

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 11 / N° 12 / 2009 / 9–16

Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* (sw.: Fr.) Kreisel

César A. Preussler, Ernesto Shimizu; Laura L. Villalba; Pedro D. Zapata.

Copper laccase induction in white rot fungi *Trametes villosa* (Sw.: Fr.) Kreisel

ABSTRACT

White rot fungi hold great interest for biotechnological applications being at the same time able to produce extracellular enzymes like laccase. Laccase is a phenoloxidase with molecular weight between 60 and 80 kDa, with gene inducible expression probably reflecting the different physiological functions of the enzyme. The present work was focused on the dye oxidizing capacity of *T. villosa* BAFC 2755 in solid media (discoloration tests) and the effect of CuSO_4 as inductor on the enzyme secretion capacity and genetic expression in liquid media.

Discoloration tests in solid media showed good degrading capacity against bromophenol blue, malachite green and black liquor at low pH. Enzyme activity tests from liquid media confirmed extracellular laccase production induced with CuSO_4 . Total secreted proteins showed a significant increase in the presence of CuSO_4 . SDS-PAGE showed an increase in the protein fraction between 60 and 70 kDa. mRNA levels showed a clear increase in the presence of the inducer.

The results showed that the Cu_2^+ produced an increase on laccase activity in *Trametes villosa*. This rise could be due to an increase in the protein and mRNA

KEY WORDS: white rot fungi, *Trametes villosa*, laccase, enzyme induction, copper.

RESUMEN

Los hongos de pudrición blanca presentan interés en aplicaciones biotecnológicas y son capaces de producir enzimas extracelulares como lacasa. La lacasa es una fenoloxidasas, con peso molecular entre 60 y 80 kDa, cuya expresión génica puede ser inducible, reflejando probablemente las diferentes funciones fisiológicas de esta enzima. Este trabajo se enfoca en la capacidad oxidativa de colorantes en medio sólido de *T. villosa* (ensayos de decoloración) y en el efecto del CuSO_4 como inductor sobre la capacidad de secreción enzimática y la expresión génica de lacasa en *Trametes villosa* BAFC 2755 en medio líquido.

Los ensayos de decoloración en medio sólido mostraron una excelente capacidad degradativa frente a azul de bromofenol, verde de malaquita y licor negro a pH ácido. Los ensayos de actividad enzimática confirmaron la producción de lacasa extracelular inducible con CuSO_4 . Las proteínas totales secretadas mostraron un incremento significativo en presencia de CuSO_4 , observándose en SDS-PAGE un aumento de la fracción proteica entre 60 y 70 kDa. Los niveles de mRNA mostraron un claro incremento en presencia del inductor.

Estos resultados demuestran que el Cu^{2+} produce un incremento de la actividad lacasa en *Trametes villosa*, y que este aumento podría deberse a un aumento en la cantidad de proteína y mRNA.

PALABRAS CLAVE: Hongos de pudrición blanca, *Trametes villosa*, lacasa, inducción enzimática, cobre.

INTRODUCCIÓN

La contaminación es la introducción en un medio cualquiera de una sustancia o forma de energía con potencial para provocar daños, irreversibles o no, en el medio inicial. [1].

Recientemente han surgido aplicaciones biotecnológicas con potencial aplicación contra las fuentes de contaminación de una manera ecoeficiente, e incluyen el uso de bacterias u hongos, a menudo en combinación con procesos fisicoquímicos [2–6].

Los hongos son reconocidos por sus aptitudes superiores para producir una gran variedad de proteínas extracelulares,

ácidos orgánicos y otros metabolitos, y por su capacidad para adaptarse a medios ambientes severos, sin restricciones [7]. Más allá de la producción de tales metabolitos, los hongos han llamado la atención con creciente interés por el biotratamiento (eliminación o destrucción) de ingredientes de aguas contaminadas tales como metales, nutrientes inorgánicos y componentes orgánicos [8–11].

La lignina, un polímero heterogéneo de los tejidos vasculares de las plantas superiores, es el más recalcitrante de todos los químicos orgánicos producidos naturalmente [12, 13]. Cualquier enzima o grupo de enzimas capaces de atacar inicialmente la lignina, deben ser además de extracelulares, inespecíficas. Los hongos degradadores de

lignina son buenos productores de estas enzimas y pueden ser clasificados dentro de tres categorías basadas en el tipo de descomposición de la madera que producen: hongos de pudrición blanca, hongos de pudrición marrón y hongos de pudrición blanda [14].

