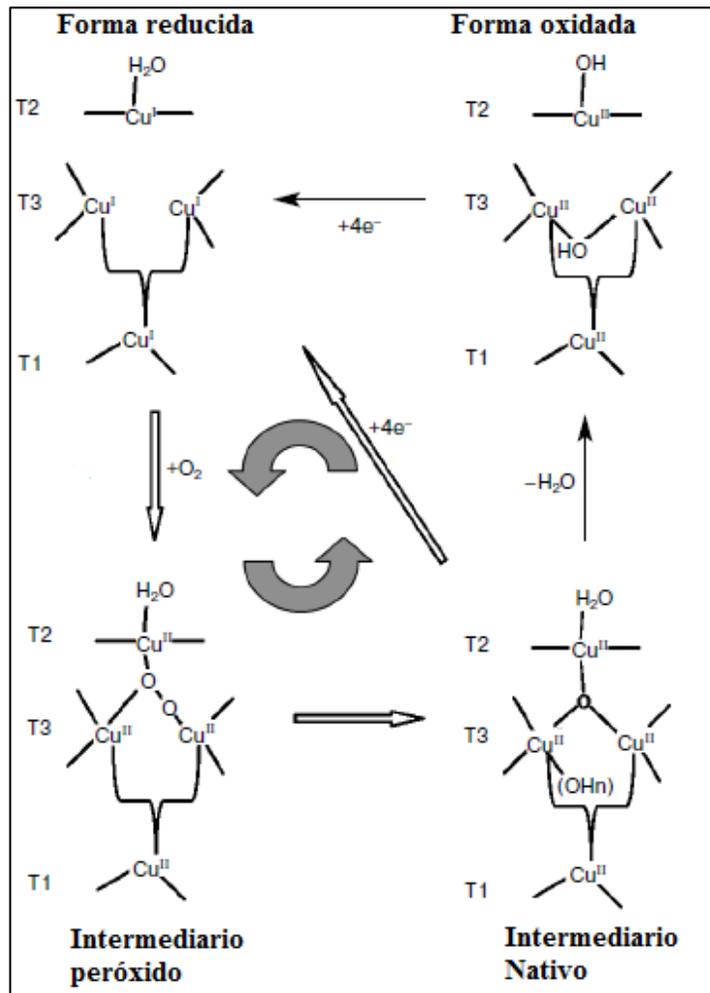


Figura 4 – Esquema del ciclo catalítico de las lacasas. Se muestra el mecanismo de la oxidación y reducción de los sitios de cobre la enzima. (Adaptado desde Morozova O.V. y cols, 2007).

1.5 REACTIVIDAD Y SUSTRATOS DE LAS LACASAS

Las lacasas catalizan la oxidación de una amplia gama de compuestos orgánicos que incluyen fenoles, fenoles metoxi-sustituídos, aminofenoles, diaminas, e incluso algunos iones inorgánicos (Morozova O.V. y cols. 2007). Los valores de la K_m y la K_{cat} de diferentes lacasas varían mucho para un mismo sustrato. La mayoría de las lacasas combinan una alta afinidad por ABTS y siringaldazina con una alta constante catalítica, mientras que el guayacol y 2,6-Dimetoxifenol son

oxidados más lentamente, y las constantes de Michaelis son significativamente más altas. Pequeños valores de K_m son específicos para hidroquinona y ácido sinápico (generalmente usado como modelo de la lignina) y siríngico, mientras que valores altos se encuentran para fenoles *para*-sustituídos, como el ácido *p*-cumárico y aldehído vanílico. (Morozova O.V. y cols. 2007). En general las lacasas responden de manera similar a varios inhibidores de la actividad enzimática. En un estudio conducido por Bollag J.M. y Leonowicz A. (1984) se encontró que la azida, el ácido tioglicólico y el ácido dietilditiocarbámico inhibían a las lacasas, mientras que el EDTA las afectaba en menor medida. Pequeños aniones como los halógenos, excluido el yoduro, la azida y el cianuro, así como el hidroxilo se unen al cobre T2 y T3, cortando el flujo electrónico interno e inhibiendo la actividad de la enzima (Xu F., 1996). Otros inhibidores incluyen los metales como Hg^{+2} , ácidos grasos, sulfhidrido e hidroxilglicina, y detergentes catiónicos de amonio cuaternario. El ditiotreitól, tioglicolato y etilditiocarbamato son también inhibidores conocidos de las lacasas.

Los potenciales redox estándar de los tres sitios de cobre de las lacasas son características clave de estas enzimas. Basado en su potencial redox, las MCOs se han subdividido en alto, medio, y bajo potencial. Se creía que el potencial de las enzimas que contienen cobre dependía del ambiente químico generado por los ligandos del cobre T1, y de los residuos que forman el bolsillo de unión a sustrato. Las lacasas de alto potencial tienen un residuo de fenilalanina como el ligando axial del sitio T1, en las de medio y bajo potencial este rol lo cumple una leucina, o una metionina, respectivamente. Sin embargo, estudios en los que se ha realizado mutagénesis directa de las lacasas de *M. thermophila*, *R. solani* y *T. villosa* (Xu F., 1998) han mostrado que el ambiente de ligandos del sitio T1 no tiene una influencia muy fuerte sobre el potencial. Recientemente se ha sugerido que un aumento en la longitud del enlace entre el cobre y el nitrógeno de los residuos de histidina debería afectar el potencial redox del sitio T1 debido a la menor contribución del par libre de electrones en el átomo de nitrógeno. La hélice

alfa corta que contiene la histidina 458 que es ligando del cobre T1 en la lacasa de alto potencial de *T. versicolor* está más lejos del ion de cobre comparado con su localización en la lacasa de potencial medio de *C. cinereus*, y parece probable que esto sea causado por la formación de un puente de hidrógeno entre Glu460 y Ser113 en el primer dominio. Se deduce que la presencia de este puente de hidrógeno (Ser-Glu) influencia el potencial del cobre T1 en la lacasa de *C. cinereus*. La comparación de secuencias de amino ácidos de lacasas y sus potenciales redox confirman esta hipótesis; las lacasas que contienen ácido glutámico y serina en las posiciones que corresponden a Glu460 y Ser113 en la lacasa de *T. versicolor* son las de alto potencial (Piontek K. y cols., 2002).

El sitio T1 de la enzima es el principal aceptor electrónico de sustratos reductores. Las lacasas pueden oxidar directamente solo los compuestos que tienen un potencial de ionización no más alto que el potencial redox del sitio de cobre T1. El potencial del sitio T1 de la enzima también determina la eficiencia para la catálisis de la oxidación de la mayoría de los sustratos, y esto hace que las lacasas con un potencial redox alto en el sitio T1 sean prometedoras desde el punto de vista biotecnológico. El rango de compuestos oxidables puede ser ampliado implementando un compuesto mediador, como el ABTS, que puede reaccionar químicamente, no enzimáticamente, con otros compuestos que no pueden ser oxidados directamente por las lacasas. El mediador es reducido a su estado inicial por el compuesto sujeto a oxidación, y así se genera un ciclo cerrado. Se ha reportado el uso de acetosiringona, siringaldehído y ácido violúrico como mediadores efectivos (Reis R., 2011).

1.6 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

La oxidación catalizada por lacasas origina especies radicalarias que pueden dar paso a procesos sintéticos o degradativos. Estos radicales pueden sufrir tres destinos dependiendo de varios factores. El primero es la agrupación oxidativa, que ocurre en compuestos fenólicos o anilinas aromáticas que al ser oxidadas

por lacasas generan radicales que reaccionan entre sí para formar dímeros, oligómeros o polímeros unidos covalentemente por enlaces C-C, C-O y C-N. La estructura del producto final es determinada por la reactividad de los intermediarios y el pH del medio. Esta propiedad se puede usar para sintetizar polímeros y tinciones y además para funcionalizar superficies. Dependiendo de su estabilidad y reversibilidad redox, los radicales pueden reagruparse en sí mismos y llegar a productos finales, o en la tercera opción, actuar como mediadores para la oxidación de compuestos no fenólicos. Las últimas dos clases de acción de las lacasas se pueden reproducir *in vitro* para aplicaciones biotecnológicas como blanqueado y bio-remediación. La polimerización de compuestos fenólicos se puede usar para bio-remediar suelos por agrupación oxidativa a la matriz (Sjoblad R.D y Bollag J.M. 1981; Leonowicz A. y cols., 2001). Así mismo, las lacasas pueden degradar polímeros complejos como la lignina (Dean J.F.D y Eriksson K.E.L., 1994) o ácidos húmicos (Claus H. y Filip Z., 1998). Los radicales reactivos generados llevan al clivaje de los enlaces covalentes, especialmente alquil-aril- y a la liberación de los monómeros. Por impedimento estérico, las lacasas pueden no entrar en contacto directo con los polímeros. Sin embargo, pequeños compuestos orgánicos que también pueden ser oxidados y activados por lacasas como alcohol veratrílico, ácido 3-hidroxi-antranílico (Claus H., 2003), median la despolimerización catalizada por radicales.

Debido a sus propiedades catalíticas y su amplio rango de sustratos existe un interés creciente en el uso de lacasas como biocatalizadores de procesos oxidativos en las más variadas áreas industriales. Por ejemplo, se ha sugerido su utilidad para la bio-remediación de aguas de la industria de la comida. Los compuestos aromáticos, incluidos fenoles y aminas, constituyen la mayor clase de contaminantes (Karam J. y Nicell J.A. 1997). La presencia de estos compuestos en bebestibles y aguas de irrigación o en tierras cultivables representa un riesgo a la salud. Lacasas inmovilizadas en soportes orgánicos son capaces de remover los xenobioticos de suspensiones acuosas (Crecchio C.,

Ruggiero P., Pizzifallo M.D.R., 1995). De manera similar, se ha demostrado que lacasas inmovilizadas por adsorción en polietersulfona muestran propiedades químicas y físicas útiles para disminuir la concentración de fenoles en agua (Lante A. y cols., 2000).

Una propiedad interesante de las lacasas es su capacidad de sintetizar ciertos polímeros. Incluso cuando los esquemas actuales de producción de polímeros están altamente optimizados, la gran cantidad de polímeros producidos anualmente requiere de tecnologías más ecológicas. Por lo mismo, no es sorprendente que se busquen enzimas como biocatalizadores, siendo las lacasas y peroxidasas las enzimas dominantes en este campo. Se puede hacer homopolímeros, o incluso heteropolímeros juntando un sustrato y otra sustancia que no sea sustrato de lacasa. Se ha explorado el uso de lacasas en la polimerización de flavonoides, dado que se ha demostrado que los flavonoides de gran masa molecular tienen mayor tiempo de circulación *in vivo* y un aumento en sus beneficios biológicos (Hagerman A.E. y cols., 1998). Se ha observado que polímeros de catequina exhiben un aumento significativo en su actividad captadora de superóxidos y en la inhibición de la actividad xantinaoxidasa (Kurisawa M. y cols., 2003). También se las ha utilizado para la síntesis de polímeros conductores. El polipirriol es un material biocompatible y de alta conductividad (George P.M. y cols., 2005). Se descubrió que el ABTS aumenta la tasa de reacción y permite producir oligómeros de mayor masa molecular. Estos polímeros tienen conductividad similar al polipirriol electroquímicamente facturado. Incluso en la industria farmacéutica se ha encontrado utilidad para las lacasas en la aminación de antibióticos. Muchos sustituyentes aromáticos de penicilina y cefalosporina son sustratos de las lacasas. Se ha logrado sintetizar análogos de ciclosporina por oxidación mediada por lacasas (Yang Z. y cols., 2009).

También se ha explorado con bastante éxito el uso de lacasas para la modificación de electrodos (Barton S. C., Kim H.H., Binyamin G., Zhang Y. y Heller A., 2001; Zheng W. y cols., 2010). Estos electrodos pueden ser usados para la generación de biosensores o celdas bioelectroquímicas. Esta tecnología emergente se basa en la capacidad de las lacasas de reducir oxígeno, lo que las vuelve útiles como cátodos en un celda de combustible biológico si se las acopla a un ánodo donde ocurra una reacción de oxidación. Utilizando la enzima de *T. versicolor* se ha logrado obtener celdas de potencial alto compatibles con su aplicación para sistemas de bajo amperaje (Ramasamy R. P., Luckarift H. R., Ivnitski D. M., Atanassov P. B. y Johnson G. R. 2010).

1.7 EL INTERÉS DE ENCONTRAR NUEVAS LACASAS BACTERIANAS.

El creciente interés en las lacasas se alimenta principalmente del hecho de que la especificidad de sustrato parece variar significativamente entre las diferentes especies. La lacasa de *Cerrene unicolor* oxida p-fenoles con mayor afinidad, mientras que la de *T. versicolor* oxida o-fenoles preferencialmente. Un estudio comparativo sobre las propiedades de las lacasas de hongos indicó que todas las lacasas estudiadas tenían la habilidad de oxidar ácidos metoxifenólicos, pero en distintos grados, y que la eficiencia de oxidación también era dependiente del pH (Bollag J.M. y Leonowicz A., 1984). Ésta variabilidad presenta interés no sólo desde el punto de vista aplicado, sino también desde el punto de vista de la ciencia básica, pues la comprensión de la relación entre la estructura de las lacasas y rango de sustratos, así como también la determinación de su elusivo mecanismo catalítico resultaría en avances importantes en el entendimiento que tenemos del funcionamiento de las enzimas y cuáles son los determinantes del reconocimiento entre una molécula y su sitio de unión en una proteína, lo que a su vez tiene un impacto en ingeniería de proteínas, en biotecnología e incluso en farmacología.

A pesar que las lacasas de hongos en general poseen un potencial redox más alto que las lacasas bacterianas, su uso está limitado a pHs ácidos, además que su producción a gran escala es relativamente complicada debido a que las glicosilaciones que presentan las enzimas nativas pueden complicar la búsqueda de un organismo adecuado para su expresión heteróloga. Las lacasas bacterianas no sólo aumentan el espectro de pH en el cual se pueden usar como biocatalizador, sino que además presentan en general una mayor estabilidad térmica y es más fácil escalar su producción en comparación a las lacasas de hongos.

Con el objetivo de encontrar nuevas lacasas termoestables con distinta especificidad de sustrato que amplíen la gama de aplicaciones de estas interesantes metaloenzimas, en esta tesis se propuso aislar una lacasa intracelular y caracterizar las propiedades bioquímicas de su actividad enzimática intracelular en el microorganismo antártico *Geobacillus* sp. ID17. La actividad lacasa en este microorganismo ha sido detectada por ensayos enzimáticos utilizando siringaldazina como sustrato. Esta observación está respaldada por el hecho de que en el genoma de esta bacteria se encontró varios genes de lacasas putativas por alineamiento de secuencia con otras lacasas bacterianas (Resultados no publicados). Las bacterias de género *Geobacillus* corresponden a bacilos termófilos, gram-positivos, aeróbicos o anaeróbicos facultativos y formadores de esporas. Hasta la fecha, sólo existe una lacasa caracterizada de este género (Verma A. y Shirkot P., 2014), la cual corresponde a una enzima extracelular. No hay hasta la fecha caracterizaciones de lacasas de microorganismos antárticos, y no existe información sobre lacasas intracelulares de éste género bacteriano, por lo que *Geobacillus* sp ID17 es un buen candidato para estudiar una nueva lacasa con una especificidad de sustrato diferente a las encontradas en otras lacasas y propiedades que puedan aportar una pieza más en la comprensión de las cuproproteínas azules.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPOTESIS

El termófilo *Geobacillus* sp. ID17 posee una lacasa termoestable que presenta actividad a pH levemente alcalino y utiliza sustratos diferentes a los de las lacasas comercialmente disponibles.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar una nueva lacasa proveniente del microorganismo termófilo *Geobacillus* sp. ID17

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1.- Purificar la lacasa nativa desde un cultivo de *Geobacillus sp* ID17:

Se realizará utilizando columnas cromatográficas de intercambio aniónico y exclusión molecular acopladas a un sistema FPLC.

2.- Determinar las propiedades bioquímicas de la enzima: Mediante el ensayo enzimático de la oxidación de la siringaldazina, reactivo específico de las Lacasas, se determinarán parámetros bioquímicos relevantes como constantes catalíticas, temperatura y pH óptimos de actividad, estabilidad térmica.

3.- Evaluar su potencial como biocatalizador: Evaluando diferentes sustratos se evaluará el rango de sustratos oxidables por ésta enzima. Se observará su capacidad de eliminar tinciones sintéticas, lo que podría significar una utilidad biotecnológica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 OBTENCIÓN DE LA CEPA BACTERIANA:

El microorganismo *Geobacillus* sp. ID17 fue obtenido de la colección de cepas bacterianas de Fundación Biociencia. Este microorganismo originalmente fue aislado de una muestra ambiental recolectada de una emisión fumarólica en la Isla Decepción, en territorio antártico, durante la expedición Chilena-Antártica ECA 44. El aislado obtenido resultó ser una bacteria termofílica aeróbica, gram positivo, clasificada de acuerdo a criterios moleculares como miembro del género *Geobacillus*. Presenta condiciones óptimas de crecimiento entre 50 y 70°C a valores de pH entre 5,5 y 8.

3.1.2 MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO:

Se determinó en un trabajo previo que la fase exponencial de crecimiento del *Geobacillus* sp. ID17 ocurre entre 10 y 30 horas de incubación a 65°C. En base a esto, se eligió una incubación por 24 horas a 65°C, lo que corresponde al punto medio de la fase exponencial de un cultivo de ID17 inoculado al 10% en medio marino modificado con una solución de elementos trazas (pH 7,5). Todas las sales inorgánicas utilizadas para preparar los medios fueron adquiridas de Winkler.

3.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD LACASA

La actividad lacasa fue medida utilizando siringaldazina (SGZ) como sustrato, según el método cuantitativo descrito por Harkin y Obst (1973). La reacción se llevó a cabo agregando 500 µl de solución enzimática a 2200 µl de solución tampón fosfato de potasio (Sigma-Aldrich) 100 mM a pH 7,5 previamente incubado durante cinco minutos a 55°C. La mezcla de reacción se incubó durante cinco minutos adicionales antes de agregar 300 µl de SGZ (Sigma-Aldrich) 0,216 mM. El avance de la reacción se midió en un espectrofotómetro (Shimadzu)

registrando el aumento en la absorbancia a 530 nm. El volumen final utilizado en este ensayo fue de 3 ml, y la concentración final del sustrato (SGZ) en el medio de reacción fue 0,02 mM.

