

RECYT

Año 18 / Nº 26 / 2016 / 4–10

Efecto de iones metálicos y compuestos aromáticos sobre la actividad lacasa en *Trametes* sp. nativo de Misiones

Effect of metal ions and aromatic compounds on laccase activity in *Trametes* sp. native of Misiones

Laura E. Ortellado^{1,*}, María I. Fonseca¹, Mónica L. Barchuk¹,
Silvana S. Sawostjanik Afanasiuk¹, Laura L. Villalba¹, Pedro D. Zapata¹

1- Laboratorio de Biotecnología Molecular (Biotecmol). Instituto de Biotecnología Misiones "Dra. María Ebe Reca" (InBioMis). Universidad Nacional de Misiones - Ruta 12 Km 7 ½ (3300) Posadas – Misiones.

*E-mail: biotecmol2010@gmail.com

Resumen

Los hongos de pudrición blanca secretan enzimas oxidativas, como la lacasa, con capacidad de intervenir en procesos amigables con el medioambiente, tales como la biorremediación. El objetivo del presente trabajo fue formular un medio de cultivo suplementado con compuestos aromáticos e iones metálicos con el fin de aumentar los valores de actividad lacasa expresados por *Trametes* sp. cepa A. Utilizando un diseño de Plackett-Burman se logró establecer que el Mn²⁺ fue la única variable que tuvo un efecto significativo positivo sobre la actividad. La mayor actividad lacasa (272,46 U/L) se obtuvo a una concentración de 1,5 mM de Mn²⁺ y la máxima biomasa (0,1272 g) a una concentración de 4 mM de Mn²⁺. Asimismo fue posible establecer una correlación negativa entre la actividad enzimática y el crecimiento del hongo. Se encontró una isoenzima de 60 kDa de expresión constitutiva y otra de 100 kDa inducible en presencia de 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 mM de Mn²⁺.

Palabras clave: Actividad lacasa; Hongos de pudrición blanca; *Trametes*; Isoenzimas.

Abstract

The white rot fungi secrete oxidative enzymes, such as laccase, with a capacity to play a part in environmentally friendly processes such as bioremediation. The aim of this study was to develop a culture medium supplemented with aromatic compounds and metal ions in order to increase laccase activity produced by *Trametes* sp. strain A. By means of a Plackett-Burman design, it was shown that Mn²⁺ was the only variable that had a significant positive effect on the enzyme activity. The highest laccase activity (272.46 U / L) was obtained at a concentration of 1.5 mM Mn²⁺ and maximum biomass (0.1272 g) at a concentration of 4 mM Mn²⁺. It also was possible to establish a negative correlation between enzyme activity and growth of fungus. An isoenzyme of constitutive expression (60 kDa) and another inducible (100 kDa) were found in the presence of 2; 2.5; 3; 3.5 and 4 mM of Mn²⁺.

Keywords: Laccase activity; White-rot fungi; *Trametes*; Isozymes.

Introducción

Las aguas residuales provenientes de las industrias papeleras, se caracterizan por poseer gran cantidad de contaminantes que se generan en los procesos de pulpado y blanqueo de la pulpa. Estos factores hacen que esta industria contribuya a la polución ambiental [1].

Entre estos compuestos contaminantes se encuentran algunos que son naturales de la madera como la lignina. La lignina es un biopolímero aromático, heterogéneo, complejo; y constituye el más recalcitrante de todos los químicos orgánicos producidos naturalmente [2, 3].

La utilización de microorganismos que degradan la lignina para la solución de problemas ambientales es

una alternativa de creciente expansión e investigación en biotecnología. En este sentido un grupo de hongos denominados de pudrición blanca (del inglés "*White rot fungi*" o WRF) [4] pertenecientes a los Basidiomicetes [5] son los únicos capaces de atacar todos los componentes de la pared celular y degradar la lignina hasta CO₂ y H₂O de manera exitosa.

Las lacasas fúngicas (bencenodiol: oxígeno oxidoreductasas; EC 1.10.3.2) son un tipo de oxidasas que forman parte del sistema enzimático ligninolítico y son producidas por casi todos los basidiomicetes degradadores de madera [6]. Se trata de una de las principales enzimas implicadas en la deslignificación del material lignocelulósico [7]. Tal es su importancia que, en ocasiones, se ha descrito

la presencia de lacasa como única actividad ligninolítica en hongos que degradan la lignina u otros compuestos aromáticos con gran impacto ambiental, como *Pycnoporus cinnabarinus* [8] o *Corioloropsis rigida* [9]. Las lacasas catalizan la oxidación monoelectrónica de difenoles y aminas aromáticas, eliminando un electrón y un protón del grupo hidroxilo o amino para dar lugar a un radical fenoxilo o amino, respectivamente [10].