Los hongos de pudrición blanca son los que presentan el principal interés para ser usados en varios procesos utilizando lignocelulosa, pero la mayoría degradan también a la celulosa y a la hemicelulosa [15–17]. Esta propiedad está basada en la capacidad de producir enzimas extracelulares con baja especificidad de sustrato capaces de degradar un amplio rango de componentes xenobióticos [18]. Las enzimas más importantes son lacasa (Lac), manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP) [15].

Algunos de los hongos de pudrición blanca producen todas estas enzimas, mientras que otros hongos producen únicamente algunas de ellas [15].

La lacasa es una fenoloxidasas, enzima que cataliza la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua [19]. A través de la utilización de ciertos compuestos redox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina [20]. Contienen átomos de cobre y se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias [21]. La actividad de estas enzimas puede ser incrementada por el uso de mediadores como el ABTS (2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico]), e intermediarios de la degradación de la lignina entre los que se encuentra el alcohol veratrílico [22–23], así como iones metálicos como Mn^{+2} para la enzima MnP y Cu^{+2} para la enzima Lac [21].

Todas las lacasas son glicoproteínas extracelulares con pesos moleculares entre 60 y 80 kDa, de los cuales entre el 15 al 20% de su peso molecular está dado por carbohidratos [24]. La lacasa fúngica (bencendiol-oxígeno oxidoreductasa) es una fenoloxidasas extracelular producida por el micelio de los hongos ligninolíticos [25].

La utilización de sistemas lacasa-mediador es una alternativa promisoriosa para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales. Entre ellos, los de blanqueo de la pulpa de papel [25], la decoloración de colorantes textiles [26] y la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos [27, 28].

La regulación de la expresión de genes de la lacasa difiere de un organismo a otro, reflejando probablemente las diferentes funciones fisiológicas de estas enzimas en los hongos. La expresión de genes de lacasa en algunos hongos puede ser estimulada por inductores, mientras que en otros, la expresión es sensible a las condiciones del medio de cultivo y es afectada por las concentraciones de nitrógeno, fuentes de carbono o presencia de oligoelementos. [29–35].

El objetivo del presente trabajo es analizar el efecto del cobre como inductor en la producción de la enzima Lacasa del hongo *Trametes villosa* (Sw.: Fr.) Kreisel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

En este estudio se utilizó el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* BAFC 2755 proveniente del cepario del Laboratorio de Biotecnología Molecular (previamente cedidos gentilmente por el Departamento de Micología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires).

Preparación de los tacos

Para la preparación de tacos se utilizaron cultivos primarios en medio agar/extracto de malta (MEA), en placas de Petri de 100 mm de diámetro, las cuales fueron inoculadas por punción con ansa aguja en el centro de la placa, con el microorganismo en estudio. Se dejó incubar durante 5–7 días a 29 ± 1 °C en estufa. Este tiempo fue suficiente para obtener la colonia destinada a la generación de tacos para la siembra de todos los experimentos.

Los tacos de agar con micelio se extrajeron a partir de los márgenes de la colonia en crecimiento con la ayuda de un sacabocados de metal, de forma cuadrangular de 36 mm² de diámetro. Los tacos obtenidos de este modo fueron utilizados para la inoculación de los medios de cultivo sólidos así como también para los medios de cultivo líquidos.

Medios de cultivo sólido

Los medios de cultivo sólidos utilizados para los ensayos fueron agar malta glucosado (AMG: extracto de malta 12,7 g/L; agar 20 g/L y glucosa 10 g/L) y agar licor negro glucosado (LN: agar 20 g/L; glucosa 10 g/L; licor negro 6,7 % v/v; pH 11 y pH 4,7). El licor negro fue obtenido en la planta piloto de la FCEQyN (UNaM) a partir de la cocción kraft de maderas de eucalipto. Los colorantes utilizados para los ensayos en los medios sólidos fueron el verde de malaquita y el azul de bromofenol a 50 µM. [36, 37]

Los ensayos en medio de cultivo líquido se llevaron a cabo en erlenmeyers de 250 mL de capacidad a los cuales se les adicionó 50 mL de medio compuesto por 12,7 g/L de extracto de malta, 0,5% de concentrado soluble de maíz y agua destilada. Estos medios fueron inoculados e incubados a 29 ± 1 °C en estufa de manera estática durante un período de tiempo comprendido entre 5, 7, 10 y 14

días, en todos los casos por duplicado. En cada uno de los días antes mencionados se procedió a la separación del micelio del medio de cultivo líquido por medio de filtración mediante Büchner, con filtros de fibra de vidrio (GF/C) previamente secados en estufa a 80 °C durante 30 minutos, en cada filtración se utilizaron 5 mL de agua destilada para enjuagar. Los sobrenadantes fueron congelados y posteriormente utilizados para la determinación de la actividad enzimática. Los micelios resultantes de la filtración fueron congelados para luego proceder a la extracción de ADN de los mismos.

Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática para lacasa se realizó a partir de los sobrenadantes congelados obtenidos por filtración. La determinación se basó en el cambio de absorbancia del sustrato DMP (2,6-dimetoxifenol) adicionado a cada muestra, evidenciado mediante la utilización de un espectrofotómetro *8500 II Techcomp* siguiendo técnicas descriptas por Mouse *et al* [38]. La actividad enzimática se expresa en Unidades Internacionales (UI): $\mu\text{moles}/\text{min} \times \text{mL}$. Una UI es equivalente a 1 μmol de producto formado o sustrato degradado, por minuto.

Medición de proteínas totales

Para la medición de las proteínas totales de las muestras se utilizó la técnica de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Electroforesis en poliacrilamida

Las proteínas procedentes de los filtrados fueron separadas por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 150 V por 45 min en geles con una concentración del 10 % en poliacrilamida utilizando el sistema MiniProtean 3D de Biorad. Los resultados se visualizaron mediante tinción con plata y se registraron mediante Scanner HP Deskjet F300 All-in-One series.

Extracción de ADN

Para proceder a la extracción del DNA se utilizaron los micelios congelados que fueron obtenidos anteriormente por medio del filtrado de los medios líquidos. Estos micelios fueron trozados y macerados con nitrógeno líquido hasta obtener un fino polvo. Luego se procedió a la digestión durante 45 a 60 minutos a 65 °C en buffer conteniendo TrisHCl 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, SDS 1 %, CTAB 1 % y proteinasa K 0,1 mg/mL. Se purificó con

cloroformo-isoamílico 24:1 y acetato de potasio 3 M frío, para posteriormente precipitarlo con isopropanol y etanol al 70 %. Luego de redisolverlo en agua destilada estéril, se lo conservó a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Para corroborar la calidad, el material genético fue evaluado mediante espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

Aislamiento de RNA total

Para el aislamiento de RNA total el micelio filtrado se lavó 2 veces con Tris 0,1 M, EDTA 0,02 M en frío y posteriormente se digirió 20 min con buffer de lisis (GuSNC 4 M, Tris 0,1 M, EDTA 0,02 M Tritón X 100 1 %) disgregando el micelio con varilla estéril en frío. Posteriormente se purificó con fenol saturado en TE y cloroformo. Las proteínas se precipitaron con acetato de potasio 3 M y el RNA fue precipitado con isopropanol, lavado con etanol absoluto, secado y resuspendido en agua estéril libre de RNasas. Para corroborar la calidad del RNA aislado se realizaron geles de agarosa al 0,8 %.

RT

La retrotranscripción se realizó en un volumen de 20 μl utilizando 1 μl de Oligo (dT), dNTP's 5 mM, 40u/ μl de RNAsin y 1000 U de la enzima MMLV (Fermentas SRL) siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo durante 60 min a 42 °C. Todas las muestras fueron previamente digeridas con RQ1 DNAsa 1 μl por μg de RNA.

Amplificación de un fragmento génico por medio de la técnica PCR

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR) se utilizaron 10 pmoles de cada cebador (sentido y antisentido), 10 mM de dNTPs, 1,5 mM de Cl_2Mg y 1 U de Taq Polimerasa en buffer al 1 x, además de agua deionizada para llevar a volumen de reacción deseado. El programa de ciclado utilizado fue el siguiente: un ciclo a 94 °C por 2 min; 35 ciclos de 15 s a 94 °C, 56 °C y 72 °C respectivamente, y finalmente 2 min a 72 °C como paso de finalización de la reacción. Los resultados de la amplificación fueron corroborados por electroforesis en geles de agarosa a una concentración del 2 % utilizando una cuba electroforética (Sub System 70 de Labnet International Inc.), teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt) y fotografiados con cámara digital marca ACER.

Los cebadores utilizados en esta técnica fueron los publicados por D'Souza *et al.*, 1996, para las lacasas de otros basidiomicetes [39]:

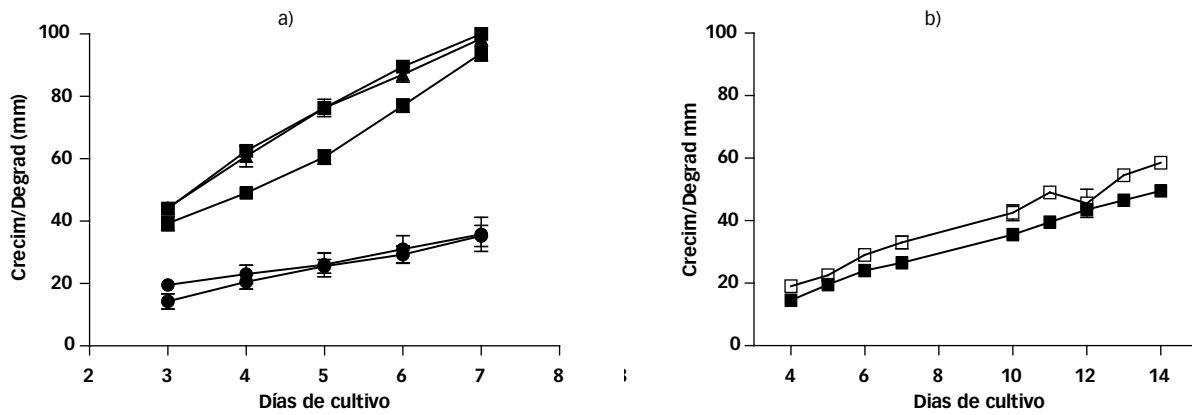


FIGURA 1: Referencias: a) Curva de crecimiento-decoloración en medio agar malta glucosado, (■) decoloración en presencia de azul de bromofenol, (□) crecimiento en presencia de azul de bromofenol, (●) decoloración en presencia de verde de malaquita, (○) crecimiento en presencia de verde de malaquita, (▲) crecimiento en ausencia de colorantes. b) Curva de crecimiento (■) y decoloración (□) en medio sólido con licor negro a pH ácido. En todos los casos las mediciones fueron tomadas entre los días 3 y 14. Se grafica el promedio de dos experimentos similares realizados por duplicado.

LacA – sentido 5' – CAYTGGCAYGGNTTYTTYCA

LacA – antisentido 5' – RTGRCTRTGRTACCARAANGT

Las bandas amplificadas con los cebadores degenerados fueron purificadas, secuenciadas y analizadas mediante el programa BLASTn.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para verificar la capacidad oxidativa del hongo *Trametes villosa*, se realizaron primeramente ensayos de decoloración en medio sólido. Estos experimentos mostraron una excelente capacidad degradativa de *Trametes villosa* frente a azul de bromofenol, verde de malaquita (Figura 1 A) y licor negro a pH ácido (Figura 1 B).

El crecimiento en presencia de azul de bromofenol fue similar al del control sin colorante, mientras que en el caso del verde de malaquita se observó una notable inhibición del crecimiento respecto al control desde el 3° día de crecimiento ($p < 0,001$). Sin embargo, solo el azul de bromofenol permitió distinguir diferencias significativas entre crecimiento y degradación a los primeros días de cultivo ($p < 0,01$), desapareciendo estas diferencias al 7° día, probablemente debido a la confluencia de placa.

En el ensayo realizado con el efluente licor negro tanto el crecimiento como la degradación mostraron diferencias significativas respecto al control ($p < 0,1$).

Estos resultados son comparables a los mencionados en trabajos anteriores por nuestro grupo de investigación

utilizando otras especies de hongos de pudrición blanca, *Ganoderma applanatum* [36] y *Peniophora* spp [37] como así también en trabajos llevados a cabo por Haglund *et al.*, 2002 [40].

Los resultados de decoloración en medio sólido conteniendo licor negro solo mostraron decoloración en condiciones ácidas indicando que el pH es uno de los parámetros a considerarse en el escalado al aplicar este hongo a desechos industriales.

Los ensayos de actividad enzimática para lacasa confirmaron que *T. villosa* produce lacasa de manera extracelular con un máximo de 81 U/L a los 10 días de cultivo sin estimulación en medio líquido malta glucosado. Al suplementar el medio con 1 mM de CuSO_4 se produjo un incremento de la actividad enzimática, alcanzando valores 10 veces superiores en comparación con el obtenido en condiciones sin inductor a iguales tiempos de cultivo (Figura 2).

Otros hongos también muestran inducción de la actividad lacasa en presencia de cobre. Mouso *et al.*, 2003 [38], observaron un incremento de la actividad lacasa en el hongo de pudrición blanca *Stereum hirsutum*, utilizando CuSO_4 . Otros resultados concordantes en cuanto al aumento de la actividad enzimática de lacasa también han sido descriptos por Haglund *et al.*, 2002 [40], con el hongo

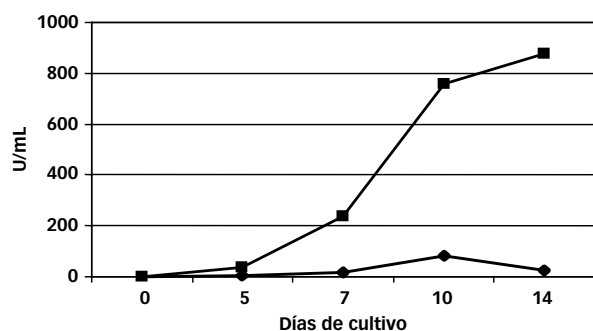


FIGURA 2: Niveles de actividad enzimática de Lacasa en función del tiempo en presencia (■) y ausencia (●) del 1 mM de CuSO_4 .