Como blanco se utilizó tampón fosfato y se realizó además un control no enzimático usando 2700 µl de tampón fosfato de potasio 100 mM y 300 µl de SGZ 0,216 mM.

Una unidad de actividad lacasa (U) fue definida como el cambio de 0,001 unidades de absorbancia a 530 nm y puede ser calculada según la siguiente fórmula:

$$U = \frac{((Abs_{530nm}/minutos\ de\ ensayo) - (Abs_{530nm}/minutos\ de\ blanco)) * (FD)}{(0,001) * (0,5)}$$

Ecuación 1 -

Donde U son las unidades volumétricas de actividad lacasa, FD es el factor de dilución de la solución enzimática y Abs_{530nm} representa las unidades de absorbancia a 530 nm. (Harkin J.M. y Obst J.R., 1973)

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el ensayo de proteínas de BioRad, basado en el método de Bradford (1976).

3.3 OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LACASA MEDIDA EN EL EXTRACTO CRUDO DE *Geobacillus* sp. ID17

Se determinó el efecto del tiempo de crecimiento de los cultivos tomando alícuotas de 5 ml cada 4 horas durante 34 horas desde un cultivo de 500 ml inoculado al 10% con ID17. Se determinó la actividad lacasa de cada alícuota de acuerdo a lo descrito en la sección anterior. La curva de actividad se realizó en dos instancias separadas siguiendo la misma metodología.

Adicionalmente se evaluó el efecto de agregar diferentes compuestos al medio de cultivo sobre la cantidad de actividad lacasa detectada en el extracto crudo. Se utilizó sulfato de cobre como fuente de catión cúprico, ya que el Cu^{+2} es parte estructural del sitio activo funcional de la enzima. Para ello, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de cobre, entre 0 y 1,5 mM, sobre la actividad lacasa presente en el extracto crudo obtenido de los cultivos de ID17.

También se estudió el efecto de agregar sulfato ferroso al medio de cultivo, debido a que se ha reportado que muchos genes de lacasas bacterianas se encuentran en operones relacionados a la resistencia a metales y al estrés oxidativo (Grass G. y Rensing C, 2001; Rowland J. L. y Niederweis M., 2013.). Se probó también con cobre y lignina, debido a que es el sustrato natural más frecuente de las lacasas fúngicas y muchas lacasas bacterianas. Finalmente se probó inducir la actividad lacasa en presencia de guayacol, un compuesto aromático que usualmente es aceptado como sustrato por estas enzimas.

3.4 GENERACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Para obtener el extracto crudo, se generó un pellet centrifugando durante 10 minutos a $9000 \times g$ el medio de cultivo de ID17 inoculado e incubado según se describe en la sección 3.1.2. El pellet obtenido fue resuspendido en tampón fosfato 100 mM pH 7,5 al que se agregó PMSF 0,5 mM antes de sonicar. Para generar la disrupción de las células, se aplicaron ocho pulsos de ultrasonido de tres minutos utilizando un sonicador de vástago (Brandson 1510R-MT). Tras centrifugar a $13000 \times g$ durante 15 minutos para eliminar la fracción insoluble, se obtiene un extracto crudo.

3.5 PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA

La purificación de la enzima se llevó a cabo mediante técnicas cromatográficas.

Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo a temperatura ambiente y fueron controlados por un sistema de FPLC (Pharmacia Biotech). La actividad lacasa fue medida en todas las fracciones obtenidas en cada etapa de purificación.

40 litros de cultivo de *Geobacillus* sp. ID17 crecido durante 24 horas se concentraron usando un sistema concentrador de flujo tangencial (Sartorius) hasta alcanzar un volumen final de 2 litros, los cuales se centrifugaron a 9.000 x g por 10 min. El pellet de células obtenido fue tratado según se describe en la sección 3.4 para obtener el extracto crudo desde el cual se realizó la purificación. Antes de aplicarlo a las columnas cromatográficas, el extracto obtenido fue ultracentrifugado por 20 minutos a 18000 x g (HIMAC CP80WX, Preparative ultracentrifuge, HITACHI), eliminando cualquier contaminante insoluble.

El sobrenadante obtenido, que contenía la actividad lacasa, se diluyó con tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 7,5) antes de cargarlo en una columna (Pharmacia, C 16/20) empacada con Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con tampón A. Las proteínas fueron eluidas a 1 ml/minuto con un gradiente lineal (90 ml) de NaCl de 0,1 a 1 M preparado en tampón A. Los picos cromatográficos obtenidos se analizaron utilizando el ensayo de SGZ descrito en la sección 3.2 para detectar actividad lacasa. Aquellos en los que se observó oxidación del sustrato se cargaron en una columna (Pharmacia, C 10/10) empacada con DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con tampón A. Las proteínas fueron eluidas a 1 ml/min con un gradiente lineal (120 ml) de 0,3 a 0,7 M de NaCl en tampón A.

Los picos cromatográficos con actividad lacasa obtenidos de la columna DEAE-Sepharose Fast Flow se concentraron separadamente a un volumen final de 0,5 ml por ultrafiltración empleando un filtro de celulosa de corte de 30 kDa (Amicon) y se cargaron en una columna (GR Healthcare, Tricorn 10/600) de Superdex 200 (Pharmacia Biotech) equilibrada con tampón A que contenía NaCl

0,2 M. A las diferentes fracciones cromatográficas obtenidas se les midió su capacidad de oxidar SGZ de acuerdo al protocolo ya descrito.

Las fracciones en las cuales se observó oxidación de SGZ se concentraron nuevamente por ultrafiltración, empleando un filtro de celulosa Amicon de corte 30 kDa (Millipore). Las fracciones con actividad se almacenaron a -20 °C. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.6 EFECTO DEL PH Y LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se determinó el efecto del pH en la actividad de las enzimas purificadas (lacasa LID17 y oxidasa O-SCQ) incubando las soluciones enzimáticas a diferentes valores de pH entre 6 y 9. Se utilizó acetato de sodio 100 mM para preparar el tampón a pH 6 y tampón fosfato de potasio 100 Mm para los valores de pH entre 7 y 9. El pH del tampón fue corregido de acuerdo a su pK_a/dT para cada temperatura.

La dependencia de la actividad observada por la temperatura se determinó llevando a cabo el ensayo de oxidación de SGZ descrito en la sección 3.2 incubando el tampón fosfato de potasio 100 mM pH 7,5 en el cual transcurre la reacción a distintas temperaturas entre 40 y 70°C. Gracias al uso de un espectrofotómetro (Shimadzu) acoplado a un baño termoregulado fue posible mantener la temperatura estable durante toda la reacción.

3.7 TERMOESTABILIDAD DE LA LACASA PURIFICADA

La termoestabilidad de la lacasa purificada fue determinada incubando la enzima a 55, 65 y a 80°C. Cada 30 minutos, o cada 15 minutos cuando se incubó la enzima a 80°C, se tomó alícuotas de 125 μ l y se midió la actividad residual a 55°C usando el ensayo de oxidación de SGZ.

3.8 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

Para el análisis del contenido proteico de las fracciones obtenidas en las diferentes etapas de la purificación, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % (v/v) (Laemmli U.K., 1970). Las muestras se desnaturalaron incubándolas por 10 min a 95 °C. El tampón de carga (5X) contenía: SDS 10 % (p/v) β -mercaptoetanol 10 mM, glicerol 20 % (v/v), Tris-HCl 0,2 M pH 6,8 y azul de bromofenol 0,05 % (p/v). Se utilizó como estándar el marcador de proteínas 14-100 kDa (Winkler) y tampón de corrida TG-SDS (Winkler). Se empleó un marcador de masa molecular de rango amplio (Winkler, BM-1110) que incluía β -galactosidasa (116,0 kDa), albúmina de suero bovino (66,0 kDa), ovoalbúmina de huevo (45,0 kDa), anhidrasa carbónica (29,0 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) y lisozima (14,3 kDa). Luego el gel fue incubado en una solución de azul de Coomassie R-250 (0,125 % (p/v), metanol (45 % (v/v) y ácido acético (10 % (v/v)) durante la noche. Para visualizar las bandas con proteínas, se utilizó una solución de destañido con ácido acético:metanol:agua (10:20:70).

3.9 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR

La masa molecular de la enzima nativa fue determinada por exclusión molecular y las subunidades por SDS-PAGE según se describe en la sección anterior. Para la determinación por cromatografía de exclusión molecular se utilizó una columna (GE Healthcare, Tricorn 10/600) de Superdex-200 (GE Healthcare) previamente equilibrada a un flujo de 0,5 mL/min, de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 con NaCl 0,2 M. Se construyó una curva estándar utilizando α -lactoalbúmina (14,2 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), albúmina de pollo (45,0 kDa), albúmina de suero bovino (66,0 kDa) y catalasa (200 kDa). Los estándares utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Se utilizó azul dextrano para calcular el volumen

vacío de la columna. La elución se llevó a cabo a un flujo de 0,5 mL/min utilizando solución tampón Tris-HCl 50mM pH 8,0 con NaCl 0,2 M.

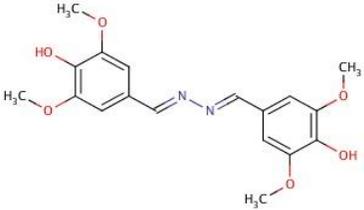
3.10 ESPECIFICIDAD DE SUSTRATOS

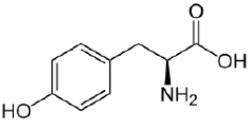
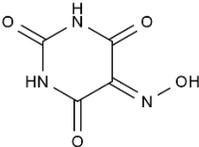
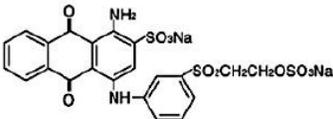
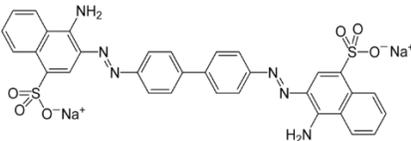
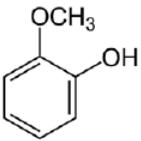
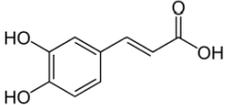
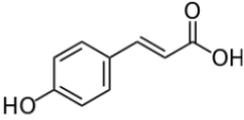
Se evaluó la capacidad de las dos enzimas purificadas para oxidar diferentes sustratos aromáticos: SGZ, L-tirosina, ácido violúrico, *Remazol Brilliant Blue* (RBB), Rojo Congo, guayacol, ácido cafeico, ácido p-cumárico, y ácido gálico. Todos los sustratos utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Se incubó una solución de enzima en tampón fosfato potasio 100 mM pH 7,5 con cada uno de los sustratos, siguiendo el mismo esquema de la reacción con SGZ descrito en la sección 3.2.

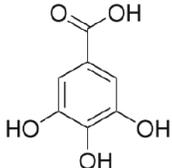
Se registraron los cambios de absorbancia en el tiempo a la longitud de onda característica para cada sustrato (Tabla 1). Luego éstos se contrastaron con los cambios registrados cuando el sustrato fue incubado en el mismo tampón de reacción sin agregar la solución enzimática. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 55°C, y la concentración de sustrato en el medio de reacción fue siempre 1 mM.

Los resultados obtenidos con las enzimas purificadas se compararon con aquellos obtenidos al utilizar la lacasa comercial de *T. versicolor* (Sigma). Estos ensayos se realizaron a 37°C, en tampón acetato de sodio pH 4,5.

Tabla 1 - Longitud de onda de máxima absorbancia para diferentes sustratos de las lacasas y sus estructuras.

Sustrato	Longitud de Onda (nm)	Estructura
SGZ	530	

L-Tirosina	272	
Ácido Violúrico	515	
RBB	640	
Rojo Congo	544	
Guayacol	450	
Ácido Cafeico	330	
Ácido p-Cumárico	325	

Ácido Gálico	300	
--------------	-----	---

3.11 ENSAYO DE ACTIVIDAD PEROXIDASA

Se sabe que además de las lacasas, las peroxidases también son capaces de oxidar la SGZ (Harkin y Obst, 1974). Un control importante para determinar si la reacción observada corresponde o no a una lacasa es realizar el ensayo de oxidación de la SGZ en presencia de peróxido de hidrógeno. El cobre T1 de las lacasas es susceptible a ser oxidado por H₂O₂, lo que inactiva reversiblemente a estas enzimas. Por lo tanto, presencia de peróxido de hidrógeno ocurre la inhibición de la actividad lacasa.

Los ensayos con peróxido se llevaron a cabo agregando 500 µl de solución enzimática a 1900 µl de tampón fosfato de potasio 100 mM y 300 µl de solución 10 mM de H₂O₂. Luego de cinco minutos de incubación a 55°C, se agregó 300 µl de SGZ 0,2 mM. La reacción se siguió espectrofotométricamente de la misma que se describe en la sección 3.2.

Adicionalmente se realizaron otros dos ensayos más específicos, uno usando Rojo fenol como sustrato, el cual es selectivo para manganeso peroxidases, y otro usando *Azure-Blue* que detecta enzimas tipo lignina-peroxidasa y otras peroxidases relacionadas (Archibald F.S, 1992; Xu J.Z., Zhang J.L., Hu K.H., Zhang W.G., 2013).

El ensayo para manganeso peroxidases se llevó a cabo agregando 100 µl de oxalato de sodio 25 mM, 50 µl de MnSO₄ 2 mM, 100 µl de rojo fenol al 0,1% a 50 µl de tampón fosfato de potasio 100 mM pH 7,5. Tras incubar a 55°C durante

cinco minutos se agregó 500 μl de solución enzimática y se registró el cambio de absorbancia a 450 nm.

El ensayo para enzimas de la familia de las lignina-peroxidasa se realizó agregando 400 μl de solución 0,1 mM de H_2O_2 a 400 μl de una solución 10 mM de la tinción azure-B. Luego de incubar durante cinco minutos se agregaron 200 μl de solución enzimática, y se registró el avance de la reacción a 651 nm.

3.12 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Los valores cinéticos aparentes de constante de Michaelis-Menten (K_m) y velocidad máxima (V_{max}) fueron determinados para la oxidación de SGZ. La actividad lacasa fue medida de acuerdo a procedimiento descrito en 3.2. Para el cálculo de los valores cinéticos aparentes para esta reacción se utilizó concentraciones variables de sustrato: 0,002, 0,01, 0,02, 1,00 y 2 mM.

Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante el ajuste de los datos experimentales al modelo gráfico de Lineweaver-Burk, en el cual se grafica el doble recíproco de la ecuación de Michaelis y Menten.

4.RESULTADOS

4.1.1 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Como parte de un screening de actividades enzimáticas, se encontró que la incubación de SGZ 0,02 mM en presencia del extracto crudo de ID17 generaba la coloración intensa característica de la oxidación de este compuesto.

Para confirmar que este efecto se debía a la acción de una enzima presente en el extracto crudo, se repitió el ensayo utilizando concentraciones crecientes de extracto crudo. En la Figura 5 se puede observar que a medida que se agrega una mayor cantidad de extracto en el medio de reacción, se observa un aumento de la absorbancia a 530, lo que indica mayor oxidación de la SGZ. El comportamiento observado concuerda con lo que se esperaría para una actividad enzimática.

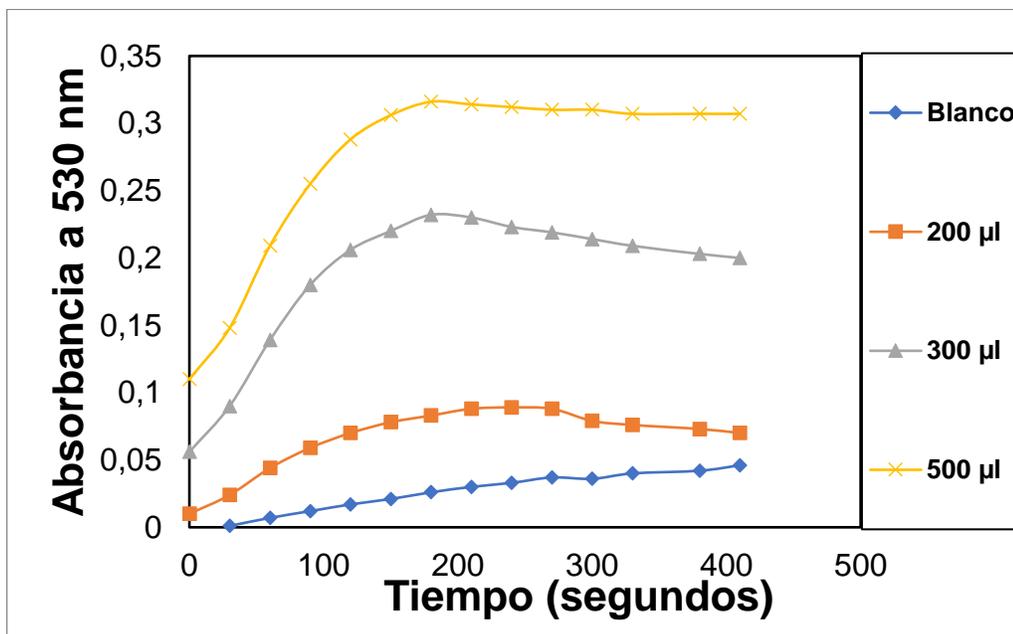


Figura 5 – Oxidación de la SGZ en presencia de concentraciones crecientes del extracto crudo del *Geobacillus* ID17. Todos los ensayos se realizaron a 65°C. El volumen total de los ensayos fue 3 ml en todos los casos, sólo varió el volumen de extracto crudo añadido. Se realizó un blanco en el que no se agregó enzima y sólo se agregó 300 µl de SGZ 0,2 mM a 2700 µl de tampón fosfato de potasio pH 7,5.

Antes de empezar con la purificación de la o las enzimas responsables de la reacción observada en el extracto crudo, se realizó una caracterización preliminar de la actividad enzimática encontrada, para evaluar si sus propiedades coincidían con el perfil buscado.