Para la utilización de la lacasa con fines biotecnológicos y medioambientales, así como para el conocimiento de las propiedades de la enzima se requieren grandes cantidades de la proteína. La producción, secreción y actividad de la enzima lacasa pueden depender no solo del tipo de hongo sino de las condiciones nutricionales empleadas, de la presencia o ausencia de compuestos aromáticos o metálicos así como el tiempo de exposición a estos, la naturaleza y composición del medio de cultivo [11]. Una opción factible para lograr este objetivo es la optimización de los medios de cultivos. Existen numerosos métodos y diseños estadísticos que son aplicados con éxito en la optimización de diferentes sistemas en el área de la microbiología [12].

La utilización de métodos de superficie de respuesta permite disminuir el número de ensayos experimentales, se evalúa el efecto individual de los parámetros y se genera también un modelo matemático que describe el proceso global [13,14]. Entre estas metodologías se destacan los diseños de Box y Wilson, Box y Hunter, Plackett-Burman [15, 16, 17], Box-Behnken, entre otros; que se han utilizado para optimizar la producción de lacasa por hongos basidiomicetos [18, 19, 20, 21].

El objetivo del presente trabajo fue formular un medio de cultivo suplementado con compuestos aromáticos e iones metálicos principalmente para aumentar la actividad lacasa (Lac) producida en el hongo de pudrición blanca *Trametes* sp. cepa A. Asimismo se evaluó el efecto de estos compuestos sobre el perfil de isoenzimas y el crecimiento del hongo utilizado.

Materiales y Métodos

Material Biológico

La cepa A del hongo de pudrición blanca *Trametes* sp. autóctono de la provincia de Misiones, proveniente del cepario de la Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Misiones, Argentina, fue el microorganismo objeto de estudio.

Medio de cultivo sólido

El medio de cultivo agar/extracto de malta (MEA) fue utilizado para la reactivación del crecimiento de la cepa, en placas de Petri de 90 mm de diámetro, cuya inoculación fue realizada mediante una punción con ansa aguja en el

centro de la placa y para la posterior obtención de los tacos de agar de 2 mm de diámetro con micelio. Este medio está compuesto por 20 g/L de agar y 12,7 g/L de extracto de malta. Los componentes fueron disueltos con agua destilada y esterilizados en autoclave a 121°C y 1 atmósfera durante 15 min.

Medio de cultivo líquido

El medio de cultivo extracto de malta/extracto soluble de maíz (ME) fue utilizado para realizar los diferentes experimentos en medio líquidos. Este medio contiene 12,7 g/L de extracto de malta y 0,5% p/v de extracto soluble de maíz y agua destilada. Todos los componentes fueron disueltos con agua destilada y se distribuyeron 25 ml en erlenmeyer de 100 ml, esterilizados en autoclave a 121°C y 1 atmósfera durante 15 min.

Efecto de compuestos aromáticos y metálicos sobre la actividad lacasa y biomasa: Diseño experimental Plackett-Burman

El diseño Plackett-Burman es una herramienta útil para estudiar n variables ($n - 3$ factores reales y variables falsas para estimar errores) en $n + 1$ experimentos, lo cual reduce el enorme número de experimentos que se deberían llevar a cabo si se trabajara con un diseño factorial 2^n completo [15, 12, 22].

En el presente estudio para analizar el efecto de compuestos metálicos Cu^{2+} (CuSO_4), Mn^{2+} (MnSO_4) y compuestos aromáticos (ácido síringico, ácido ferúlico, guayacol) sobre la actividad enzimática lacasa se utilizó un diseño de Plackett-Burman, cada variable fue evaluada en dos niveles, un nivel de presencia y otro de ausencia (Tabla 1).

Para ello el hongo fue crecido en medio ME, incubado en estufa a 29 °C de manera estática durante 11 días. Luego de 3 días de cultivo fueron suplementados con los compuestos aromáticos y metálicos en una combinación única de variables (Tabla 1).