Trametes trogii. En contraposición a nuestros resultados, trabajos llevados a cabo por Gómez Dorado *et al.*, 2005 [41], no han podido correlacionar el efecto del CuSO_4 como inductor de la actividad enzimática de lacasa en el hongo *Trametes versicolor*, atribuyendo dicha observación a la naturaleza del efluente utilizado en su trabajo además de la presencia de otras enzimas con actividad oxidativa como manganeso peroxidasa (MnP).

Existe evidencia de la presencia de promotores sensibles a metales en genes de enzimas ligninolíticas [31, 33]. Sin embargo, los metales también pueden actuar estabilizando el mensajero o activando el procesamiento, tráfico y plegamiento proteico [42]. Algunos trabajos sugieren la presencia de isoenzimas de lacasa de respuesta diferencial ante iones metálicos. Yaver *et al.*, 1995, han reportado dos isoenzimas correspondientes a lacasa, de unos 63 kDa, una de expresión constitutiva y la otra de expresión inducible [33]; mientras que Han *et al.*, 2005, en *Trametes versicolor*, solo han podido aislar una lacasa constitutiva de un tamaño aproximado a los 97 kDa [43].

Para determinar el comportamiento de los hongos estudiados, se evaluó el efecto del agregado de CuSO_4 sobre las proteínas secretadas y sobre el mRNA.

Los niveles de proteínas totales secretadas mostraron un incremento significativo en presencia de CuSO_4 (Figura 3A). Al visualizarse este incremento en geles de SDS-PAGE se observa un aumento de la fracción proteica comprendida entre 60 kDa y 70 kDa aproximadamente, rango de peso dentro del cual se encuentran las isoenzimas de lacasa publicadas en la literatura (Figura 3 B).

Para evaluar los niveles de mRNA producidos se utilizaron cebadores degenerados para lacasa y se ajustaron las condiciones de la RT-PCR utilizando diferentes cantidades de RNA total de partida de modo que permita diferenciar un cambio de expresión del mensajero buscado. Para verificar si el producto de amplificación correspondía efectivamente a un fragmento del gen de lacasa se aisló DNA, se ampli-

ficó, secuenció y analizó mediante el programa BLASTn, comprobándose una homología del 80 % con la secuencia génica L49376 publicada para lacasa de *Trametes villosa* (clon LCC1).

Secuencia obtenida:

**TCGTGACCAGTGCCCGATCTCGCTCGGGNA-
ATTGTTCTGTGACAAATTTCCCGGTTCTT-
GACCAGGCNNGTAAGNGCGCCTCGTA**

El análisis de los productos de amplificación obtenidos partiendo de DNA y RNA mediante el uso de estos cebadores degenerados también permitió visualizar el intrón de 50 pb publicado por Yaver *et al.*, 1995 (datos no mostrados). [33].

Una vez comprobada la identidad del amplicón hallado, para la técnica de RT-PCR se utilizaron las muestras de RNA total extraídas correspondientes a los días 5, 7, 10 y 14 de cultivo con y sin tratamiento con CuSO_4 1mM visualizándose un claro incremento en la producción de mensajeros ante la presencia del inductor desde el día 5, e intensificándose a días posteriores de cultivo. (Figura 4)

CONCLUSIONES

Los ensayos de decoloración en medio sólido demostraron ser un método eficiente para develar la capacidad degradativa del hongo estudiado.

Los ensayos de actividad enzimática confirmaron que el hongo *Trametes villosa* BAFC 2755 produce una enzima lacasa extracelular inducible con CuSO_4 . Las proteínas totales secretadas mostraron un incremento significativo en presencia de CuSO_4 , observándose en SDS-PAGE un aumento de la fracción proteica entre 60 y 70 kDa. Los niveles de mRNA mostraron un claro incremento en presencia del inductor.