Se determinó la temperatura a la cual la actividad medida en el extracto crudo era máxima, y se encontró que a 55°C se registra el mayor cambio de absorbancia (ver Figura 6). A temperaturas más altas la reacción se vuelve más rápida y se observa una rápida disminución de la absorbancia después del punto máximo. Por esta razón se eligió 55°C como la temperatura a la cual se llevó a cabo la gran mayoría de los ensayos enzimáticos realizados en este trabajo. Temperaturas menores a 50°C no mostraron actividad en el extracto crudo.

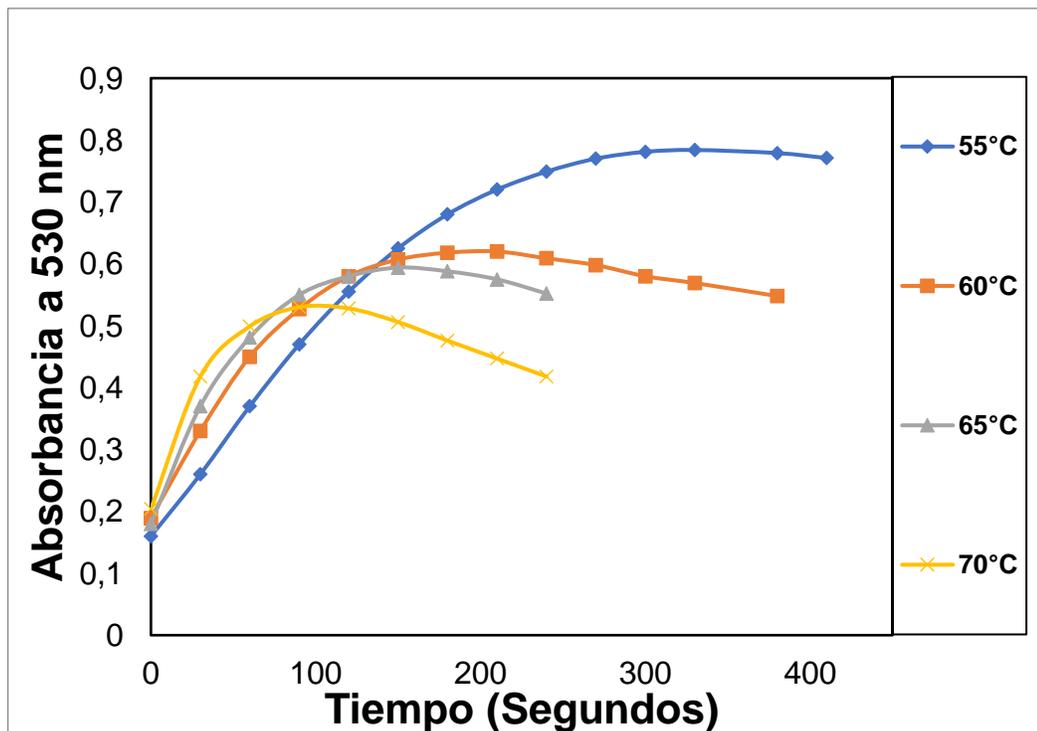


Figura 6 – Dependencia por la temperatura de la actividad enzimática encontrada en el extracto crudo. Cada línea representa una temperatura a la cual se llevó a cabo el ensayo de oxidación de SGZ. Antes de agregar la SGZ, el extracto fue incubado durante cinco minutos a cada una de las temperaturas ensayadas.

Debido a que el interés estaba puesto en encontrar una lacasa termófila que además tuviera actividad a pH alcalino, se evaluó la variación de la actividad enzimática a medida que se aumentaba el pH del medio de reacción desde un pH neutro (Figura 7). La capacidad del extracto crudo de oxidar SGZ parece ser muy dependiente del pH, ya que desviaciones por sobre 7,5 disminuyen la actividad observada.

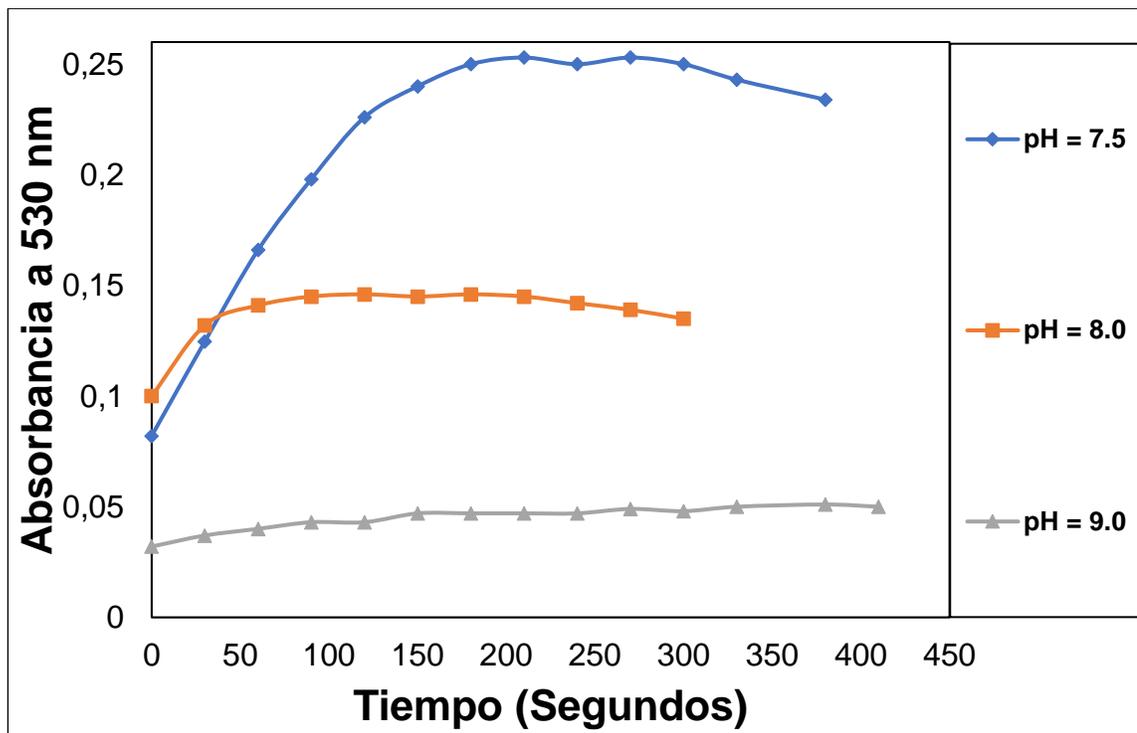


Figura 7 – Variación de la actividad enzimática observada en el extracto crudo a diferentes pH levemente alcalinos. Todos los ensayos de realizaron a 55°C, en tampón fosfato de potasio ajustado a la temperatura a la que se usó a cada uno de los pH.

Si bien la SGZ es un sustrato relativamente selectivo para las lacasas, algunas peroxidasas también son capaces de oxidarla (Harkin y Obst, 1974). Por ello es importante realizar un ensayo en el cual se agregue peróxido de hidrogeno al medio de reacción. Las peroxidasas acoplan la oxidación de SGZ a la reducción de una molécula de H_2O_2 , por lo que al agregar peróxido al medio, se espera un aumento de la oxidación de la SGZ por parte de las peroxidasas. De manera

opuesta, las lacasas son inactivadas en medios fuertemente oxidativos, debido a la oxidación reversible del cobre tipo T1. Es por esto que en presencia de H_2O_2 se genera inhibición de la actividad lacasa (Milton y Minter, 2014). Se realizó entonces un ensayo de actividad peroxidasa esperando ver inhibición de la actividad enzimática en presencia de H_2O_2 (ver Figura 8). Se encontró que en el extracto crudo, efectivamente se observa inhibición de la oxidación de la SGZ, por lo que probablemente la actividad observada se debe a la presencia de una lacasa en el extracto crudo.

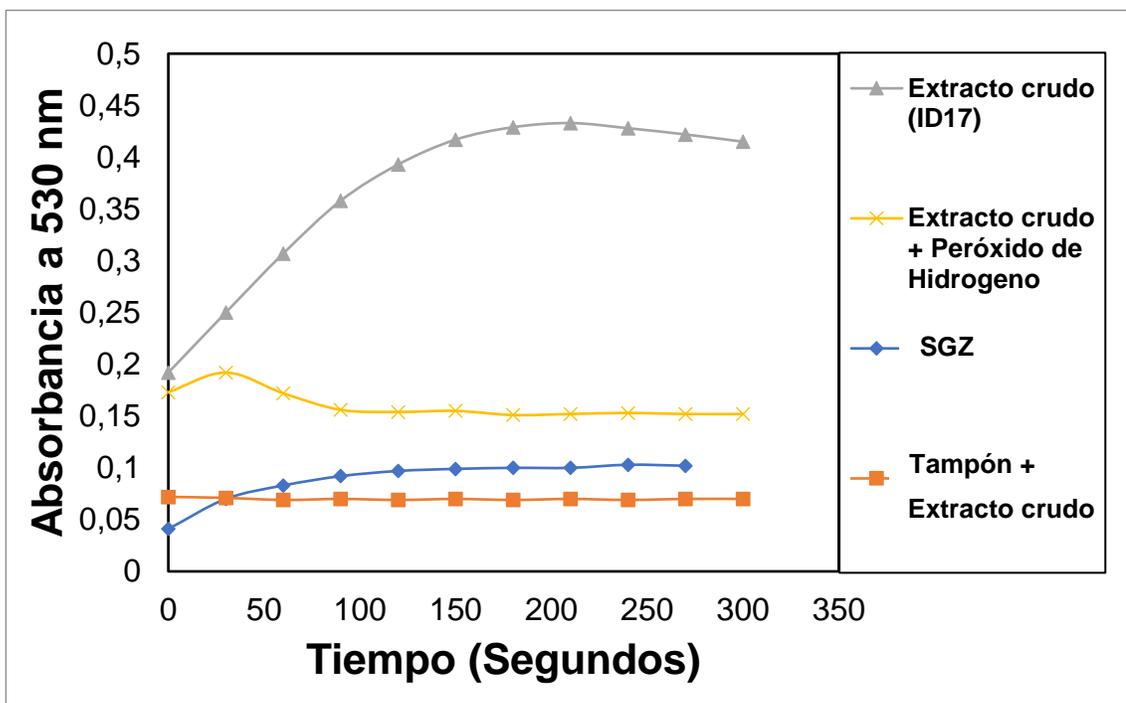


Figura 8 – Ensayo de Inhibición con Peróxido de Hidrógeno. En la línea con triángulos se observa la actividad medida cuando al agregar SGZ al medio de reacción con extracto crudo. La línea con cruces muestra el efecto obtenido cuando el extracto crudo se incubó con peróxido de hidrógeno 1 mM antes de agregar la SGZ. La línea con rombos y la línea con cuadrados muestra el cambio de absorbancia observado cuando se incubó la SGZ en tampón fosfato sin agregar extracto crudo, y cuando se incubó el extracto en el tampón sin agregar la SGZ, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados a 55 °C y pH 7,5.

4.1.2 OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD MEDIDA EN EL EXTRACTO CRUDO.

Para aumentar el rendimiento de la purificación, se buscó las condiciones en las cuales la actividad medida en el extracto crudo era máxima. En primer lugar se utilizó diferentes inductores conocidos de lacasas bacterianas, tanto inorgánicos como orgánicos, y se estudió el efecto que tenía agregarlos al medio de cultivo del *Geobacillus* ID17 (ver Figura 9).

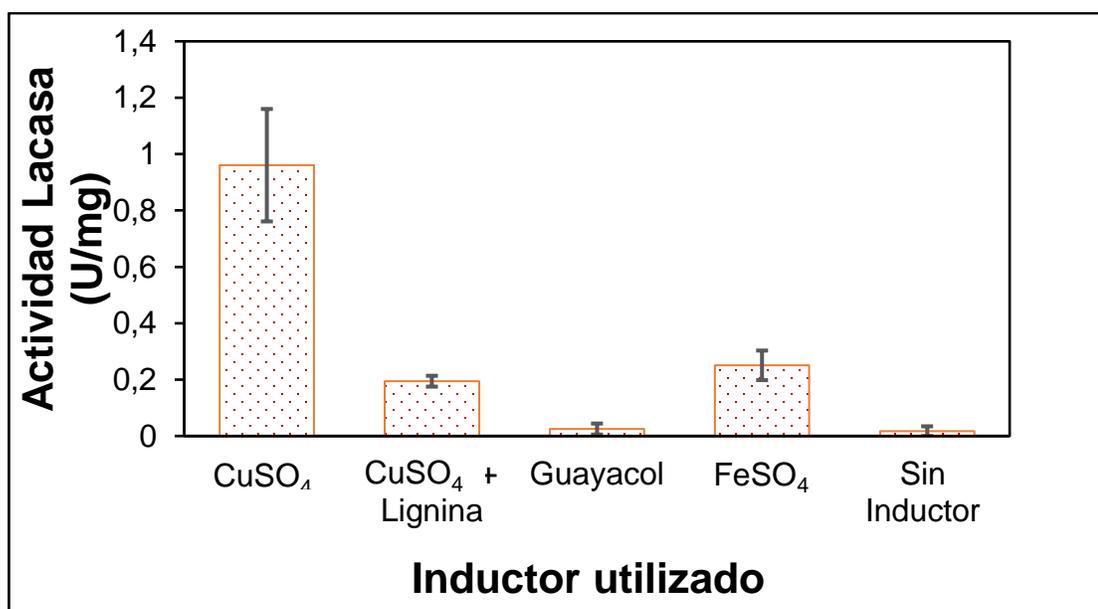


Figura 9 - Actividad medida en el extracto crudo al suplementar el medio de cultivo con diferentes inductores. Se utilizó sulfato de cobre 0,5 mM, sulfato de cobre 0,5 mM + lignina 0,04%, guayacol 0,04%, sulfato ferroso 0,5 mM y medio sin inductores. La actividad se registró a 55 °C, pH 7,5. Las barras de error representan tres mediciones experimentales independientes.

Suplementar el medio con cobre es necesario para la producción de la enzima, pero además es el inductor más eficiente. El guayacol no fue capaz de inducir la expresión de la enzima. Al agregar lignina al medio suplementado con cobre genera una disminución de la actividad medida en el extracto crudo de dichos medios de cultivo. El sulfato ferroso actúa como un inductor débil de la actividad enzimática.

Como se obtuvo los mejores resultados suplementando el medio de cultivo bacteriano con sulfato de cobre, se estudió más en detalle este efecto para determinar la concentración a la cual es óptimo (Figura 10). Se encontró que el máximo de actividad enzimática (U/ml) en el extracto crudo se obtiene cuando se agrega entre 0,5 mM y 1 mM de sulfato de cobre al medio de cultivo, sin diferencias significativas en la actividad volumétrica adentro de este rango. Se eligió 0,5 mM de sulfato de cobre como la concentración óptima debido a que concentraciones más altas tienen un efecto negativo en la biomasa.

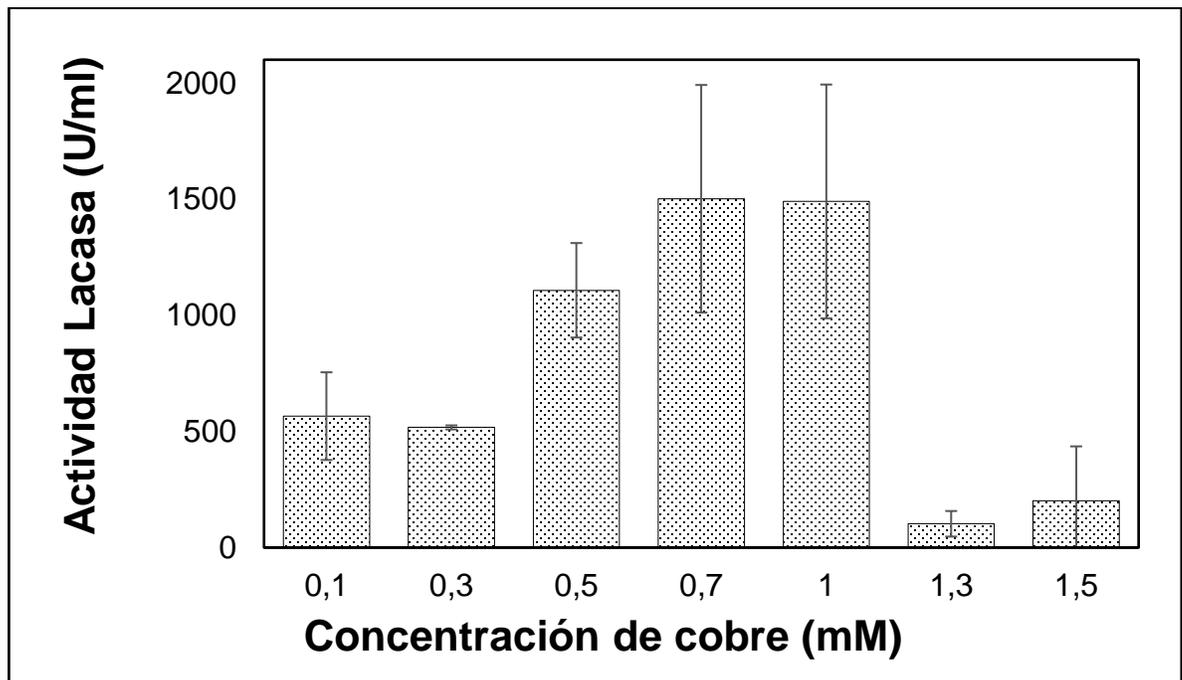


Figura 10 – Efecto de la concentración de cobre del medio de cultivo en la actividad enzimática medida en el extracto crudo. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 55 °C y a pH 7,5. El cobre fue añadido al medio de cultivo en el momento de su preparación. Luego éste fue inoculado al 10% con un cultivo de ID17. Las barras de error representan tres mediciones experimentales independientes

Debido a que el estrés oxidativo causado por iones metálicos como Cu^{+2} es mayor en presencia de oxígeno, se comparó el rendimiento celular al crecer la bacteria en medio aeróbico usando un tapón de gaza en los balones de cultivo,

con el rendimiento obtenido al crecer la bacteria en condiciones de limitación de oxígeno (utilizando un tapón de goma hermético en los balones). Se concluyó que en presencia de Cu^{+2} 0,5 mM el mejor rendimiento se obtenía al crecer la bacteria en condiciones de limitación de oxígeno.