Los niveles de cada una de las variables utilizadas en los ensayos fueron seleccionados en base a experiencias anteriores en los trabajos de Piscitelli y col. (2011); Fonseca y col. (2010); Saparrat y col. (2010); Cambria y col. (2010); Scheel y col. (2000) [11, 23, 24, 25, 26].

Posteriormente cada 2 días se procedió a retirar cuidadosamente una muestra de 700 μl del sobrenadante para medición de la actividad lacasa. Finalmente el día 11 de cultivo se separó el micelio del sobrenadante por filtración en embudo de Buchner utilizando filtros de fibra de vidrio. Los micelios fueron utilizados para la determinación de la biomasa. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 1: Variables ensayadas en el Diseño Plackett-Burman con sus respectivos niveles. Las concentraciones de los diferentes compuestos se encuentran en mM

| Variable | Variable codificada* | |
|-------------------|----------------------|------------|
| | Nivel bajo | Nivel alto |
| CuSO ₄ | -1 | +1 |
| MnSO ₄ | 0 | 0,5 |
| ácido siríngico | 0 | 0,25 |
| ácido ferúlico | 0 | 0,5 |
| guayacol | 0 | 0,5 |

Optimización de la actividad lacasa producida

En base al análisis estadístico y a los resultados obtenidos del Diseño Plackett-Burman, se seleccionó la variable que ejerció un efecto positivo sobre la actividad de la enzima lacasa. Para determinar la concentración óptima en la cual se obtiene la mayor actividad lacasa, se realizaron una serie de experimentos con diferentes concentraciones de 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 (mM) del compuesto Mn²⁺ (MnSO₄).

Caracterización bioquímica parcial de lacasas secretadas en sobrenadantes de cultivo Determinación de la actividad enzimática Lacasa

La determinación de actividad Lac (EC 1.10.3.2) se realizó empleando la técnica descrita por Field y col. (1993) [27], con 2,6- dimetoxifenol (DMP-Fluka Sigma Aldrich-Argentina) 5 mM como sustrato en buffer acetato de sodio 0,1 mM (pH 3,6). El cambio de la absorbancia se monitoreó utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-3600. La actividad enzimática se expresó en unidades enzimáticas (U), donde 1 U es equivalente a 1 mM /min de producto.

Análisis del perfil de isoenzimas lacasas secretadas en sobrenadantes de cultivo

La existencia de isoenzimas se determinó mediante electroforesis no desnaturante en geles de poliacrilamida al 7,5% p/v (ND-PAGE) [24, 28]. La corrida electroforética se realizó a 100 V por 120 min en buffer Tris-Glicina 1,5 M, pH 8,3. Los geles se fijaron en una solución conteniendo 40% v/v de metanol, 10% v/v de ácido acético, 50% de agua y fueron revelados con una solución de 2,6-dimetoxifenol 5 mM en buffer acetato de sodio 0,1 M (pH 3,6) para detectar las bandas con actividad Lac [24, 28].

El peso molecular fue estimado mediante electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) utilizando un patrón de masa molecular preteñido (*Prestained Kaleidoscope SDS-PAGE standard broad range*, de BioRad) [23, 28, 29]. La corrida electroforética se realizó a 100 V por 120 min en buffer Tris-Glicina 1,5 M, pH 8,3. Para la detección de las bandas el gel se trató previamente con una solución de acetato de sodio 50 mM y Tritón X-100 0,2% v/v durante 30 min para eliminar el SDS y permitir el replegamiento del dominio

catalítico. Luego se reveló con DMP 5 mM en buffer acetato pH 3,6 a 30°C por 10 min [24, 28].

Determinación de la Biomasa

Para determinar biomasa, el micelio presente en los sobrenadantes de los cultivos fue retenido por filtración utilizando filtros de papel de fibra de vidrio (GF/C- Sigma Aldrich-Argentina), y luego secado a 80°C por 24 h, tras lo cual se obtuvo el peso seco del micelio por diferencia de pesado [23].

Análisis Estadísticos

El análisis estadístico del Diseño Plackett-Burman se realizó utilizando Stat graphics plus de Windows 5.1 [30]. El análisis de ANOVA y el test de Bonferroni, se realizaron utilizando el programa Graphpad Prism Program versión 5.3 de Windows (www.graphpad.com).