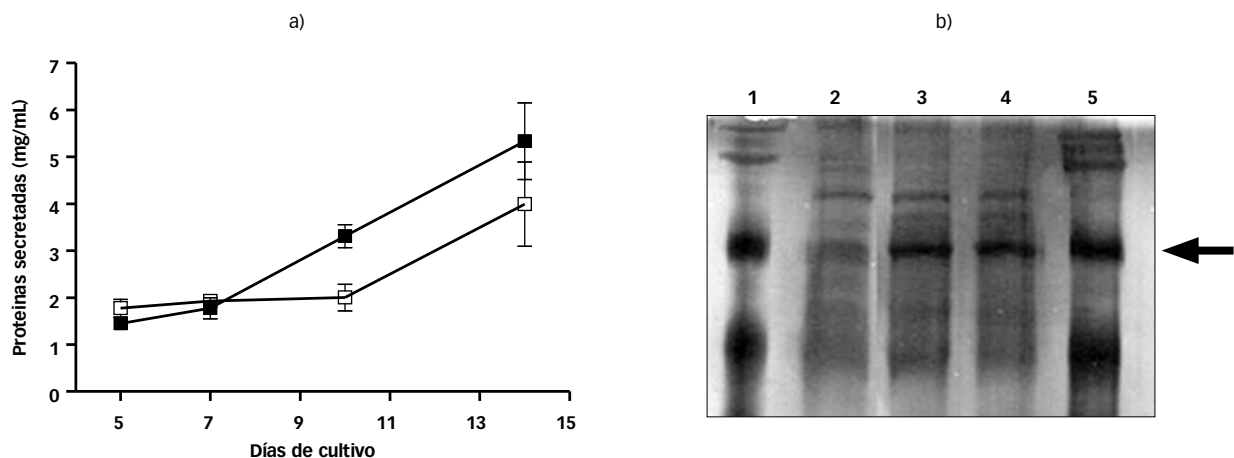


FIGURA 3: Referencias: a) proteínas totales en función del tiempo en presencia (■) y ausencia (□) de 1 mM de CuSO_4 ; b) SDS-PAGE. Carril 1 y 5: marcador de peso molecular; carril 2 sin CuSO_4 ; carril 3 y 4 con 1 mM de CuSO_4 . La flecha indica la banda correspondiente a 78 kDa aproximadamente. En todos los carriles se colocaron 20 μg de proteínas.

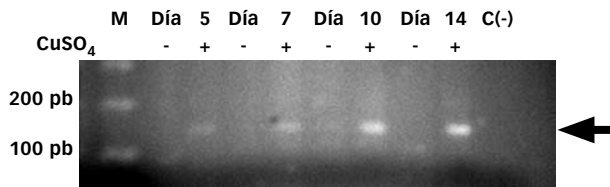


FIGURA 4: RT-PCR para un fragmento del gen lacasa. Las reacciones fueron llevadas a cabo con 3 μ g de RNA total de partida aislado de cultivos de 5, 7, 10 ó 14 días con (+) o sin (-) tratamiento de 1 mM de CuSO₄. Referencias: M: marcador de peso molecular, C(-): control negativo (sin RNA). La flecha indica el amplícón de 150 pb esperado.

Estos resultados promisorios son un punto de partida para iniciar estudios que contemplen las aplicaciones de producción de la enzima lacasa a partir de hongos de pudrición blanca utilizando el cobre como inductor de su producción.

BIBLIOGRAFÍA

- NEVEL B., WRIGTH R. Ciencias Ambientales. Banco Mundial. *La Contaminación Ambiental en la Argentina: Temas y Opciones para su Gestión*. Editorial Prentice Hall, 1999.
- MCMULLAN G., MEEHAN C., CONNELLY A., KIRBY N., ROBINSON T., NIGAM P., ET AL. *Mini-review: microbial decolorisation and degradation of textile dyes*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: p81–87, 2001.
- ROBINSON T., MCMULLAN R., NIGAM P. *Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative*. Bioresour Technol 77: p247–255, 2001.
- BORCHERT M., LIBRA J.A. *Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus Trametes versicolor in sequencing batch reactors*. Biotechnol. Bioeng. 75: p. 313–321, 2001.
- BEYDILLI M.I., PAVLOSTATHIS S.G., TINCHER W.C. *Decolorization and toxicity screening of selected reactive azo dyes under methanogenic conditions*. Water Sci. Technol.; 38: p. 225–232, 1998.
- ZISSI U., LYBERATOS G. *Partial degradation of p-aminobenzene by a defined mixed culture of Bacillus subtilis and Stenotrophomonas maltophilia*. Biotechnol. Bioeng. 72: p. 49–54, 2001.
- BOOMINATHAN K., REDDY C.A. *Fungal degradation of lignin: biotechnological applications*. In: Handbook of applied mycology. Vol. 4, p. 763–822. Ed. Arora D.K., Elander R.P., Mukerji K.G. Marcel Dekker, New York, 1992.
- MURUGESAN K. *Bioremediation of paper and pulp mill effluents*. Indian J. Exp. Biol. 41: p. 1239–48, 2003.
- MACHADO K.M.G., MATHEUS D.R., BONONI B.L.R. *Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi*. Braz. J. Microbiol. 36: p. 246–252, 2005.
- PALMA C., MOREIRA M.T., MIELGO I., FEIJOO G., LEMA J.M. *Use of a fungal bioreactor as a post treatment step for con-*

tinuous decolorisation of dyes. Wat. Sci. Technol. 40: p. 131–136, 1999.