Se realizó una curva de actividad en el tiempo, para determinar el mejor momento de la curva de crecimiento para iniciar la purificación de la enzima. Sin embargo, sólo fue posible detectar actividad enzimática en el extracto crudo obtenido de cultivo de entre 24 y 30 h de incubación a 65 °C, temperatura óptima de crecimiento del *Geobacillus* sp ID17. Si bien esto impidió construir una curva de actividad en el tiempo, el hecho de que sólo durante ese periodo de tiempo (que corresponde a la segunda mitad de la fase exponencial) se encuentre actividad en el extracto crudo es suficiente para dejarlo constante como tiempo de incubación. Con esto en mente la purificación de la enzima se realizó a partir de medios de cultivo incubados durante 24 horas a 65 °C, en medio marino modificado pH 7,5 y suplementado con 0,5 mM de cobre.

4.2 PURIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS PRESENTES EN EL EXTRACTO CRUDO.

Durante la purificación se detectaron tres enzimas capaces de oxidar la SGZ usando el método descrito en la sección 3.2, una peroxidasa no caracterizada en este trabajo, la lacasa LID17, y una segunda peroxidasa que fue denominada O-SCQ. Éstas últimas dos fueron caracterizadas en esta tesis. A continuación se detallan los procedimientos que condujeron a obtener las enzimas purificadas con el fin de caracterizarlas posteriormente.

4.2.1 PURIFICACIÓN DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD LACASA

La Tabla 2 muestra un resumen de los pasos cromatográficos que conducen a la purificación de la enzima con actividad lacasa presente en el extracto crudo del *Geobacillus* sp. ID17.

Durante la purificación el primer problema que se hizo aparente fue el bajo rendimiento de masa celular, que tiene como consecuencia una baja cantidad de proteína total. Debido a que las condiciones para inducir la expresión de la enzima son condiciones de estrés para la bacteria (alta concentración de cobre, limitación de oxígeno) este problema no pudo ser resuelto modificando los parámetros de crecimiento, por lo que hubo que optar por aumentar el volumen de cultivo bacteriano con el cual se trabajaba. El máximo rendimiento que se logró alcanzar fue de 0,9 gramos de biomasa húmeda por litro de medio de cultivo inoculado al 10%. El volumen típico con el que se trabajó durante la purificación fue de 30 o 40 litros de medio de cultivo.

Se ha reportado que las resinas de intercambio aniónico son exitosas en la purificación de las lacasas (Leitner y cols. 2002; Ko y cols. 2001; Koroljova-Skorobogat'ko y cols. 1998) por ello la estrategia experimental se basó principalmente en el uso de este tipo de cromatografía.

Se preparó un extracto crudo de *Geobacillus* sp. ID17 para luego ser cargado en una columna de Q-Sepharose (Q-Seph). Durante las primeras purificaciones se utilizó para eluir un gradiente de 90 minutos, entre 0 y 0,9 M de sal, a 1 ml por minuto. Sin embargo se encontró el problema de que muchas fracciones (todas las fracciones entre 0,3 M hasta 0,7 M de NaCl) presentaban actividad enzimática capaz de oxidar la SGZ. Se buscó por ello extender el tiempo de elución y acotar el gradiente de sal para obtener mejor resolución de los picos. Pero esto no resolvía el problema de generar muchas fracciones con actividad, complejizando el segundo paso de purificación.

Se intentó entonces ensayar cada una de las fracciones con actividad oxidativa en presencia de peróxido de hidrógeno. Se obtuvo que las fracciones que eluían de la columna DEAE a una concentración alrededor de 0,5 M de NaCl presentaban inhibición en presencia de peróxido, y que sin embargo aquellas que

eluían entre 0,3 M y 0,5 M se activaban, indicando la presencia de al menos una actividad peroxidasa en el extracto crudo (Figura 11)

El protocolo ensayado que permitió generar la mejor separación fue utilizar un gradiente lineal de 90 ml entre 0,1 y 1 M de NaCl a un flujo de 1 ml/minuto en la columna Q-Sepharose. Luego de este paso, se recolectó las fracciones que eluyeron entre 0,54 M y 0,87 M de NaCl para ser cargadas en una columna DEAE-Sepharose Fast Flow (DEAE). Antes de cargar las proteínas en la segunda columna éstas se diluyeron cinco veces en tampón A, para así evitar cualquier interferencia posible entre las sales presentes en las fracciones y la resina de intercambio aniónico. La Figura 12 muestra el contenido de cada fracción resuelto en un gel electroforético.

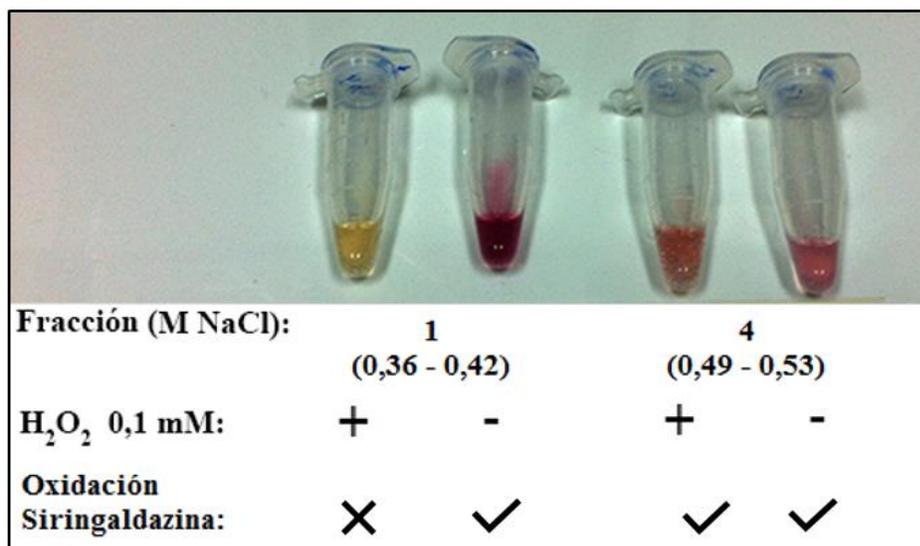


Figura 11 – Efecto de agregar peróxido en el medio de la reacción con SGZ a las distintas fracciones obtenidas en el segundo paso cromatográfico (Sección 4.2.1). Se observa que en la fracción 1, que eluye entre 0,36 y 0,41 M de NaCl no hay reacción al agregar peróxido de hidrógeno (Indicado en la imagen con un signo +), por lo que el medio de reacción permanece de color amarillo. En la fracción 4, que eluye entre 0,49 y 0,53 M de NaCl, sí se observa actividad con (+) y sin (-) peróxido presente.

Tabla 2 – Purificación de la enzima LID17 desde el extracto crudo de un cultivo de *Geobacillus* sp. ID17.

Fracción	U/ml	U/mg	Actividad Total (U)	Concentración Proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Rendimiento (%)	Purificación (Veces)
Extracto Crudo	330	383	62700	0,86	163	-	-
Q-Septh (53-87% 1M NaCl)	2183	2969	14056	1,08	36	22	7,7
DEAE (36-42% 1M NaCl)	1425	1207	9262	1,18	7,6	14	3,1
Superdex (56 - 63 minutos)	1450	1342	1450	1,08	1,08	2,3	3,5

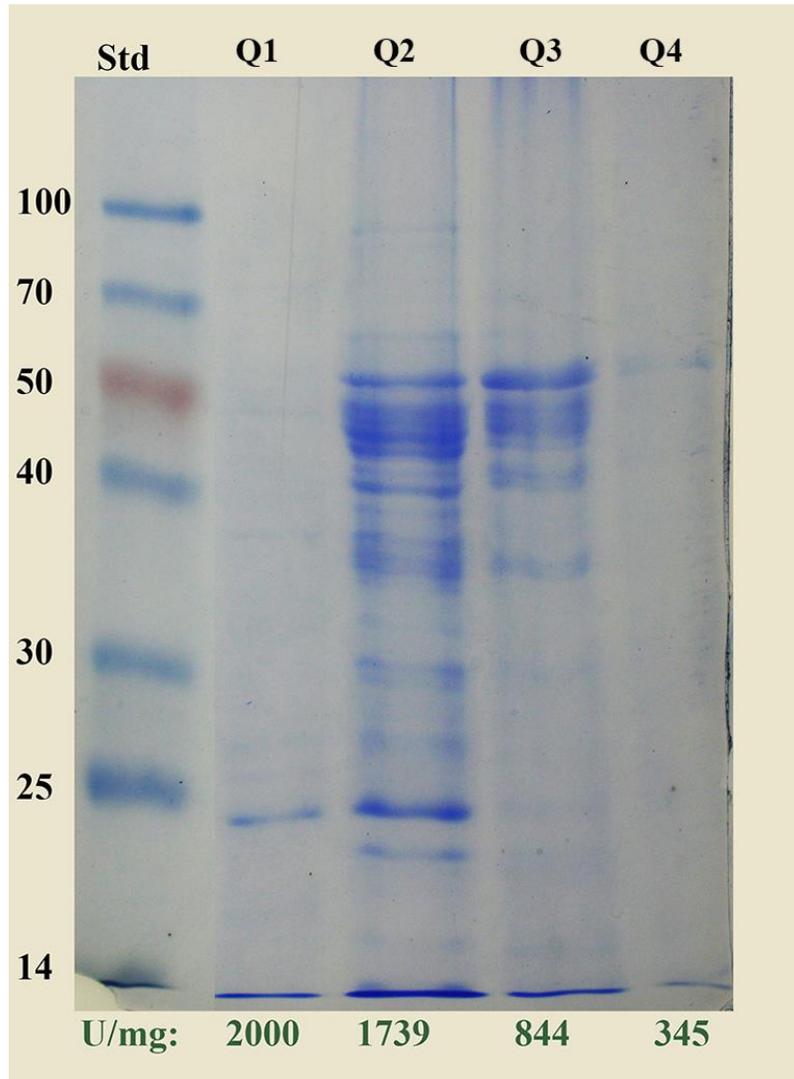


Figura 12 – SDS-PAGE de las fracciones obtenidas tras cargar y eluir el extracto crudo en una columna Q-Seph. Se muestran las fracciones de mayor actividad específica obtenidas tras este primer paso cromatográfico. El gel electroforético fue preparado al 12% de poliacrilamida. En cada carril se cargó 5 μ g de proteína. En la parte superior se nombra cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía: Q1; Q2; Q3 y Q4, que eluyeron entre 0,64 y 0,68; 0,68 y 0,76; 0,76 y 0,81, y 0,81 y 0,87 M de NaCl, respectivamente. En la parte inferior de la imagen se muestra la actividad específica de cada una de las fracciones. A la izquierda se indica las masas en KDa de cada proteína del estándar de masa molecular.

Para eluir las proteínas de la columna DEAE se aplicó un gradiente lineal de 120 ml entre 0,1 y 0,7 M de NaCl a 1 ml por minuto. Las fracciones entre 0,36 M de NaCl y 0,57 M de NaCl presentaron la capacidad de oxidar SGZ. La fracción con mayor actividad específica, sin embargo, fue la recolectada entre 0,36 y 0,42 M de NaCl.

La Figura 13 muestra el pequeño pico de actividad recolectado en la fracción 4, que eluye entre 0,49 y 0,53 M de NaCl. Este pico presenta actividad SGZ oxidasa débil. Sin embargo, en presencia de peróxido de hidrógeno y cobre la actividad aumenta notoriamente.

La fracción de mayor actividad específica obtenida en el segundo paso cromatográfico fue concentrada por ultrafiltración usando una membrana de celulosa de corte 30 kDa y luego se cargó y eluyó en una columna Superdex 200 previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 0,2 M NaCl. El contenido proteico de las fracciones obtenidas en los últimos dos pasos cromatográficos se analizó por SDS-PAGE. Los resultados se muestran en la Figura 14.

Durante este paso cromatográfico se obtuvo un solo pico con actividad, que en un gel SDS-PAGE muestra una banda claramente predominante, que también se encuentra presente en las fracciones de mayor actividad específica de los pasos de purificación previos.

La enzima obtenida por este protocolo de purificación será denominada LID17 desde aquí en adelante.

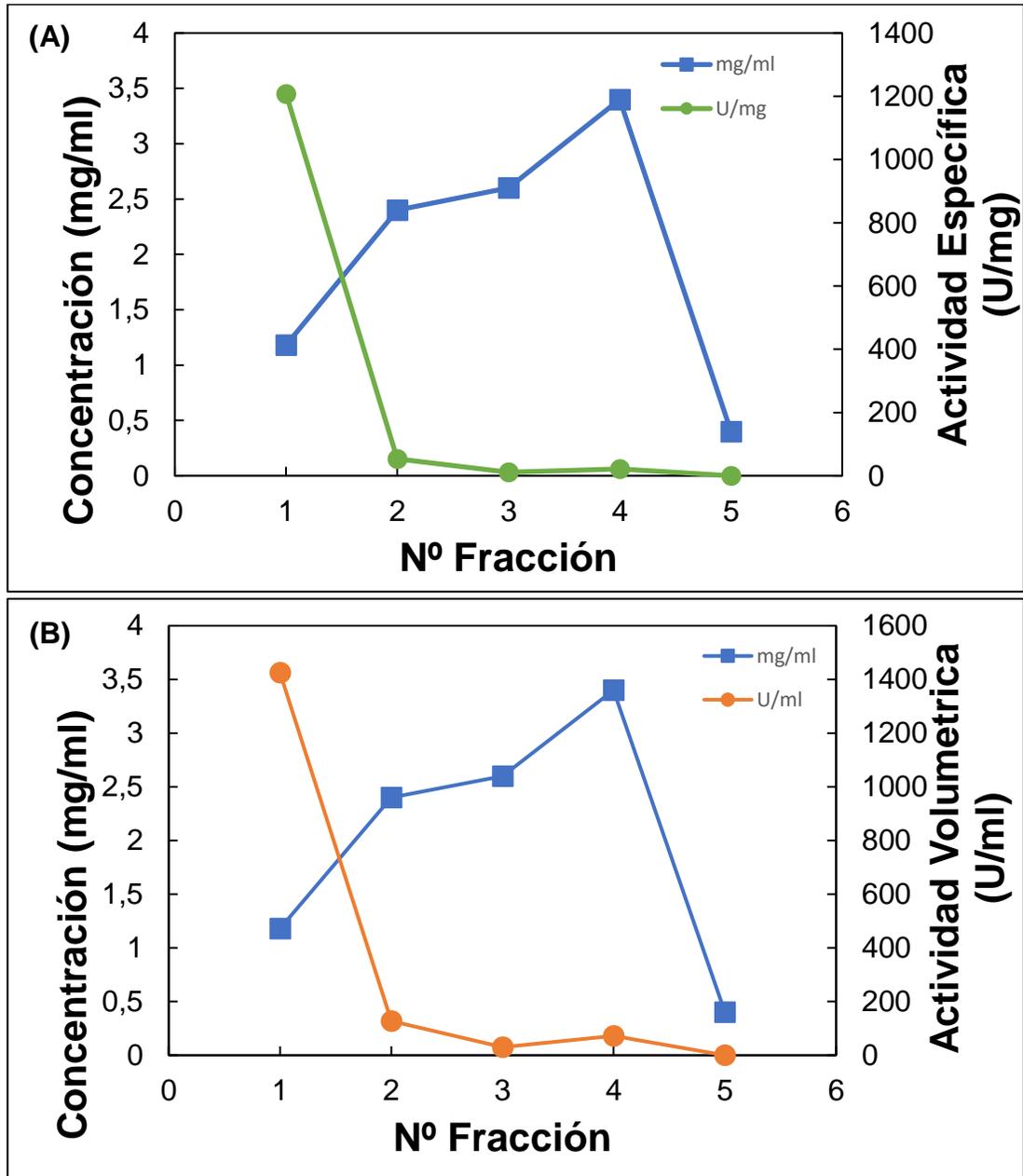


Figura 13 – Actividad y concentración de proteína de las fracciones obtenidas en el segundo paso cromatográfico. Las fracciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 eluyeron entre 0,36 y 0,42; 0,42 y 0,47; 0,47 y 0,49; 0,49 y 0,53; y 0,53 y 0,57 M de NaCl, respectivamente. En cuadrados se muestra la concentración de proteínas en mg/ml de cada fracción, mientras que en (A) círculos se muestra la actividad específica y en (B) círculos se muestra la actividad volumétrica.