Resultados y Discusión

El diseño de Plackett-Burman seleccionado incluyó 24 corridas experimentales en las cuales se evaluaron 8 variables (5 reales y 3 falsas). Se estudió la adición de iones metálicos: Cu²⁺ (CuSO₄), Mn²⁺ (MnSO₄) y de compuestos aromáticos: ácido ferúlico, ácido siríngico, guayacol como posibles estimuladores de la actividad enzimática lacasa.

Los mayores títulos de actividad enzimática lacasa (80,91 U/L; p< 0,001) con Mn²⁺ (MnSO₄) fueron obtenidos el día 9 para *Trametes* sp. cepa A.

Para evaluar la significancia de cada variable sobre las respuestas buscadas, se utilizó el análisis de la varianza en combinación con la prueba de Fisher con un nivel de confianza del 95% (p<0,05).

Para facilitar la visión e interpretación de los análisis estadísticos se utilizaron gráficos de Pareto. (Figura 1 y 2).

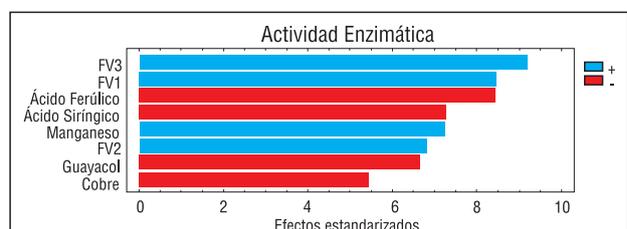


Figura 1: Gráfico de Pareto para la actividad enzimática lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes* sp. cepa A. El largo de las barras de cada gráfico es proporcional al efecto estandarizado, las barras de color fucsia y rojo representan los factores con efectos positivos y negativos sobre las variables de respuesta, respectivamente. La extensión de las barras más allá de la línea vertical representan las variables con influencia significativa sobre la respuesta analizada con un nivel de confianza del 95%. FV: Falsa variable.

El análisis de los resultados obtenidos mostró que el Mn^{2+} ($MnSO_4$) fue la variable con mayor efecto positivo en su nivel presencia ($p < 0,05$) (Figura 1) sobre la actividad enzimática lacasa, mientras que las otras variables Cu^{2+} ($CuSO_4$), ácido ferúlico, ácido siríngico, guayacol fueron significativas ($p < 0,05$) pero de forma negativa en su nivel ausencia (Figura 1). Se obtuvo un coeficiente de determinación ($R^2 = 73,88\%$) lo cual indicó que el modelo no pudo explicar el 26,11% de las variaciones.

El Mn^{2+} ($MnSO_4$) demostró ser un potenciador de la actividad enzimática, resultado que concuerda con los reportados previamente por Galhaup y Haltrich (2001) en *Trametes pubescens*, quienes observaron que únicamente el cobre y el manganeso (1 mM) incrementaron la producción de lacasa. Soden y Dobson (2001), demostraron que el manganeso actúa como un inductor de transcritos de lacasa en *Pleurotus sajor-caju* y se ha observado también un efecto similar en otros hongos [26, 31, 32].

En cuanto al crecimiento del micelio, los mayores valores de biomasa (0,0797 g; $p < 0,001$) se obtuvieron también el día 9 para *Trametes* sp. cepa A.

El análisis de los resultados obtenidos mostró que el crecimiento micelial se vio favorecido significativa y positivamente ($p < 0,05$) por la adición de Mn^{2+} ($MnSO_4$), indicando que su presencia como componente del medio de cultivo en su nivel presencia jugó un rol clave en el desarrollo del micelio. Por otro lado, las variables Cu^{2+} ($CuSO_4$), ácido ferúlico, ácido siríngico, guayacol fueron significativamente ($p < 0,05$) negativas en su nivel ausencia sobre la biomasa.

El Coeficiente de determinación ($R^2 = 64,80\%$) indicó que el modelo no pudo explicar el 35,20% de las variaciones (Figura 2).

La capacidad de las cepas fúngicas para crecer en presencia de compuestos aromáticos está directamente relacionada con la habilidad del hongo de desarrollar mecanismos y/o reacciones que favorezcan su adaptación a diversos sustratos. Entre los mecanismos pueden mencionarse diversas reacciones de transformación parcial, una completa degradación de hidrocarburos en presencia de un sustrato secundario compatible y la utilización independiente de los hidrocarburos como una única fuente de carbono para el crecimiento [33]. El efecto negativo en el crecimiento fúngico desarrollado en la cepa estudiada puede deberse a una ausencia en la capacidad de tolerar los compuestos aromáticos empleados [34].