- COULIBALY L., NAVEAU H., AGATHOS S.N. *A tanks-in-series bioreactor to simulate macromolecule-laden wastewater pretreatment under sewer conditions by Aspergillus niger*. Wat. Res. 36: p. 3941–3948, 2002.
- HÜTTERMANN A., MAI C., KHARAZIPOUR A. *Modification of lignin for the production of new compounded materials*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: p. 387–94, 2001.
- ERIKSSON K.E, BLANCHETTE R.A, ANDER P. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer. Berlín. New York, p. 20, 1990.
- LEONOWICZ A., MATUSZEWSKA A., LUTEREK J., ZIEGENHAGEN D., WOJTA WASILEWSKA M., CHO N.S., HOFRICHTER M., ROGALSKI J. *Biodegradation of lignin by white rot fungi*. Fungal Genet. Biol. 27: p. 175–85, 1999.
- WESENBERG D., KYRIAKIDES I., AGATHOS N.S. *White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents*. Biotechnol. Adv. 22: p. 161, 2003.
- MARTÍNEZ A.T., SPERANZA M., RUIZ DUEÑAS F.J., FERREIRA P., CAMARERO S., GUILLÉN F., MARTÍNEZ M.J., GUTIÉRREZ A., DEL RÍO J.C. *Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin*. Int. Microbiol. 8: p. 195–204, 2005.
- SHAH V., NERUD F. *Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization*. Can. J. Microbiol. 48: p. 857–870, 2002.
- LUND M., RAGAUSKAS A.J. *Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: p. 699–703, 2001.
- GIANFREDA L., XU F., BOLLAG J.M. *Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes*. Biorem. J. 3: p. 1–25, 1999.
- CAMBRIA M.T., MINNITI Z., LIBRANDO V., CAMBRIA A. *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Rigidoporus lignosus and its laccase in the presence of redox mediators*. Appl. Biochem. Biotechnol. 149: p. 1–8, 2008.
- GALHAUP C., HALTRICH D. *Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus Trametes pubescens in the presence of copper*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: p. 225–232, 2001.
- HAN M.J., CHOI H.T., SONG H.G. *Degradation of phenanthrene by Trametes versicolor and its laccase*. J. Microbiol. 42: p. 94–98, 2004.
- MAJCHERCZYK A., JOHANNES C., HÜTTERMANN A. *Oxidation of aromatic alcohols by laccase from Trametes versicolor mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: p. 267–276, 1999.
- LEONOWICZ A., CHO N.S., LUTEREK J., WILKOLAZKA A., WOJTAS WASILEWSKA M., MATUSZEWSKA A., HOFRICHTER M., WESENBERG D., ROGALSKI J. *Fungal laccase: properties and activity on lignin*. J. Basic. Microbiol. 41: p. 185–227, 2001.
- MAYER A.M., STAPLES R.C. *Laccase: new functions for an old enzyme*. Phytochemistry 60: p. 551–65, 2002.