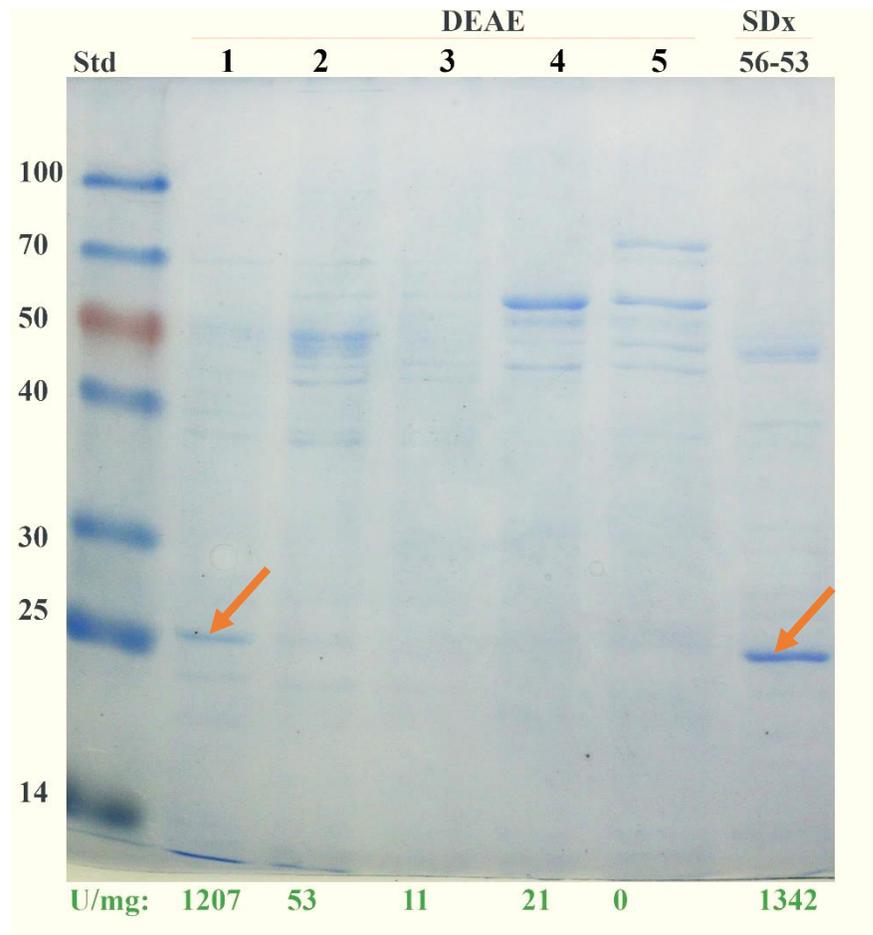


Figura 14 – SDS-PAGE con las fracciones obtenidas de los últimos dos pasos cromatográficos. En la imagen se muestran todas las fracciones obtenidas en los últimos pasos cromatográfico que presentan actividad. En el último carril de la derecha se muestra el contenido del único pico con actividad obtenido después de cargar y eluir en una columna Superdex 200 el pico obtenido entre 0,36 y 0,42 M de NaCl en la elución de la columna DEAE. El gel fue preparado al 12% de poliacrilamida. En cada carril se cargó 5 µg de proteína. Los números de la parte superior indican los números con los que fueron designadas las fracciones que presentaron actividad, o minutos de elución en el caso del último carril. Las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a las fracciones que eluyen entre 0,36 y 0,42; 0,42 y 0,47; 0,47 y 0,49; 0,49 y 0,53; 0,53 y 0,57 M de NaCl, respectivamente. En la parte inferior de la imagen se muestra la actividad específica de cada una de las fracciones. A la izquierda se indica la masa en kDa de cada proteína del estándar de masa molecular. La banda identificada con la actividad enzimática se señala con una flecha.

4.2.2 PURIFICACIÓN DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD OXIDASA DEPENDIENTE DE COBRE

Durante la purificación de la lacasa a partir del extracto crudo del *Geobacillus* sp. ID17, en el frente de carga, que contiene todas las proteínas que no se adhirieron a la resina (frente Q-Seph), se encontró una cantidad considerable de unidades de actividad enzimática, correspondientes a casi la mitad del total de unidades medidas en el extracto crudo (ver Tabla 3).

Debido a esto se decidió analizar esta fracción que no se unió a la columna Q-Seph. Lo primero que se encontró es que si bien el frente Q-Seph posee una actividad enzimática capaz de oxidar SGZ en presencia de 1 mM de cobre a 55°C y pH 7,5, esta actividad no se inhibe en presencia de H₂O₂, sino que aumenta. Sin embargo, esta actividad peroxidasa parece ser dependiente de cobre y si el medio de reacción no es suplementado con cobre, el frente Q-Seph pierde la capacidad de oxidar SGZ (ver sección 4.4).

El frente Q-Seph se concentró por ultrafiltración usando una membrana de celulosa de corte 30 kDa, para luego ser cargada y eluída en una columna de exclusión molecular Superdex 200. Se obtuvo un solo pico cromatográfico que eluyó entre los 38 y 44 minutos a un flujo de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 0,2 M de NaCl de 0,5 ml por minuto (Figura 16). El contenido de estas fracciones fue analizado por SDS-PAGE (Figura 15). La enzima obtenida se denominará de aquí en adelante O-SCQ.

Tabla 3 – Protocolo de purificación de la enzima con actividad polifenol oxidasa presente en el extracto crudo de *Geobacillus* sp. ID17.

Fracción	U/ml	U/mg	Actividad Total (U)	Concentración de Proteínas (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Rendimiento (%)	Purificación (Veces)
Extracto Crudo	330	383	62700	0,86	163	-	-
Frente Q-Septh	87	1450	30450	0,06	21	48,5	3,7
Superdex (38-44 minutos)	313	416	2370	0,75	5,6	3,7	1

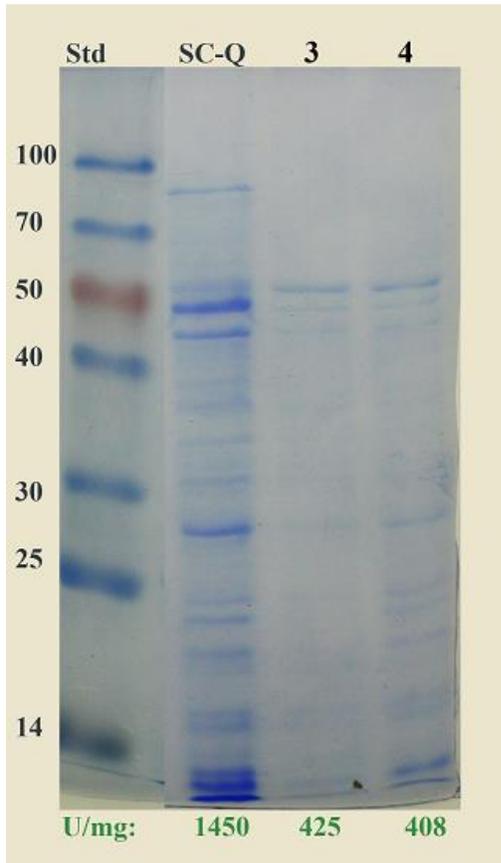


Figura 15 – SDS-PAGE con las fracciones obtenidas en cada paso de purificación del Frente Q-Seph (SC-Q). El gel electroforético fue preparado al 12% de poliacrilamida. En cada carril se cargó 5 µg de proteína. Las fracciones 3 y 4 eluyeron entre 28 y 38 y 38 y 44 minutos, respectivamente. En la parte inferior de la imagen se muestra la actividad específica de cada una de ellas. A la izquierda se indica la masa en kDa de cada proteína del estándar de masa molecular.

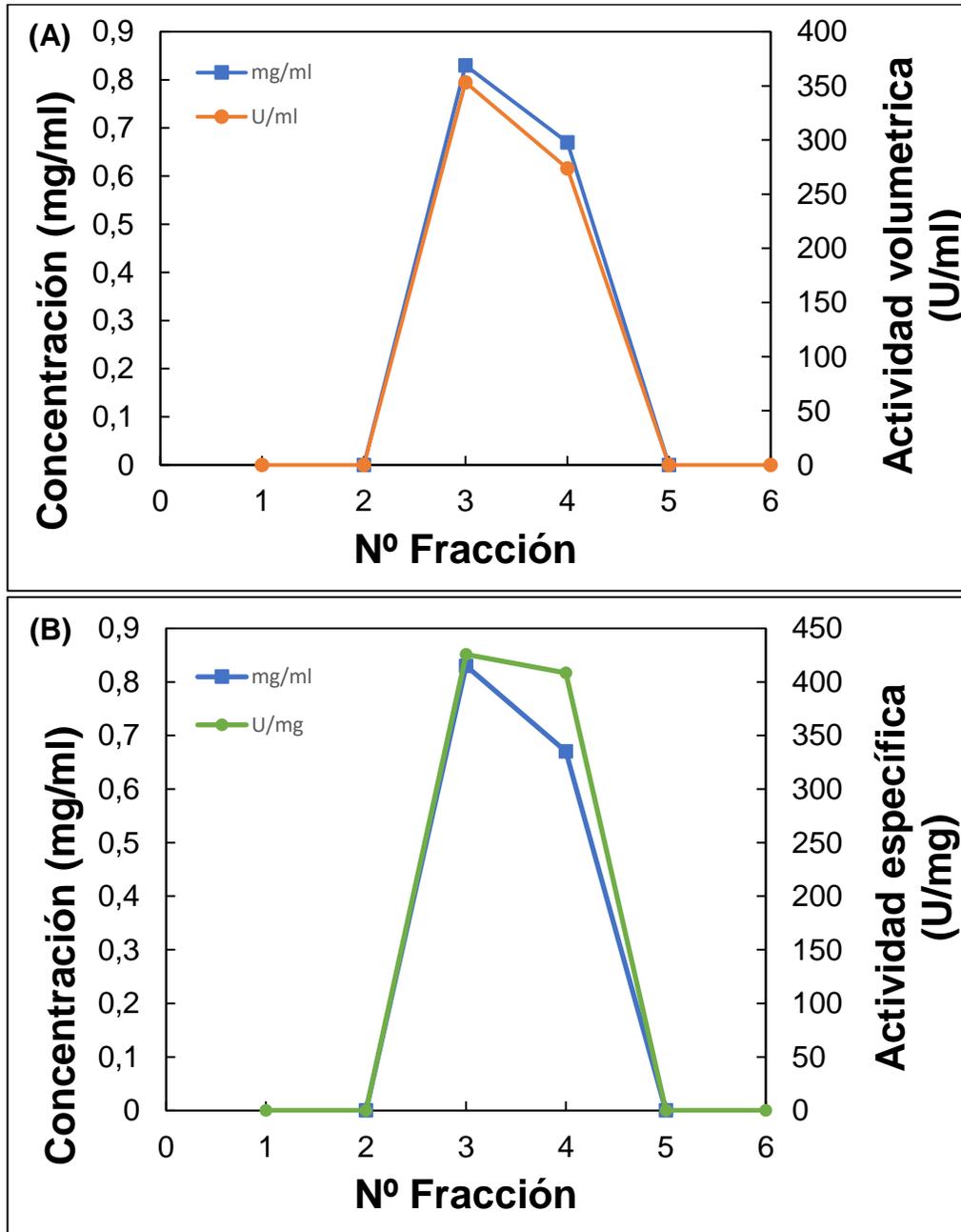


Figura 16 – Actividad y concentración de proteínas de las fracciones que eluyen de la columna superdex 200 después de ser cargada con el frente Q-Septh. – Las fracciones 3 y 4 fueron las únicas en que se obtuvo una concentración de proteínas detectable y una actividad oxidativa medible. Corresponden a las fracciones que eluye entre 28 y 38 y 38 y 44 minutos, respectivamente. En cuadrados se muestra la concentración de proteínas en mg/ml de cada fracción, mientras que en (A) círculos se muestra la actividad volumétrica y en (B) círculos se muestra la actividad específica.

4.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS ENZIMAS

Se analizó ambas enzimas purificadas para determinar sus propiedades bioquímicas, sus similitudes y diferencias. Una dificultad de éste paso fue la baja concentración de proteínas obtenida en los pasos finales de purificación, sin importar el protocolo que se utilizó. Esto causó que algunos de los datos obtenidos no pudieran ser analizados en réplica. Sin embargo, la variación numérica de este ensayo enzimático en particular es muy baja, por lo que los datos presentados aquí, probablemente se acercan mucho a los valores que se obtendrían siguiendo la rigurosidad estadística que normalmente se imponen.

4.3.1 DEPENDENCIA POR LA TEMPERATURA

Se estudió el comportamiento de LID17 a distintas temperaturas y se encontró un máximo de actividad entre 55 °C y 60 °C. La enzima purificada parece tener un rango de actividad más amplio que el medido en el extracto crudo, mostrando un descenso brusco de la actividad enzimática por debajo de los 55°C, como se ve en la figura 17.

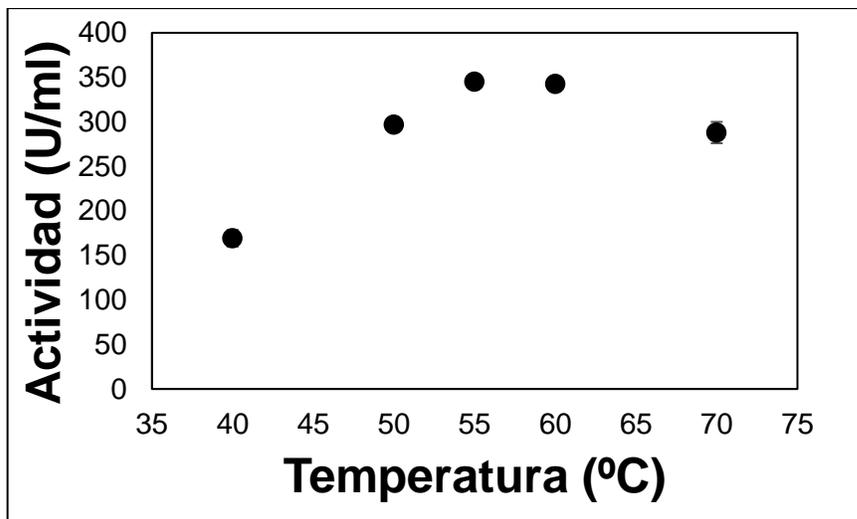


Figura 17 – Dependencia por la temperatura de la actividad enzimática de LID17. Todos los ensayos se realizaron a pH 7,5, y el pH de la solución tampón usada fue ajustado a la temperatura en la que se llevó a cabo cada reacción. Las barras de error representan dos mediciones experimentales independientes.

En paralelo se estudió el comportamiento de la enzima O-SCQ a distintas temperaturas (Figura 18). Esta enzima parece ser un poco más termófila que LID17 para la oxidación de SGZ, aunque su tendencia y actividad es similar.

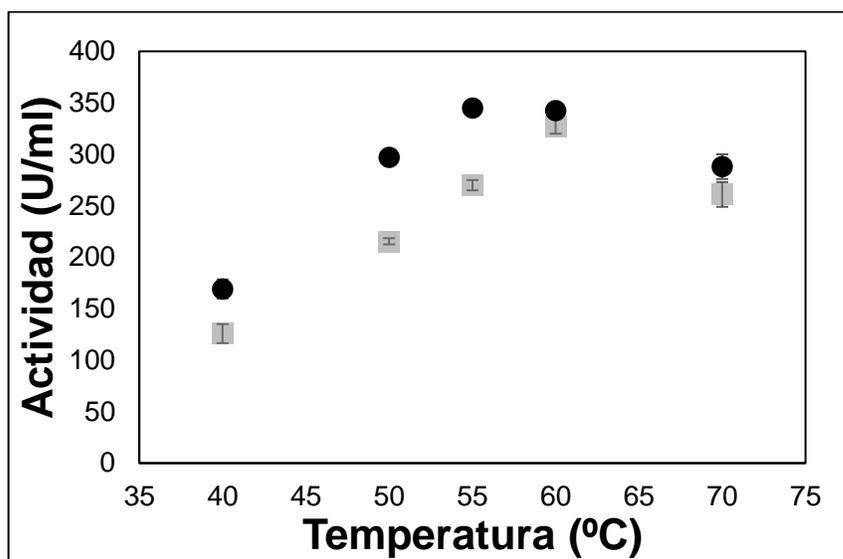


Figura 18 – Dependencia por la temperatura de la actividad enzimática de la O-SCQ (Cuadrados). En círculos se muestran los valores registrados para LID17, a modo de comparación. Todos los ensayos se realizaron a pH 7,5, y el pH del tampón usado fue ajustado a la temperatura en la que se llevó a cabo cada reacción. Las barras de error representan dos mediciones experimentales independientes.

4.3.2 DEPENDENCIA POR EL pH

La lacasa LID17 presentó un máximo de actividad entre pH 7 y 7,5 (Figura 19). Su rango de actividad parece ser bastante acotado.

La actividad enzimática purificada desde el frente Q-Septh presenta un rango de actividad un poco más amplio, y la mayor oxidación de SGZ ocurre a pH levemente más alcalino, entre 7,5 y 8 que en el caso de LID17 (Figura 20).

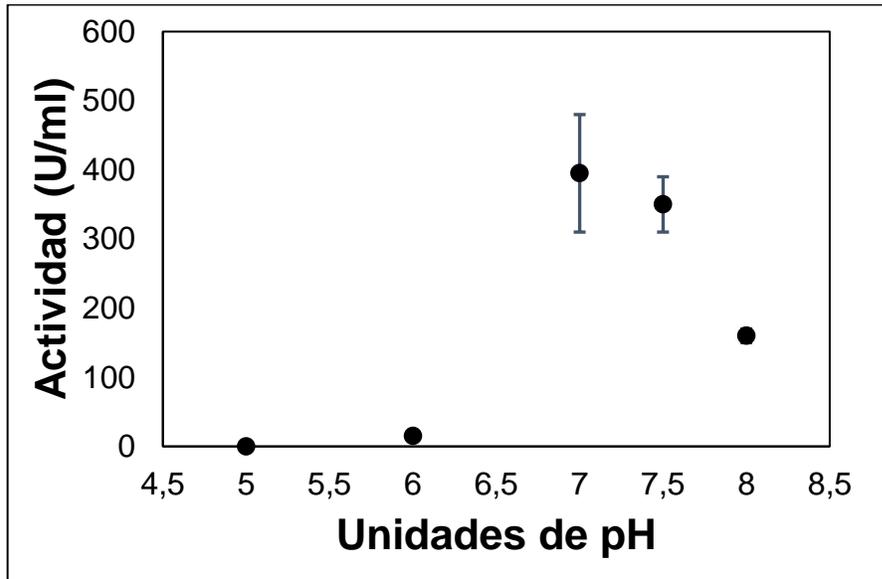


Figura 19 – Dependencia por el pH de la actividad enzimática de LID17. Todos los ensayos se realizaron a 55 °C en presencia de sulfato de cobre 100 Mm. Las barras de error representan dos mediciones experimentales independientes.