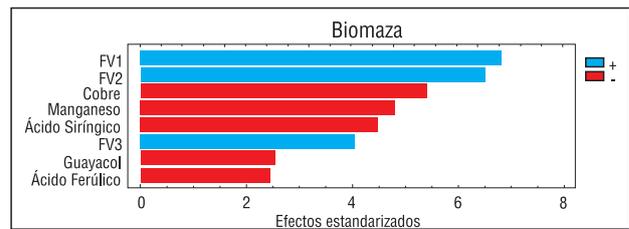


Figura 2: Gráfico de Pareto para la biomasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes* sp. cepa A. El largo de las barras de cada gráfico es proporcional al efecto estandarizado, las barras de color fucsia y rojo representan los factores con efectos positivos y negativos, respectivamente sobre las variables de respuesta. La extensión de las barras más allá de la línea vertical representan las variables con influencia significativa sobre la respuesta analizada con un nivel de confianza del 95%. FV: Falsa Variable.

Optimización de la Actividad Lacasa

En base a los resultados obtenidos del diseño de Plackett-Burman se logró identificar y seleccionar la variable Mn^{2+} ($MnSO_4$) como la única variable con efecto significativo y positivo sobre la actividad lacasa producida para *Trametes* cepa A.

Para determinar la concentración óptima en la cual se obtiene el mayor incremento de la actividad lacasa se evaluaron diferentes concentraciones: 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 (mM) de Mn^{2+} ($MnSO_4$).

Para evaluar esta variable se utilizó medio líquido ME como medio de prueba, suplementado con las diferentes concentraciones de Mn^{2+} ($MnSO_4$) cultivado a 29°C de manera estática durante 9 días.

Todos los tratamientos realizados con diferentes concentraciones de $MnSO_4$ demostraron un incremento ($p < 0,001$) en la actividad lacasa producida de *Trametes* sp. cepa A. El mayor incremento se obtuvo con la concentración de 1,5 mM ($p < 0,05$), siendo de 272,46 U/L seguido por los ensayos con 2 y 2,5 mM ($p < 0,05$) con 192,06 U/L y 195,63 U/L respectivamente. La menor actividad lacasa registrada fue en el tratamiento efectuado con 4 mM ($p < 0,05$) con 99,69 U/L (Figura 3).

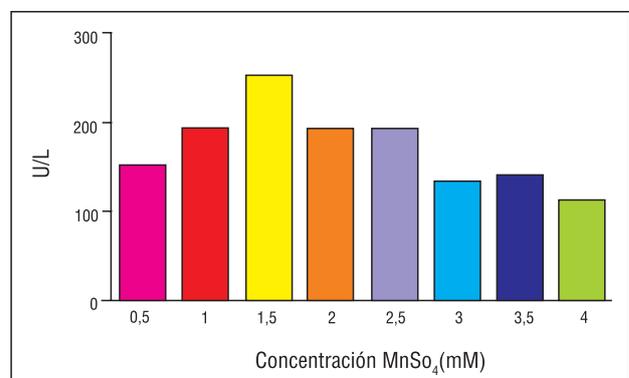


Figura 3: Gráfico de barras de los resultados obtenidos de actividad enzimática lacasa con diferentes concentraciones de Mn^{2+} ($MnSO_4$).

La determinación de biomasa en todos los tratamientos, mostró que la mayor cantidad (0,1272 g) se produjo a una concentración de 4 mM ($p < 0,05$), seguida por los ensayos con 3 y 2 mM ($p < 0,05$) obteniéndose 0,090 g y 0,088 g respectivamente. Los niveles de biomasa más bajos registrados correspondieron a los tratamientos efectuados con 1 y 1,5 mM ($p < 0,05$) con 0,038 g y 0,0363 g respectivamente (Figura 4).

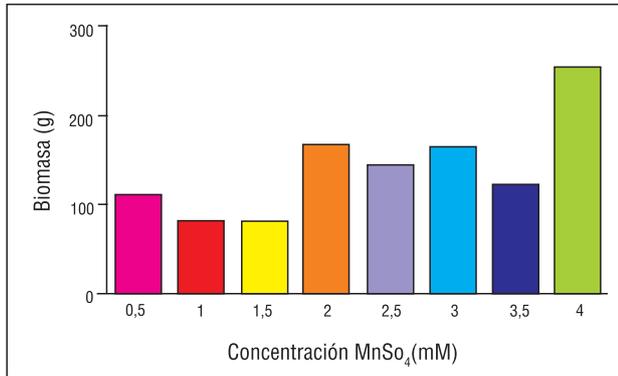


Figura 4: Gráfico de barras de los resultados obtenidos de la biomasa con diferentes concentraciones de Mn²⁺ (MnSO₄).