26. REYES P., PICKARD M.A., VAZQUEZ DUHALT R. *Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dye decolorization by immobilized laccase*. Biotechnol. Lett. 21: p. 875–880, 1999.
27. RODRÍGUEZ E., PICKARD M.A., VAZQUEZ DUHALT R. *Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi*. Curr. Microbiol. 38: p. 27–32, 1999.
28. BOHMER S., MESSNER K., SREBOTNIK E. *Oxidation of phenantrene by fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244: p. 233–238, 1998.
29. BALDRIAN P. *Fungal laccases – occurrence and properties*. FEMS Microbiol. Rev. 30: p. 215–242, 2005.
30. VANDERTOL VANIER H.A., VAZQUEZ DUHALT R., TINOCO R., PICKARD M.A. *Enhanced activity by poly (ethylene glycol) modification of Coriolopsis gallica laccase*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 29: p. 214–220, 2002.
31. ZHENG Z., OBBARD J.P. *Regulation of laccase gene transcription in Trametes versicolor*. Enzyme Microb. Technol. 31, p. 3–9, 2002.
32. MANSUR M., SUÁREZ T., GONZÁLEZ A.E. *Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197)*. Appl. Environ. Microbiol. 64: p. 771–774, 1998.
33. YAVER D.S., XU F., GOLIGHTLY E.J., BROWN K.M., BROWN S.H., REY M.W., SCHNEIDER P., HALKIER T., MONDORF K., DALBOGE H. *Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete Trametes villosa*. Appl Environ Microbiol 62: 834–841, 1996.
34. SMITH M., SHNYREVA A., WOOD D.A., THURSTON C.F. *Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes lcc1 and lcc2 in the cultivated mushroom Agaricus bisporus*. Microbiology 144: p. 1063–1069, 1998.
35. WOLFAARDT F., TALJAARD J.L., JACOBS A., MALE J.R., RABIE C.J. *Assessment of wood-inhabiting Basidiomycetes for biokraft pulping of softwood chips*. Bios Technol 95: p25–30, 2004.
36. SHIMIZU E. *Biodegradación de contaminantes de la industria papelera por el hongo Ganoderma applanatum*. Tesina de grado para optar al título de Licenciado en Genética. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM, 2006.
37. VELEZ RUEDA J.O. *Caracterización bioquímica de la enzima lacasa de la cepa Peniophora sp. BAFC 633 para su potencial aplicación en procesos de biorremediación*. Tesina de grado para optar al título de Licenciado en Genética. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM, 2007.
38. MOUSO N., PAPINUTTI L., FORCHIASSIN F. *Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por Stereum hirsutum (Willd) Pers*. Rev. Iberoam. Micol. 20: p. 176–178, 2003.
39. D'SOUZA T.M., BOOMINATHAN K., REDDY C.A. *Isolation of lacasse gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR*. Appl. Environ. Microbiol. 62: p. 3739–3744, 1996.
40. HAGLUND C., LEVÍN L., FORCHIASSIN F., LÓPEZ M., VIALE A. *Degradation of environmental pollutants by Trametes trogii*. Rev. Argent. Microbiol. 34: p. 157–62, 2002.
41. GÓMEZ DORADO C., MARTÍNEZ SALGADO M., NIETO MOSQUERA D., PEDROSA RODRÍGUEZ A., RODRÍGUEZ VÁZQUEZ R., ROSAS ACOSTA J. *Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn-Peroxidasa y Lacasa producidas por Trametes versicolor y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera*. UNIVERSITAS SCIENTARIUM. Revista de la Facultad de Ciencias 10: p. 37–45, 2005.
42. LODISH, BERK, ZIPURSKY, MATSUDAIRA, BALTIMORE, DARNELL. *Biología Celular y Molecular 4ª edición*. Editorial Panamericana. Buenos Aires, 2001.
43. HAN M.J., CHOI H.T., SONG H.G. *Purification and characterization of laccase from the white rot fungus Trametes versicolor*. J. Microbiol. 43: p. 555–60, 2005.

Recibido: 13/02/08,

Aprobado: 17/07/09

- Cesar Adrian Preussler.
Licenciado en Genética graduado en la Universidad Nacional de Misiones. Es becario del CEDIT. Posee presentaciones a congresos nacionales e internacionales.
- Ernesto Shimizu.
Licenciado en Genética graduado en la Universidad Nacional de Misiones. Es ex-becario del CEDIT y de la FCEQyN. Actualmente realiza estudios de doctorado mediante una beca. Agencia en el INTA EEA Balcarce. Posee presentaciones a congresos nacionales e internacionales.
- Pedro Darío Zapata.
Doctor por la Universidad de Alcalá de Henares, en el programa Biomedicina. Profesor Regular Adjunto en las Cátedras de Biología Celular y Molecular (Bioquímica), Genética Molecular (Lic. en Genética), Biología Celular (Lic. en Genética) y Biotecnología Molecular (Ingeniería Química, Bioquímica y Farmacia). Posee actualmente la Categoría III en el Sistema Nacional de Incentivos a los Docentes-Investigadores. Se desempeña además como Director y Co-Director de proyectos Incentivados y Subsidiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.
- Laura L. Villalba.
PhD de la State University of New York, College of Environmental Science and Forestry. Profesor adjunto de los cursos Pulpados Químicos y Operaciones Fundamentales en la fabri-

cación de la Pulpa y el Papel (Maestría en Ciencias de la Madera, Pulpa y Papel), Cátedras de Coloquio I, II, Organización Industrial y relaciones laborales (Tecnicatura Universitaria en Celulosa y Papel), Transferencia de masa (Ingeniería en Alimentos), Operaciones de Transferencia de masa (Ingeniería Química). Categoría III en el Sistema Nacional de Incentivos a los Docentes-Investigadores. Se desempeña además como

Directora y Co-Directora de proyectos Incentivados y Subsidios por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.

Laboratorio de Biotecnología Molecular (BIOTECMOL), Módulo de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM. Posadas, Misiones, Argentina. Av. Mariano Moreno 1375 (3300). bcmb@fceqyn.unam.edu.ar.