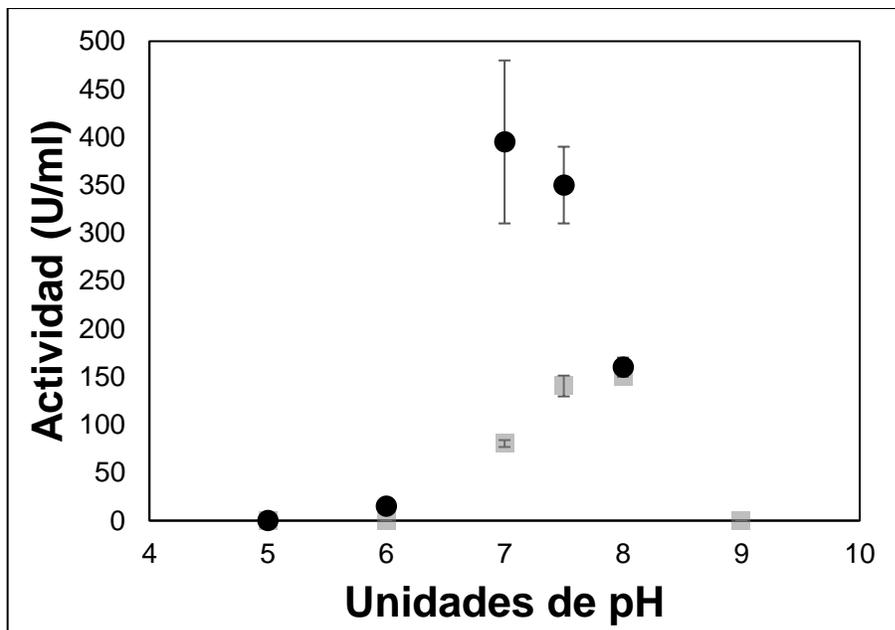


Figura 20 – Dependencia por el pH de la actividad enzimática de O-SCQ (cuadrados). En círculos se muestran los valores de actividad obtenidos con la enzima LID17, a modo de comparación. Todos los ensayos se realizaron a 55°C en tampón fosfato de potasio 100 mM con sulfato de cobre 100 mM. Las barras de error representan dos mediciones experimentales independientes.

4.3.3 TERMOESTABILIDAD

Se determinó la termoestabilidad de la lacasa LID17 a 55°C, temperatura a la cual la actividad medida fue máxima. Adicionalmente se realizó esta determinación a 65°C ya que es la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo que la produce, y a 80°C por ser una temperatura de relevancia industrial (es la temperatura a la cual se lleva a cabo el blanqueado del papel en la industria papelera). Los resultados se muestran en la Figura 21.

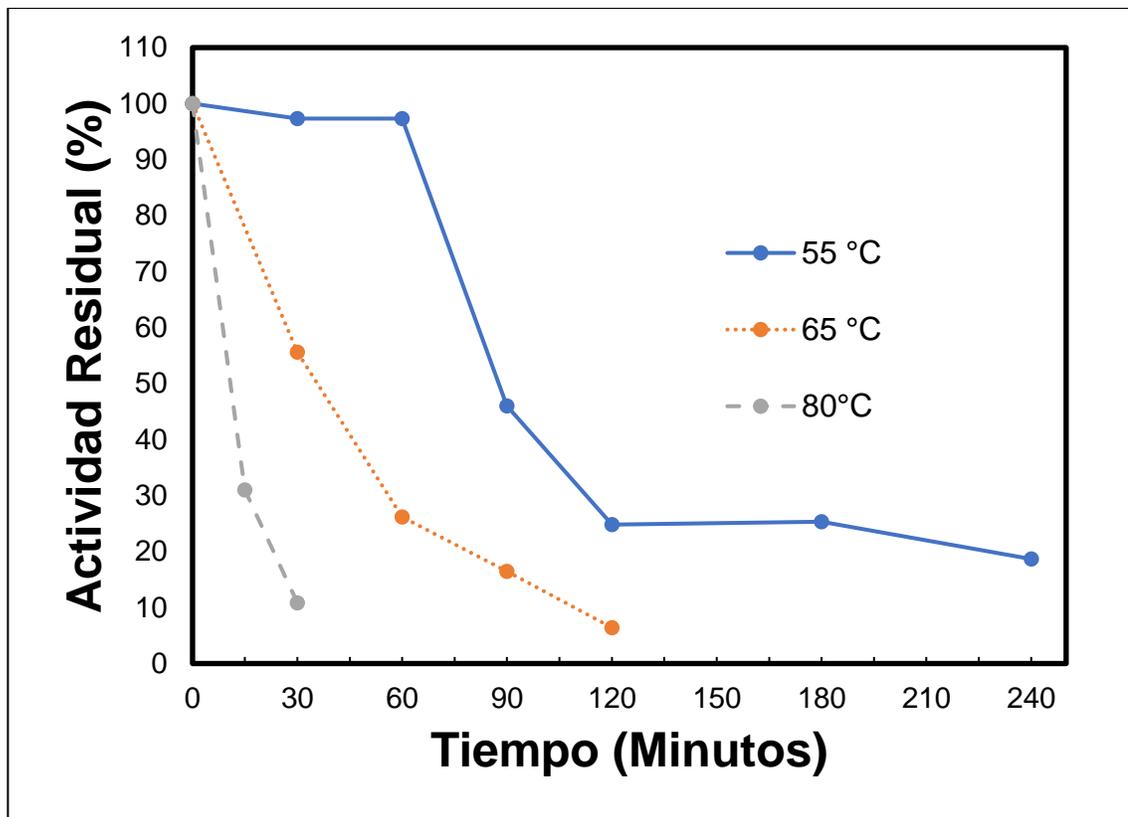


Figura 21 – Termoestabilidad de la enzima LID17. La enzima se incubó a tres temperaturas diferentes y se tomó alícuotas cada media hora (15 minutos cuando se incubó a 80°C) para realizar ensayos a 55°C en tampón fosfato de potasio 100 mM con sulfato de cobre 100 mM a pH 7,5. La línea continua, la línea punteada y las líneas discontinuas representan la estabilidad térmica a 55, 65 y 80 °C respectivamente.

4.3.4 BÚSQUEDA DE SUSTRATOS

Se evaluó la capacidad de ambas enzimas purificadas para oxidar diferentes compuestos aromáticos, siguiendo un protocolo análogo al descrito para la oxidación de la SGZ, pero variando el sustrato utilizado (Tabla 4). Se observó que la enzima LID17 es bastante selectiva en cuando los compuestos que acepta como sustrato, pues de los nueve compuestos ensayados solo se observó la oxidación de SGZ y de ácido gálico. Ambos sustratos comparten la sustitución 3,4,5 en el anillo fenólico, con un grupo hidróxilo en la posición 4.

Tabla 4 – Sustratos ensayados para las diferentes enzimas. Las diferencias en los cambios de absorbancia respecto de los blancos no enzimáticos se señala con un (+). Donde no se detectó actividad se muestra un (–) en la tabla. Los resultados obtenidos con las enzimas purificadas, LID17 y O-SCQ, se contrastaron con la lacasa comercial de *T. versicolor* (TVL).

Sustrato	LID17	O-SCQ	TVL
SGZ	+	+	+
Guayacol	-	-	+
Ácido Gálico	+	+	+
Ácido P-Cumárico	-	+	-
Ácido Cafeico	-	-	+
RBB	-	-	-
Rojo Congo	-	-	+
L-Tirosina	-	-	-
Ácido Violúrico	-	-	-

La enzima O-SCQ reaccionó de manera similar, pero además fue capaz de oxidar, aunque mostrando baja actividad, el ácido p-cumárico, que también presenta su sustituyente nucleofílico en la posición 4 del anillo fenólico.

Además, se realizó el mismo estudio de utilización de sustratos para la lacasa comercial del hongo *T. versicolor*, para poder compararla con las enzimas purificadas y ver si se existe alguna diferencia. La principal diferencia encontrada fue la preferencia de la lacasa de *T. versicolor* por catecoles. Las enzimas purificadas no aceptaron este tipo de compuestos como sustratos. Además, la lacasa fúngica fue más eficiente degradando la tinción “*Rojo congo*”.

4.3.5 MASA MOLECULAR

La masa molecular de la enzima LID17 fue determinada haciendo uso de dos diferentes técnicas. Utilizando el patrón de corrida del SDS-PAGE de las fracciones puras obtenidas en el tercer paso cromatográfico se calculó la masa molecular de la subunidad de la enzima según el método que relaciona el logaritmo de la masa molecular con la distancia de migración relativa (Hames B.D., 1998) obteniéndose una masa molecular de 23 kDa. La curva de calibración construida se muestra en la Figura 22.

Utilizando una columna de exclusión molecular Superdex 200 y una curva de calibración construida utilizando lactoalbúmina, anhidrasa carbónica, albúmina de pollo, albumina bovina, y catalasa como estándares de masa molecular se pudo determinar que la holoproteína LID17 posee alrededor de 66 kDa (Figura 23).

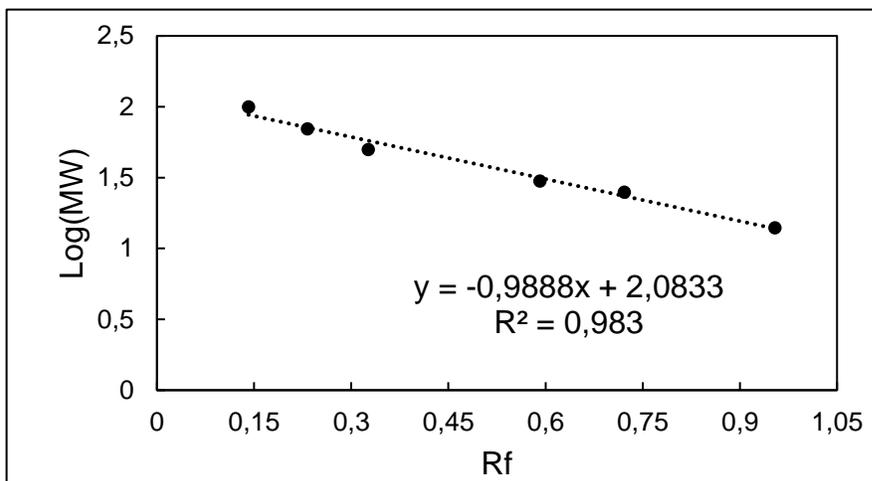


Figura 22 – Relación entre la masa molecular y el factor de desplazamiento en un gel SDS-PAGE. Se utilizó para calcular la masa molecular aproximada de la subunidad de LID17.

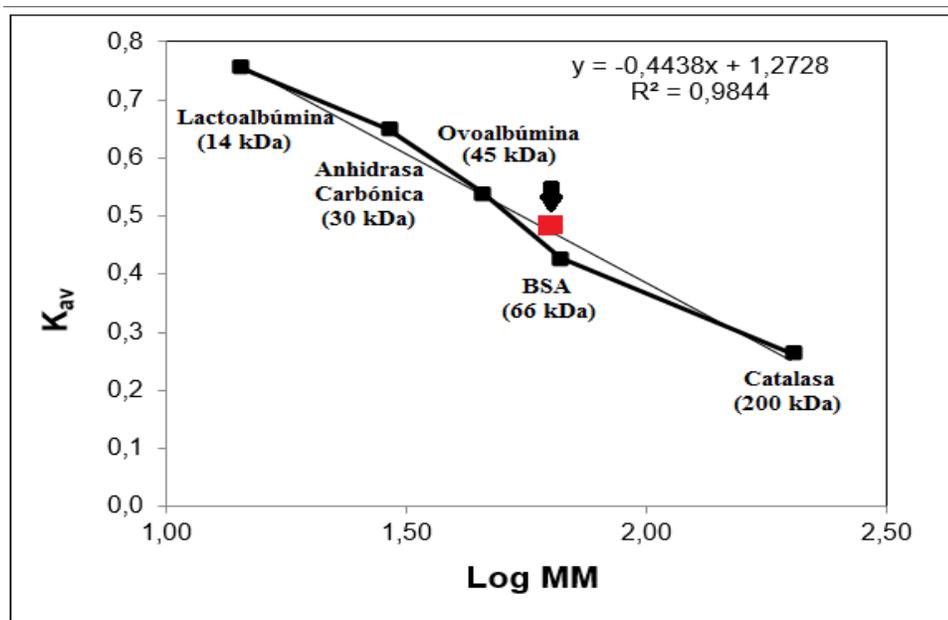


Figura 23 – Curva de calibración para la determinación de la masa molecular en la columna Superdex-200. Se utilizó como estándares de masa molecular conocida las siguientes proteínas: Catalasa (200 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) anhidrasa carbónica (29 kDa) y lactoalbúmina (14 kDa). El cuadrado rojo señalado con una flecha indica el punto de la curva que coincide con la elución de la proteína LID17.

4.3.6 CONSTANTES CINÉTICAS

Con las fracciones de lacasa pura se determinaron los parámetros cinéticos aparentes para la enzima LID17 a 50°C. Se utilizó el método de los dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) para obtener las constantes cinéticas. Se obtuvo un valor de 0,38 $\mu\text{M}\times\text{min}^{-1}$ para la velocidad máxima y una K_m aparente de 7,4 μM (Figura 24).

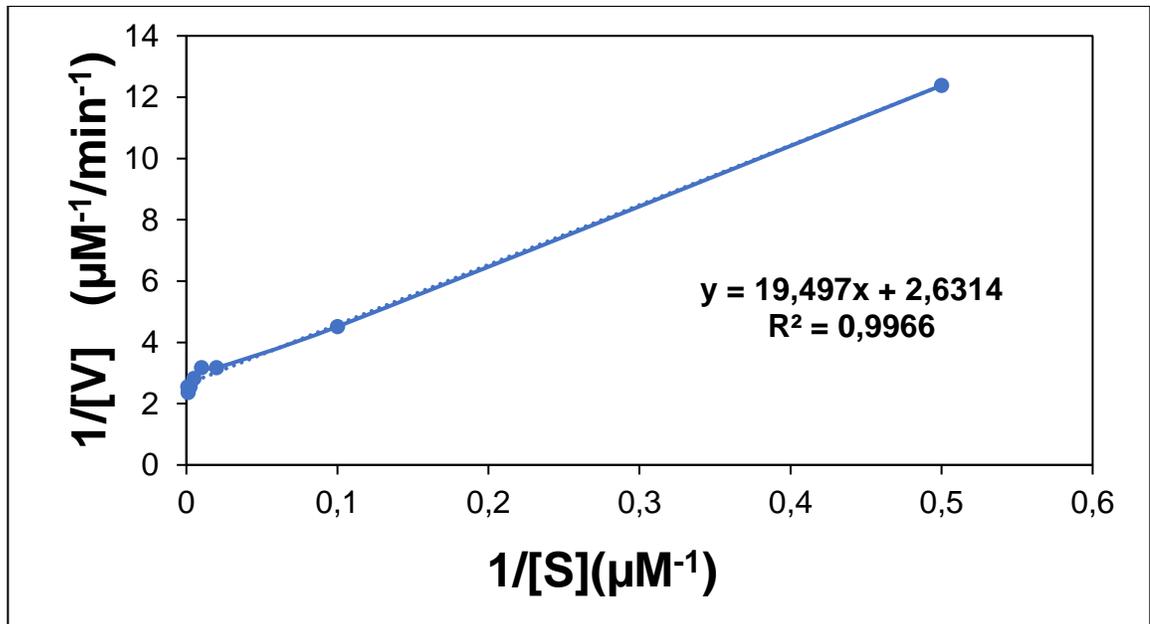


Figura 24 - Gráfico de doble recíproco de la oxidación de SGZ por LID17. El ensayo se realizó a 50°C y pH 7,5. Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron 2, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800, y 1000 μM .

4.4 ENSAYOS DE ACTIVIDAD PEROXIDASA

Dado que la actividad enzimática asociada a la fracción O-SCQ se comportaba de manera atípica frente al peróxido, se hizo la comparación del cambio de absorbancia obtenido al incubar la misma cantidad de enzima variando sólo la presencia de cobre o H₂O₂. De este ensayo se puede inferir que esta enzima posee una actividad capaz de oxidar la SGZ que es dependiente de cobre y se activa frente a la presencia de peróxido de hidrógeno (Tabla 5):

Tabla 5 - Medición de la oxidación de la SGZ para las fracciones O-SCQ en ausencia (-) y presencia (+) de cobre y peróxido de hidrógeno. UA/min corresponde al cambio medido en las unidades de absorbancia por minuto.

Cu ⁺²	+	-	+	-
H ₂ O ₂	+	+	-	-
UA/min	1,278	0,020	0,014	0,009

Además se realizó un ensayo específico para la enzima manganeso peroxidasa (Lopes de Oliveira, P., 2009), sin observarse actividad.

Sin embargo, cuando se realizó el ensayo colorimétrico de oxidación del *azure-blue*, se observó oxidación del sustrato manifestada como pérdida del color de la solución.

5. DISCUSIÓN

Las lacasas son enzimas que gracias a su amplio rango de sustratos y a la ubiquidad de las reacciones de oxidación y reducción que llevan a cabo en toda clase de procesos industriales y naturales encierran un interesante potencial de aplicación además de servir como modelo de estudio.

El uso de enzimas bacterianas posee muchas ventajas por sobre el uso de enzimas eucarióticas, más allá de las diferencias intrínsecas que existen entre los reinos taxonómicos en el caso específico de las lacasas. Los ciclos celulares más rápidos, la facilidad de generar gran masa celular, menores requerimientos espaciales y en general condiciones de crecimiento de menor costo, hacen que las bacterias sean un sistema ventajoso, tanto para producir como para expresar y estudiar enzimas.

En la sección 1.2 ya se han discutido las particularidades de las lacasas bacterianas. Una diferencia bastante relevante es la preferencia por pHs más alcalinos y neutros, (Claus H, 2003) lo que permite ampliar la gama de aplicaciones posibles para las lacasas y las hace más indicadas para algunas aplicaciones específicas. Por ejemplo, para la degradación de colorantes sintéticos, resulta ventajoso tener lacasas activas a pHs neutros. A pHs ácidos o alcalinos, las tasas de decoloración de tinciones textiles y similares colorantes industriales decae rápidamente. (Pearce C.I., Lloyd J.R., Guthrie JT., 2003; Singh, R. P., Singh, P. K., y Singh, R. L., 2014).

Las enzimas de microorganismos extremófilos, además de las diferencias ya descritas, poseen una serie de ventajas por sobre las enzimas de bacterias mesofílicas, como mejor estabilidad general, temperaturas de acción más cercanas a los procesos industriales, mejor tolerancia a solventes orgánicos, lo que las hace relevantes para su uso en síntesis química y en la industria farmacéutica entre otras.