Del análisis de correlación entre la actividad enzimática y la biomasa pudo observarse que cuando aumentó la biomasa, disminuyó la actividad enzimática ($r = -0,7$). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el trabajo realizado por Manubens y col. (2007) en el basiomicete *Ceriporiopsis subvermispota* [35]. Otros autores también coinciden en afirmar que la producción de lacasa generalmente no está directamente relacionada con el crecimiento fúngico [36, 37].

Detección de Isoenzimas Mediante Zimografía

El perfil electroforético del zimograma reveló la presencia de una enzima presente en todos los tratamientos de mayor movilidad y otra de menor movilidad que únicamente apareció en presencia de 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 mM de MnSO₄ (Figura 5).

Para estimar el peso molecular de las isoenzimas observadas en los tratamientos realizados anteriormente, se procedió a su separación electroforética mediante SDS-PAGE y posterior detección según la técnica ya descrita previamente (ver sección materiales y métodos) (Figura 6).

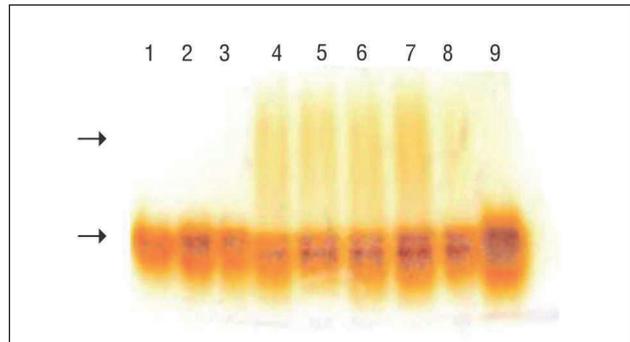


Figura 5: Zimograma de los tratamientos con diferentes concentraciones de Mn²⁺ (MnSO₄); 1: 0,5 mM; 2: 1 mM; 3: 1,5 mM; 4: 2 mM; 5: 2,5 mM; 6: 3 mM; 7: 3,5 mM; 8: 4 mM; 9: control en ausencia del compuesto. Las flechas indican las isoenzimas.

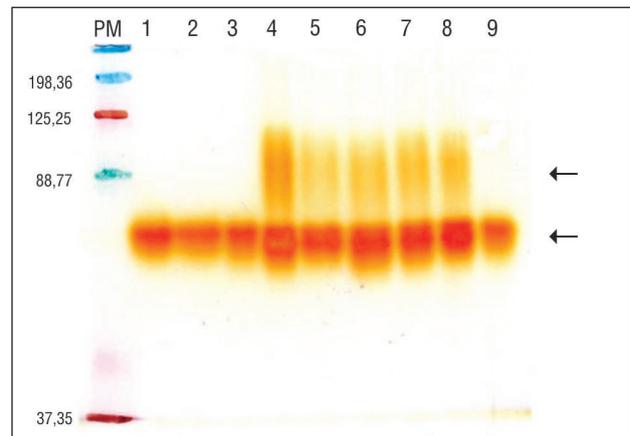


Figura 6: Estimación del peso molecular (SDS-PAGE) de isoenzimas lacasa de *Trametes* sp. cepa A en los tratamientos con diferentes concentraciones de Mn²⁺ (MnSO₄); PM: Peso molecular (kDa); 1: 0,5 mM; 2: 1 mM; 3: 1,5 mM; 4: 2 mM; 5: 2,5 mM; 6: 3 mM; 7: 3,5 mM; 8: 4 mM; 9: control en ausencia del compuesto. Las flechas indican las isoenzimas.

Se evidenció la presencia de una isoenzima de 60 kDa, presente en todos los tratamientos realizados incluyendo al control en ausencia de MnSO₄. Además fue posible visualizar una segunda isoenzima de aproximadamente 100 kDa detectada únicamente con 2; 2,5; 3; 3,5 y 4 mM de MnSO₄. Cabe destacar que esta segunda isoenzima estuvo presente en solo algunos de los tratamientos realizados, por lo que es probable que esta sea una isoenzima inducible. En concordancia con los resultados obtenidos, Palmieri y col. (2000) publicaron que la adición de MnSO₄ produce patrones isoenzimáticos diferentes de lacasas en *Pleurotus ostreatus* [38]. También la suplementación de cultivos de *Coprinus comatus* con Mn²⁺ revelaron mediante electroforesis la presencia predominante de la isoenzima Lac 1, y en los ensayos con una concentración de entre 0,3 a 1 mM de Mn²⁺ se observaron dos bandas difusas y poco claras correspondientes a las isoenzimas Lac 2 y Lac 3 [39].

Conclusiones

El hongo de pudrición blanca *Trametes* sp. cepa A

demostró ser una fuente para la producción de lacasa influenciada por la presencia de manganeso.

También fue posible determinar, que la existencia de una disminución en la biomasa conlleva al aumento de la actividad lacasa. Con los ensayos realizados en este trabajo para la determinación del perfil enzimático, se logró la caracterización del perfil de isoenzimas lacasas existente, cuyo patrón dependió de la concentración del manganeso, revelándose la presencia de dos isoenzimas, una de 60 kDa cuya expresión es constitutiva y otra de 100 kDa de expresión inducida.

Estas características evidencian en la cepa estudiada un potencial para la producción de lacasa con aplicaciones biotecnológicas y una viabilidad de realizar posteriores estudios en vistas de lograr un incremento de su producción.

Bibliografía

- Helmy, S.; Rafie, S. y Ghaly, M. *Bioremediation post-photo-oxidation and Coagulation for black liquor effluent treatment*. Desalination 158: 331-339. 2003.
- Huttermann, A.; Mai, C. y Kharazipour, A. *Modification of lignin for the production of new compounded materials*. Applied Microbiology and Biotechnology 55: 387-94. 2001.
- Eriksson, K.E.; Blanchette, R.A. y Ander, P. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer Verlag 397. 1990.
- Dedeyan, B.; Klonowska, A.; Tagger, S.; Tron, T.; Lacazio, G.; Gil, G. y Le Petit, J. *Biochemical and characterization of a laccase from Marasmius quercophilus*. Applied and Environmental Microbiology 66: 925-929. 2000.
- Pointing, S.B. *Feasibility of bioremediation by white rot fungi*. Applied Microbiology and Biotechnology 57:20-33. 2001.
- Wesenberg, D.; Kyriakides, I. y Agathos, S.N. *White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents*. Biotechnology 22: 161-187. 2003
- Mayer, A.M. y Staples, R.C. *Laccase: new functions for an old enzyme*. Phytochemistry 60: 551-565. 2002.
- Eggert, C.; Temp, U. y Eriksson, K.E. *The ligninolytic system of the white rot fungus Pycnoporus cinnabarinus, purification and characterization of the laccase*. Applied and Environmental Microbiology 62: 1151-1158. 1996.
- Saparrat, M.C.; Guillén, C.; Arambarri, F.; Martínez, A.T. y Martínez, M.J. *Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete Coriopsis rigida*. Applied and Environmental Microbiology 68: 1534-1540. 2002.
- Leonowicz, A.; Cho, N.S.; Luterek, J.; Wilkolazka, A.; Wojtas-Wasilewska, M.; Matuszewska, A.; Hofrichter, M.; Wesenberg, D y Rogalski, J. *Fungal laccase: properties and activity on lignin*. Journal of Basic Microbiology 3-4: 185-227. 2001.
- Piscitelli, A.; Giardina, P.; Lettera, V.; Pezzella, C.; Sannia, G. y Faraco, V. *Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi*. Current Genomics 12: 104-112. 2011.
- Gómez, G. y Batista, C. *Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola*. Cultivos tropicales 27(3):17-24. 2006.
- Montgomery, D.C. *Design and analysis of experiments*. John Wiley and son, pp.427-472. 2001.
- Nurdiyana, H. y Siti Mazlina, M.K. *Optimization of protein extraction from fish waste using response surface methodology*. Journal of Applied Science 9(17): 3121-3125. 2009.
- Plackett, R. y Burman, J. *The design of optimum multifactorial experiments*. Biometrika 33(4):305-325. 1946.
- Revankar, M.S. y Lele, S. *Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus Coriolus versicolor MTCC 138*. World Journal Microbiology and Biotechnology 22: 921-926. 2006.
- Asgher, M.; Kausar, S.; Bhatti, H.; Shah, S.A. y Ali, M. *Optimization of medium for decolorization of solar golden yellow R direct textile dye by Schizophyllum commune IBL-06*. International Biodeterioration and Biodegradation 61: 189-193. 2008.
- Levin, L.; Forchiassin, F. y Viale, A. *Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by Trametes trogii: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements*. Process Biochemistry 40: 1381-1387. 2005.
- Teerapatsakul, C.; Abe, N.; Bucke, C. y Chitradon, L. *Novel laccases of Ganoderma sp. KU-Alk4, regulated by different glucose concentration in alkaline media*. World Journal Microbiology and Biotechnology 23: 1559-1567. 2007.
- Raghukumar, C.; D'Souza-Ticlo, D. y Kumar, A. *Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: An emerging role of marine-derived fungi*. Critical Review Microbiological 34: 189-206. 2008.
- Mohammadian, M.; Mesdaghinia, A.R.; Naddafi, K.; Nasser, S.; Yunesian, M.; Mazaheri, A.M.; Rezaie, S. y Hamzehe, H. *Optimization of reactive blue 19 decolorization by Ganoderma sp. using response surface methodology*. Iran Journal and Environmental Health Science 7:35-42. 2010.
- Arteaga, C. *Optimización de la producción de fitasa por Aspergillus niger en fermentación en estado sólido utilizando métodos estadísticos*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. 2007.
- Fonseca, M.I.; Shimizu, E.; Villalba, L.L.; Zapata, P.D. *Laccase-producing ability and the inducing effect of copper on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina)*. Enzyme and Microbial Technology 46: 534-539. 2010.