Por estas razones, los microorganismos extremófilos son una fuente promisoría de nuevas lacasas para su aplicación en la industria, además del valor científico que conlleva el hecho de que esta clase de microorganismos este menos estudiado y las características de sus proteínas, así como sus particularidades bioquímicas, encierran un potencial virtualmente inexplorado. Es así como la oportunidad de caracterizar una lacasa proveniente de un termófilo antártico, desde un territorio tan extremo cuya biodiversidad también se encuentra relativamente indocumentada, parecía particularmente atractiva para la búsqueda de lacasas con nuevas características.

Durante la optimización de la obtención del extracto que contenía la enzima para su purificación, se observó que al agregar lignina al medio suplementado con cobre se genera una disminución de la actividad medida en el extracto crudo de los medios de cultivo usados. Una explicación posible podría ser el hecho de que la lignina, al poseer muchos grupos fenólicos en su estructura, en teoría es capaz de complejar el cobre en solución y volverlo menos biodisponible.

Otro resultado interesante fue ver que el sulfato ferroso actúa como un inductor débil de la actividad enzimática. Las funciones fisiológicas que las lacasas cumplen en las bacterias no están aún del todo claras. Sin embargo, de lo observado en este trabajo, una posible función de esta enzima estaría relacionada con la resistencia de *Geobacillus* sp. ID17 a metalociones ambientales. Es sabido que algunas lacasas son capaces de oxidar algunos cationes monovalentes, lo que los vuelve menos tóxicos para la célula. Además, se ha observado que algunas lacasas bacterianas le confieren resistencia al cobre a los microorganismos que las producen (Grass G., Rensing C., 2001; Jennifer L. R., Niederweis M., 2013). El hecho de que LID17 se expresa cuando el medio de cultivo se suplementa con cobre, o incluso con hierro (Figura 9), apoya el supuesto de que ésta enzima participaría como un factor de resistencia al estrés oxidativo asociado a los metales ambientales. Dado que ID17 es un

microorganismo antártico, aislado de una isla de origen volcánico con gran actividad geotérmica, tiene más sentido pensar esto que suponer que esta enzima participa en la degradación de materia lignocelulósica. Pero esto último también podría ser posible si es que la enzima está presente en este microorganismo como parte de un vestigio evolutivo que quedó en el genoma de este *Geobacillus* o de un gen ortólogo de un ancestro proveniente de otro ambiente.

Una de las dificultades encontradas durante la purificación de esta enzima fue la presencia en el extracto crudo de ID17 de una segunda proteína que también es capaz de oxidar SGZ, obteniéndose como consecuencia muchas fracciones con actividad “siringaldazina-oxidasa” en los distintos pasos de la purificación, las cuales inicialmente fueron identificadas erróneamente como un solo amplio peak cromatográfico con actividad lacasa.

A pesar de que, según se muestra en la Figura 7, al agregar peróxido de hidrógeno en el extracto crudo de *Geobacillus* sp. ID17 se genera una inhibición de la actividad oxidativa medida, cuando posteriormente se realizó el mismo ensayo de inhibición por peróxido en cada una de las fracciones obtenidas tras el primer paso cromatográfico, se observó que en algunas de las fracciones estudiadas no se inhibía la actividad, sino que, por el contrario, se potenciaba.

Esta información, junto con el uso de un tiempo de elución más largo para el segundo paso de la purificación, permitió separar una enzima con actividad peroxidasa que eluye entre 0,49 y 0,53 M de NaCl de la columna DEAE-Sepharose. La fracción que eluye entre 0,36 y 0,42 M de NaCl posee una actividad enzimática capaz de oxidar SGZ, y se inactiva en presencia de peróxido de hidrógeno, por lo que la actividad debe corresponder a una lacasa, ya que este grupo de enzimas son inhibidas en presencia de este compuesto.

Es interesante observar que tras el primer paso de purificación cromatográfica a partir del extracto crudo se obtiene una fracción que posee una actividad específica de casi 3000 U/mg. Sin embargo, tras eluir las fracciones desde la siguiente columna, la fracción con actividad lacasa obtenida posee casi la mitad de las unidades de actividad por miligramo del paso de purificación anterior (Tabla 2). Este descenso en la actividad específica probablemente se deba al hecho de que después de eluir el extracto crudo cargado en la resina Q-Sepharose se obtienen fracciones donde se encuentran presentes tanto la lacasa como la peroxidasa encontradas, y es sabido que estas enzimas actúan de manera sinérgica. (Leite O.D. y cols., 2003; Arantes V., Milagres A.M.F., 2007) Esto contribuiría a un aumento aparente en la actividad específica al inicio de la purificación. Al separar ambas enzimas en el segundo paso cromatográfico, este efecto sinérgico se pierde, y las unidades medidas por miligramo de proteína descienden.

En general la cantidad de enzima lacasa obtenida después de cada purificación fue bastante baja. Alrededor de un miligramo de lacasa purificada a partir de 40 litros de medio de cultivo. La biomasa de ID17 obtenida en un cultivo normal también es baja, 0,9 gramos por litro aproximadamente. Esto puede explicarse por el hecho de que esta enzima se expresa mejor en presencia de cobre, que es una condición de estrés para la bacteria. La baja cantidad de enzima obtenida puso una seria restricción a la realización de los objetivos originales de este trabajo.

Tras el primer paso cromatográfico del protocolo descrito en la sección 4.2.1 se obtuvo un excedente de proteína que no quedó retenido en la resina Q-Sepharose. En la sección 4.2.2 se describe como se purificó, a partir de este excedente, una proteína que se denominó O-SCQ. Esta segunda enzima posee la particularidad de presentar actividad peroxidasa sólo en presencia de cobre. Este resultado es inusual, pues se ha reportado que las peroxidasas se inactivan

en presencia de cationes metálicos, específicamente cobre (Getchell R. W. y Walton J.H., 1931). Sin embargo, en presencia de peróxido de hidrógeno la tasa de oxidación de SGZ por parte de esta enzima es más alta que en su ausencia, por lo que efectivamente esta enzima posee una actividad peroxidasa que parece depender de cobre. Hasta la fecha no existen otras peroxidases dependientes de cobre reportadas en la literatura. Por esta razón se purificó parcialmente esta fracción y se realizaron algunas caracterizaciones preliminares de la actividad enzimática presente en ella.

Debido a que esta enzima no demostró tener actividad dependiente de manganeso, se descarta que sea una manganeso peroxidasa. En cambio, sí fue capaz de degradar el compuesto *azure-blue* por lo que la actividad peroxidasa que posee podría tratarse de una peroxidasa decolorante de tinciones (EC 1.11.1.19), una peroxidasa versátil (EC 1.11.1.16) o una lignina-peroxidasa (EC 1.11.1.14).

Dado que esta enzima se comporta como una lacasa en el medio de reacción descrito en la sección 3.1, y como una peroxidasa en presencia de H₂O₂ y cobre, podría tratarse de una enzima o complejo enzimático con ambas actividades, o incluso de una nueva clase de enzimas. Para corroborar esto último sería necesaria una caracterización más rigurosa de esta solución enzimática para determinar la identidad de ésta nueva enzima. Se podrían usar inhibidores específicos de las distintas enzimas, purificar a homogeneidad y analizar la composición aminoacídica por espectroscopía de masas.

La lacasa LID17 obtenida resultó ser una enzima con preferencia por pHs neutros. La temperatura en la cual la oxidación de la SGZ es máxima, fue entre los 55°C y 60°C. Valores más altos o menores de temperatura disminuyen la tasa de oxidación de esta enzima.

La lacasa resultó ser relativamente termoestable a 55 °C, con una vida media de 90 minutos, siendo así más termoestable que todas las lacasas fúngicas conocidas y descritas hasta la fecha. Sin embargo, no fue muy estable a temperaturas más altas, manteniendo solo un 10% de la actividad a 80°C después de 30 minutos de incubación. Esto último disminuye su aplicabilidad en ciertos procesos industriales como el blanqueado de la pulpa de papel que requiere de altas temperaturas para solubilizar y eliminar el material lignocelulósico.

La lacasa más termoestable reportada hasta ahora es proveniente de la bacteria termofílica *Thermus thermophilus*, con una temperatura de máxima actividad reportada de 92 °C y una vida media de 14 horas a 80 °C (Miyazaki K., 2005). De las lacasas disponibles comercialmente, la más termoestable corresponde a la de *Myceliophthora thermophila*, que tiene una vida media de 20 minutos a 60°C y es por tanto menos termoestable que la lacasa LID17 (R.M. Berka, 1997).

La lacasa LID17 parece ser muy selectiva respecto a los sustratos que utiliza. De todos los sustratos ensayados, sólo se observó la oxidación de SGZ, y de ácido gálico. Ambos compuestos poseen grupos atractores de electrones en sus anillos aromáticos en posición *para*- respecto del grupo hidroxilo que probablemente es oxidado por la lacasa. Esto debería estabilizar el radical formado durante la oxidación, debilitando el enlace O-H, lo que vuelve más favorable la oxidación de estos sustratos. La preferencia de ésta lacasa por éstos dos sustratos hace suponer entonces que se trata de una lacasa de bajo potencial redox. Con respecto a la lacasa de *T. versicolor*, LID17 presenta un rango de sustratos mucho más estrecho (Tabla 4).

Los valores de masa molecular que se obtuvieron para LID17 están dentro de lo esperado para una lacasa. La subunidad presenta una masa aparente de 23 kDa, según se determinó por SDS-PAGE, mientras que la holoenzima posee una masa molecular relativa de 64 kDa, determinada por exclusión molecular. A partir

de estos valores experimentales obtenidos, se puede inferir que LID17 probablemente es una enzima trimérica. Algunas lacasas del género *Streptomyces* son triméricas, como la lacasa SLAC de *S. coelicolor*, la cual ha sido cristalizada y su estructura publicada (Skalova T. y cols., 2009) (Figura 3).

Con respecto a los parámetros cinéticos de LID17, la K_m para SGZ obtenida fue de 7,4 μM , valor que se encuentra dentro del rango de otras constantes de Michaelis bacterianas, aunque un poco más alta. Por ejemplo en el caso de *Bacillus licheniformis* la K_m es de 4,3 μM (Koschorreck y cols., 2008).

Si bien se dispone del genoma secuenciado del *Geobacillus* sp. ID17, todavía existen algunas dudas respecto al gen que codifica para la enzima LID17. A juzgar por la masa molecular de aproximadamente 23 kDa de la subunidad observada en los análisis basados en SDS-PAGE, se podría suponer que el gen que está anotado como una lacasa de 30 kDa (Gen 340157_147, genoma no publicado, propiedad de Fundación Biociencia.) debiese ser el correspondiente a la proteína purificada, a pesar de la diferencia de 7 kDa. Sin embargo, es necesario mencionar que paralelamente a este trabajo se intentó generar una versión recombinante, clonada y expresada en *E. coli*, del producto del gen mencionado sin resultados positivos. Esto podría deberse a que no se expresó correctamente, o a que el gen no corresponde a una enzima funcional. El gen 340157_147 fue identificado buscando en el genoma marcos de lectura abiertos (ORFs) que contuvieran los sitios de unión a cobre presentes en el sitio activo de las lacasas, que son bastante conservados entre especies. Pero es importante recordar que otras proteínas de las superfamilia de las cupredoxinas como las plastocianinas y las nitrosocianinas poseen los mismos sitios de unión. De hecho, en el genoma de ID17 se encontró al menos siete ORFs que contenían este tipo de sitios de unión a cobre, pero cuando estos se compararon por medio de un alineamiento de secuencias peptídico con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), sólo dos de estas secuencias presentaban

coincidencias con secuencias de lacasas. En ambos casos correspondieron a secuencias derivadas de genes provenientes de *Geobacillus kaustophilus*, las cuales no están caracterizadas tampoco, sólo anotadas en el genoma. La respuesta definitiva dependerá del análisis por espectroscopía de masas de la huella peptídica de la proteína purificada.

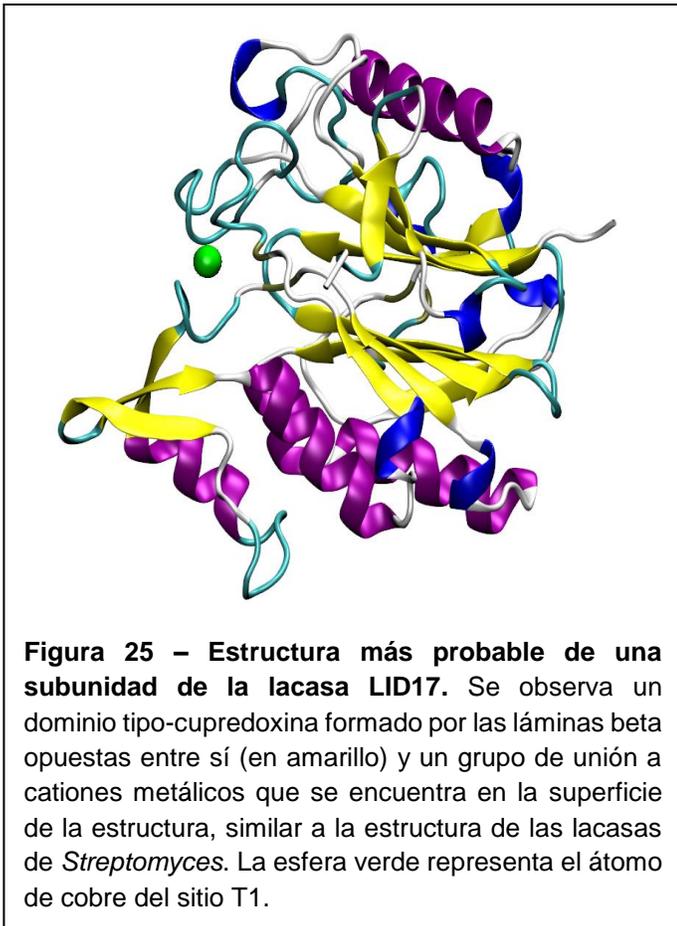
Se generó un modelo tridimensional de la proteína codificada por el gen *340157_147* utilizando la herramienta bioinformática SWISS-MODEL (Figura 25), y se encontró que en la estructura del polipéptido generado sólo se encuentra un sitio de unión a metalociones. Esto cobra sentido considerando que, basándose en el tamaño de la subunidad determinado por SDS-PAGE, la enzima ID17 se trataría de un trímero. Como se discutió en la sección 1.3 y se puede apreciar también en la Figura 3, las lacasas de *Streptomyces*, que también son triméricas, sólo poseen un sitio de unión a cobre en el dominio 1 de sus subunidades. En la interfase de unión entre subunidades vecinas se forma la estructura que aloja al clúster trinuclear. Esta consideración vuelve más fuerte aún el argumento de que la lacasa ID17 probablemente está codificada por el gen *340157_147*.

Existe, empero, una incertidumbre acumulativa en el hecho de que productos génicos putativos se anoten en los genomas y posteriormente se usen como referencia para anotar genes, que no han sido caracterizados, en genomas de microorganismos recientemente descubiertos. Esto lleva a una especulación que finalmente torna evidente el hecho de que el análisis bioinformático en sí no es representativo de toda la información biológica. Puede que exista una sobre-representación de las lacasas bacterianas en trabajos puramente bioinformáticos como el realizado por Alexandre G. y Zhulin I.B. (2000), aunque por otro lado contribuyó a llamar la atención sobre las lacasas bacterianas. Pero finalmente se vuelve necesario realizar un trabajo bioquímico y enzimológico, como el que se expone en esta tesis, para confirmar la presencia de las actividades enzimáticas atribuidas.

Y por esta misma razón, quizás sea relevante aún el trabajo con enzimas nativas. La mayoría de las enzimas caracterizadas en la última década corresponden a versiones recombinantes de las proteínas encontradas por análisis genómico o metagenómico. Es indudable que el trabajo con enzimas recombinantes posee muchas ventajas por sobre el trabajo con enzimas nativas, como un mejor control de la expresión que se traduce en rendimientos mucho mayores, lo que a su vez aporta a que se puedan obtener muestras de mayor pureza. Esto vuelve el trabajo con enzimas recombinantes la opción más adecuada para ciertos tipos de estudios.

Aunque en general se acepta que las enzimas recombinantes no poseen una diferencia conformacional relevante respecto a las enzimas nativas, se sabe también, por otro lado, que el ambiente en que una cadena polipeptídica naciente se sintetiza sí puede tener un impacto sobre su plegamiento (Dobson, C.M., 2003). Quizás en el caso de los extremófilos este punto sea más crítico aún, ya que el metabolismo de un termófilo ha evolucionado en un ambiente muy diferente al de un mesófilo. No está claro si todas las enzimas termófilas podrían efectivamente expresarse heterológamente en un mesófilo, en parte por el sesgo que impone el hecho de que los resultados negativos generalmente no se publican. Los casos reportados son escasos, pero existen en la literatura diferencias descritas entre enzimas termófilas y sus versiones recombinantes. La glutamato deshidrogenasa recombinante de *Pyrococcus furiosus* es menos termoestable que su versión nativa, y bajo los 90°C solo es parcialmente activa (Lebbink J.H., 1995). Cuando la 5'-metiltioadenosina fosforilasa de *Sulfolobus solfataricus* se expresa heterológamente en *E.coli* no forma sus puentes disulfuro de manera correcta. (Cacciapuoti G., 1999). Podría resultar, finalmente, que en el caso de los termófilos se estén obteniendo resultados sesgados por la preferencia casi universal por trabajar con las versiones recombinantes. Pero en lo concreto, en el caso del *Geobacillus* sp. ID17 se encontró que el gen que en un alineamiento de secuencias aminoacídicas compartía un alto porcentaje de

identidad con una lacasa no caracterizada bioquímicamente, resultó no generar una enzima funcional en *E.coli*. Aun así, una actividad lacasa fue encontrada en el extracto crudo de ID17, lo que remarca la importancia de continuar el trabajo con enzimas nativas aun cuando existe la alternativa de producir sus versiones recombinantes.