24. Saparrat, M.; Balatti, P.A.; Martínez, M.J. y Jurado, M. *Differential regulation of laccase gene expression in *Coriolopsis rigida* LPSC No. 232*. Fungal Biology 114: 999-1006. 2010.
25. Cambria, M.T.; Ragusa, S.; Calabrese, V. y Cambria, A. *Enhanced laccase production in white-rot fungus *Rigidoporus lignosus* by the addition of selected phenolic and aromatic compounds*. Applied Biochemistry and Biotechnology 163: 415-422. 2010.
26. Scheel, T.; Höfer, M.; Ludwig, S. y Hölker, U. *Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds*. Applied Microbiology and Biotechnology 54: 686-691. 2000.
27. Field, J.A.; De Jong, E.; Feijoo Costa, G. y De Bont, J.A.M. *Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics*. Trends Biotechnol, 11:44-49. 1993.
28. Murugesan, K.; Nam, I.H.; Kim, Y.M. y Chang, Y.S. *Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid culture*. Enzyme Microbiology and Technology 40:1662-72. 2007.
29. Laemmli, U.K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227 680-685. 1979.
30. Statgraphics Plus Version 5.1. www.statgraphics.com.
31. Galhaup, C. y Haltrich, D. *Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper*. Applied Microbiology and Biotechnology 56:225-32. 2001.
32. Soden, D.M. y Dobson, A.D.W. *Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajorcaju**. Microbiology 147: 1755-63. 2001.
33. Henderson, M.E.K. *Fungal metabolism of certain aromatic compounds related to lignin*. Pure and Applied Chemistry 7: 589-602. 1963.
34. Baldrian, P. *Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quersina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme*. Applied Microbiology and Biotechnology 63: 560-563. 2004.
35. Manubens, A.; Canessa, P.; Folch, C.; Avila, M.; Salas, L. y Vicuña, R. *Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete *Ceriporiopsis Subvermispora**. FEMS Microbiology Letters 275: 139-145. 2007.
36. Galhaup, C.; Goller, S.; Peterbauer, C.; Strauss, J. y Haltrich, D. *Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions*. Microbiology 148: 2159-2169. 2002.
37. Majeau, J.A.; Brar, S.K. y Tyagi, R. *Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants*. Bioresource Technology 101: 2331-2350. 2010.
38. Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Fontanella, B. y Sannia, G. *Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus**. Applied and Environmental Microbiology: 920-924. 2000.
39. Lu, X. y Ding, S. *Effect of Cu^{2+} , Mn^{2+} and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus**. Mycoscience 51:68-74. 2010.

Recibido: 20/08/14.

Aprobado: 26/02/16.