LID17 no posee características que la separen evidentemente de las lacasas comerciales, salvo la especificidad de sustrato y su perfil de pH. Al ser una lacasa mucho más específica que otras de las lacasas descritas, que en general tienden a ser un poco más promiscuas, podría explorarse su uso en síntesis orgánica, donde la especificidad de cada paso oxidativo es muy importante ya que impacta el rendimiento de la reacción. Su rango de pH neutro la vuelve más específica aún, por lo que

finalmente el valor comercial que pudiese tener esta lacasa respondería en el mejor de los casos a un interés de nicho. Un ejemplo de una posible aplicación es la generación de polímeros de ácido gálico, compuesto que la enzima fue capaz de oxidar.

Los polímeros de ácido gálico se comportan como materiales semi-conductores, y se ha explorado su síntesis enzimática para su uso en la confección de electrodos (Lopez J. y cols, 2013; Díaz-Sánchez J. y cols, 2017). Sería interesante estudiar la capacidad de esta nueva lacasa, LID17, de generar la polimerización oxidativa de este sustrato y ver qué ventajas ofrece por sobre los métodos hasta ahora estudiados de generación de este material.

6. CONCLUSIONES

- En este trabajo se purificó la enzima LID17, a partir de un cultivo de *Geobacillus* sp. ID17, la cual posee una actividad lacasa que presenta un máximo a temperaturas entre 55 y 60°C y pH 7, en las condiciones experimentales utilizadas.
- En base a la masa molecular estimada de su subunidad (23 kDa), y la masa molecular determinada para la holoenzima (64 kDa), se podría concluir que LID17 es una proteína trimérica.
- La lacasa LID17 mantiene el 100% de su actividad tras 60 minutos a 55°C, siendo por lo tanto más termoestable que las lacasas comerciales disponibles.
- Sus constantes cinéticas son comparables a las de otras lacasas descritas, con una V_{max} de 0,38 $\mu\text{M min}^{-1}$ y una K_m de 7,4 μM .
- LID17 presenta, sin embargo, una mayor selectividad de sustratos que la lacasa comercial de *T. versicolor*, con la cual fue contrastada.
- En el extracto crudo de *Geobacillus* sp. ID17 se encontró además otras dos enzimas capaces de oxidar la siringaldazina que resultaron ser peroxidasas. De estas dos peroxidasas, una de ellas (O-SCQ) presenta una actividad enzimática dependiente de cobre, lo que es atípico para una peroxidasa.

En resumen, se puede concluir que *Geobacillus* sp. ID17 posee una enzima intracelular con actividad lacasa, estable durante una hora a 55 °C y activa a pH neutro, que posee una preferencia de sustratos que difiere de la lacasa comercial de *T. versicolor*, reafirmando la observación de que entre las lacasas de diversas especies existe una gran variabilidad en cuanto a su especificidad de sustrato.

7. REFERENCIAS

1. Addleman K., Archibald F.S. (1993) Kraft pulp bleaching and delignification by dikaryons and monokaryons of *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol.*, 59:266–273
2. Alexandre G., Zhulin I.B. (2000) Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol.*, 18:41–42.
3. Archibald B., (1992) A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure *Appl Environ Microbiol.* 58(9):3110-6.
4. Arantes V., Milagres A.M.F. (2007) The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe³⁺-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. *Enzyme. Microb. Technol.* 42:17–22
5. Ausec L., Zakrzewski M., Goesmann A., Schluter A., Mandic-Mulec I. (2011) Bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes. *PLoS One* 6:e25724
6. Baldrian, P. (2006) Fungal laccases - occurrence and properties, *FEMS Microbiol. Rev.*, 30:215-242.
7. Barton S. C., Kim H.-H., Binyamin G., Zhang Y., Heller A., (2001) A Miniature Biofuel Cell *J. Am. Chem. Soc.*, 123:5802–5803
8. Bento I., Martins L.O., Lopes G.G., Carrondo M.A., Lindley P.F. (2005) Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Trans* 7:3507–3513.
9. Bradford M.M, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. (1976). *Anal. Biochem*, 72:248-254
10. Brander S., Mikkelsen J.D., Kepp K.P. (2014) Characterization of an alkali- and halide-resistant laccase expressed in *E. coli*: CotA from *Bacillus clausii*. *PLoS One* 9:e99402
11. Brown M.A., Zhao Z., Mauk A. G. (2002) Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*, *Inorg. Chim. Acta* 331:232–238
12. Bao, W., O'Malley, D. M., Whetten, R., and Sederoff, R. R. (1993) A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem *Science*, 260:672-674.

13. Boolag J.M, LEonowicz A. (1984) Comparative studies of extracellular fungal laccases Appl. Environ. Microbiol. 48(4):849-854
14. Cacciapuoti G., Fusco S., Caiazzo N., Zappia V., Porcelli M. (1999) Heterologous expression of 5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the recombinant protein and involvement of disulfide bonds in thermophilicity and thermostability. Protein Expression Purif., 16:125–135.
15. Caparros-Ruiz, D., Fornale, S., Civardi, L., Puigdomenech, P., and Rigau, J., (2006) Isolation and characterisation of a family of laccases in maize Plant Sci., 171:217-225.
16. Chaurasia P.K., Bharati S.L., Singh S.K. (2013) Comparative Studies on the Blue and Yellow Laccases. Research in Plant Sciences. 1(2):32-37.
17. Claus H (2003) Laccases and their occurrence in prokaryotes. Arch Microbiol. 179(3):145-50
18. Claus H., Filip Z (1998) Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. Acta Hydrochim Hydrobiol 26:180–185
19. Colman P. M., Freeman H. C., Guss J. M., Murata, M., Norris, V. A., Ramshaw J. A. M. Venkatappa M. P. (1978) X-ray crystal structure analysis of plastocyanin at 2.7 Å resolution. Nature, 272:319-324.
20. Crecchio C, Ruggiero P, Pizzifallo M.D.R., (1995) Polyphenoloxidases immobilized in organic gels: Properties and applications in the detoxification of aromatic compounds. Biotechnol. Bioeng. 48:585-591
21. Cullen D. (1997) Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. J Biotechnol 53:273–289
22. Dean J.F.D., Eriksson K.E.L. (1994) Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. Holzforschung 48:21–33
23. Díaz-Sánchez J., Rosas-Aburto A., Vivaldo-Lima E., Hernández-Alcántara J.M., Gracia-Mora I., Vázquez-Torrese H., Ordóñez L.C., Roquero P., Gimeno M. (2017) Development and characterization of a flexible electrochromic device based on polyaniline and enzymatically synthesized poly (gallic acid). Synth. Met. 223:43-48
24. Dobson C.M. (2003) Protein folding and misfolding. Nature., 426(6968):884-90.

25. Endo K., Hayashi Y., Hibi T., Hosono K., Beppu T., Ueda K. (2003) Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. J Biochem 133:671–677.
26. Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA (2003) Crystal structure of a bacterial endospore coat component—a laccase with enhanced thermostability properties. J Biol Chem 278:19416–19425.
27. Fernandes AT, Soares CM, Pereira MM, Huber R, Grass G, Martins LO (2007) A robust metallo-oxidase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. FEBS J 274:2683–2694.
28. Fernandes AT, Damas JM, Todorovic S, Huber R, Baratto MC, Pogni R, Soares CM, Martins LO (2010) The multicopper oxidase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum* shows nitrous oxide reductase activity. FEBS J 277:3176–3189
29. Forootanfar H., Moezzi A., Aghaie-Khozani M., Mahmoudjanlou Y., Ameri A., Niknejad F. y Faramarzi M.A. (2012), Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. IJEHSE, 9:27
30. Gavnholt, B., and Larsen, K., (2002) Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation Physiol. Plant., 116:273-280.
31. George PM, Lyckman AW, LaVan DA, Hegde A, Leung Y, Avasare R, Testa C, Alexander PM, Langer R, Sur M (2005) Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics. Biomaterials, 26:3511–3519
32. Getchell R. W., Walton J.H. (1931) Some Factors Influencing the Activity of Peroxidase, J. Biol. Chem., 91: 419
33. Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, ML., Bally, R. (1993) Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum* FEMS Microbiology Letters, 108:205–210
34. Grass G, Rensing C (2001) Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 183:2145–2147.
35. Gunne M, Hoppner A, Hagedoorn PL, Urlacher VB (2014) Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* FEBS journal 281(18): 4307–4318
36. Harkin JM, Obst JR (1973) Syringaldazine: an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. Experientia, 29:381–387

37. Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL (1998) High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J Agr Food Chem* 46:1887–1892
38. Jennifer L. R., Niederweis M., (2013) A Multicopper Oxidase Is Required for Copper Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.*, 195(16): 3724–3733
39. Johannes C, Majcherczyk A (2000) Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J Biotechnol* 78:193–199
40. Jönsson L., Sjöström K., Häggström I., Nyman P.O., (1995) Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. *Biochim Biophys Acta.*,1251(2):210-5.
41. Kallio JP, Auer S, Janis J, Andberg M, Kruus K, Rouvinen J, Koivula A, Hakulinen N (2009) Structure-function studies of a *Melanocarpus albomyces* laccase suggest a pathway for oxidation of phenolic compounds. *J Mol Biol* 392:895–909.
42. Karam J, Nicell J.A., (1997) Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment 69(2):141–153
43. Kiefer-Meyer, M. C., Gomord, V., O'Connell, A., Halpin, C., and Faye, L. (1996) Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco, *Gene*, 178:205-207.
44. Kumar GN, Srikumar K (2010) Thermophilic laccase from xerophyte species *Opuntia vulgaris* *Biomed. Chrom.* 256:707-711
45. Kumar, S. V. S., Phale, P. S., Durani, S., and Wangikar, P. P. (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family *Biotechnol. Bioeng.*, 83:386-394.
46. Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S (2003) Laccase catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromol Biosci* 3:758–764
47. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 *Nature* 227:680-685
48. LaFayette, P. R., Eriksson, K.-E. L., and Dean, J. F. D. (1999) Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*), *Plant Mol. Biol.*, 40:23-35.
49. Lante A, Crapisi A, Krastanov A, Spettoli P (2000) Biodegradation of phenols by laccase immobilized in a membrane reactor, *Process Biochem.* 36:51-58

50. Lebbink J.H., Eggen R.I., Geerling A.C., Consalvi V., Chiaraluce R., Scandurra R., de Vos W.M. (1995) Exchange of domains of glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and the mesophilic bacterium *Clostridium difficile*: effects on catalysis, thermoactivity and stability. *Protein Eng.* 8:1287–1294
51. Lee, S.-K., George, S. D., Antholine, W. E., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I. (2002) Nature of the Intermediate Formed in the Reduction of O₂ to H₂O at the Trinuclear Copper Cluster Active Site in Native Laccase *J. Am. Chem. Soc.* 124:6180-6193.
52. Leite O.D., Lupetti K.O., Fatibello-Filho O., Vieira I.C., de Barbosa A.M. (2003) Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccaseperoxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. *Talanta*, 59:889–96.
53. Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuzewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiol* 41:185-227
54. Li D., Pang Z., Chen X., Luo L., Cai Y., Wei Q., 2014, A catechol biosensor based on electrospun carbon nanofibers *Beilstein J. Nanotechnol.* 5:346–354.
55. López J., Hernández-Alcántara J.M., Roquero P., Montiel C., Shiraid K., Gimeno M., Bárzana E., (2013) *Trametes versicolor* laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material. *J. Mol. Catal.* 97:100-105
56. Machczynski MC, Vijgenboom E, Samyn B, Canters GW (2004) Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Prot Sci* 13:2388–2397.
57. V. Madhavi and S. S. Lele, (2009) Laccase: properties and applications, *BioResources*, 4(4)1694–1717
58. Madzak C, Mimmi MC, Caminade E, Brault A, Baumberger S, Briozzo P, Mougin C, Jolival C (2006) Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. *Protein Eng Des Sel* 19:77–84.
59. Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, Henriques AO, (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J Biol Chem*, 277:18849–18859.
60. Martins LO, Durão P, Brissos V, Lindley PF. (2015) Laccases of prokaryotic origin: enzymes at the interface of protein science and protein technology. *Cell Mol Life Sci.* 72(5):911-22

61. Mikuni J., Morohoshi N., (1997) Cloning and sequencing of a second laccase gene from the white-rot fungus *Coriolus versicolor*, FEMS Microbiol. Lett. 155(1):79-84.
62. Miltona R., Minteera S., (2014) Investigating the Reversible Inhibition Model of Laccase by Hydrogen Peroxide for Bioelectrocatalytic Applications, J. Electrochem. Soc. 161(13):3011-3014
63. Miyazaki K (2005) A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. Extremophiles 9:415–425
64. Moya R, Hernandez M, Garcia-Martin AB, Ball AS, Arias ME (2010) Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. Bioresour Technol 101:2224–2229
65. Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI. Biochemistry (Mosc)., (2007), "Blue" laccases Oct;72 10:1136-50.
66. Omura, T, (1961) isolation and partial nucleotide sequence of the laccase gene from *Eurospora crassa*: Amino acid Sequence homology of the protein to human ceruloplasmin J. Biochem. (Tokyo), 50:264-272.
67. Pearce C.I., Lloyd J.R., Guthrie J.T. (2003) The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: A review. Dyes Pigments. 58:179–96.
68. Piontek K., Antorini M., and Choinowski T. (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. J. Biol. Chem., 277: 37663-37669
69. Pogni R. Baratto M.C, Sinicropi A, Basos R i; (2015) Spectroscopic and computational characterization of laccases and their substrate radical intermediates 72(5)++ 885-896
70. Quintanar L, Yoon J, Aznar CP, Palmer AE, Andersson KK, Britt RD, Solomon EI. (2005) Spectroscopic and electronic structure studies of the trinuclear Cu cluster active site of the multicopper oxidase laccase: Nature of its coordination unsaturation. J Am Chem Soc. 127:13832–13845
71. Ramasamy R. P., Luckarift H. R., Ivnitski D. M., Atanassov P. B., Johnson G.R, (2010) High electrocatalytic activity of tethered multicopper oxidase-carbon nanotube conjugates. Chem. Commun., 46: 6045-7.
72. Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A.-M., and Goffner, D. (1999) Biochemical

characterization, molecular cloning and expression of laccases – a divergent gene family – in poplar Eur. J. Biochem., 259:485-495.

73. Reinhammar BR, Vänngård TI. (1997) The electron-accepting sites in *Rhus vernicifera* laccase as studied by anaerobic oxidation-reduction titrations. Eur J Biochem 18(4):463-8.
74. Reiss R, Ihssen J, Thöny-Meyer L (2011) *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum BMC Biotechnology 2011, 11:9
75. Rowland J. L. y Niederweis M. (2013). A Multicopper Oxidase Is Required for Copper Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. 195(16):3724–3733.
76. Ruijsenaars HJ, Hartmans S (2004) A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. Appl Microbiol Biotechnol 65:177–182
77. Shin, W., Sundaram, U. M., Cole, J. L., Zhang, H. H., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I. (1996) Chemical and Spectroscopic Definition of the Peroxide-Level Intermediate in the Multicopper Oxidases: Relevance to the Catalytic Mechanism of Dioxxygen Reduction to Water J. Am. Chem. Soc. 118:3202-3215
78. Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A. I., Whittaker, J. W., and Gorton, L. (2005) Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrode. Biosens. Bioelectron. 20:2517-2554.
79. Singh, R. P., Singh, P. K., Singh, R. L., (2014) Bacterial Decolorization of Textile Azo Dye Acid Orange by *Staphylococcus hominis* RMLRT03. Toxicol Int, 21(2), 160–166.
80. Sjöblad RD, Bollag JM (1981) Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms. Soil biochemistry 5:113–152
81. Skalova T, Dohnalek J, Ostergaard LH, Osteryaard PR, Kolenko P, Duskova J, Stepankova A, Hasek J (2009) The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases. J Mol Biol 385:1165–1178.
82. Solano F, Garcia E, Perez D, Sanchez-Amat A, (1997) Isolation and characterization of strain MMB-1 (CECT 4803), a novel melanogenic marine bacterium. Appl Environ Microbiol, 63:3499–3506
83. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE (1996) Multicopper Oxidases and Oxygenases. Chem Rev. 96(7):2563-2606.

84. Sondhi S, Sharma P, Saini S, Puri N, Gupta N (2014) Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkalstable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. PLoS One 9:e96951
85. Sterjiades, R., Dean, J. F. D., and Eriksson, K.-E. L., (1992) Laccase from sycamore maple (*Acer psuedoplatanus*) polymerizes monolignols Plant Physiol., 99:1162-1168.
86. Suzuki T, Endo K, Ito M, Tsujibo H, Miyamoto K, Inamori Y (2003) A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67:2167–2175.
87. Verma A, Shirkot P, (2014) Purification and Characterization of Thermostable Laccase from Thermophilic *Geobacillus thermocatenuatus* MS5 and its applications in removal of Textile Dyes Sch. Acad. J. Biosci., 2(8): 479-485
88. Waldner R., Leisola M.S.A. y Fiechter A. (1988). Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi Appl Microbiol Biotechnol, 29: 400. doi:10.1007/BF00265826
89. Xu, F. (1996) Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins Biochemistry, 35:7608-7614
90. Xu, F., Berka, R. M., Wahleithner, J. A., Nelson, B. A., Shuster, J. R., Brown, S. H., Palmer, A. E., and Solomon, E. I. (1998) Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. Biochem. J., 334:63-70.
91. Xu J.Z., Zhang J.L., Hu K.H., Zhang W.G., (2013) The relationship between lignin peroxidase and manganese peroxidase production capacities and cultivation periods of mushrooms. Microb Biotechnol. 6(3):241-7.
92. Yang Z, Pattamana K, Molino BF, Haydar SN, Cao Y, Bois F, Maeng JH, Hemenway MS, Rich JO, Khmel'nitsky YL, Friedrich TD, Peace D, Michels PC (2009) Novel Oxidation of cyclosporin A: preparation of cyclosporin methyl vinyl ketone (Cs-MVK). Synlett 18:2935–2938
93. Yoshida H (1883) Chemistry of lacquer (urushi). J Chem Soc 43:472–486
94. Zheng W., Zhao H. Y., Zhou H. M., Xu X. X., Ding M. H., Zheng Y. F. (2010) Electrochemistry of bilirubin oxidase at carbon nanotubes. J. Solid State Electrochem., 14: 249–254.

