



Laccases from *Pleurotus ostreatus*

Lacasas de *Pleurotus ostreatus*

Cristian Olvera-García¹, Gerardo Díaz-Godínez², Carmen Sánchez², Jorge Álvarez-Cervantes³, D. Martínez-Carrera⁴, Rubén Díaz^{2*}

¹Maestría en Biotecnología y manejo de Recursos Naturales. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala, México.

²Laboratorio de Biotecnología. Centro de Investigación en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

³Laboratorio de Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos. Universidad Politécnica de Pachuca. Zempoala, Hidalgo, México.

⁴Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Puebla, Biotecnología de Hongos Comestibles, Puebla 72001, Puebla, México. *Email: rdiazgod@hotmail.com

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.1.112>

ABSTRACT

The area of biotechnology is of great importance in the application of various scientific studies, one of them and others that are phenoloxidase enzymes synthesized by organisms such as insects, bacteria, plants and fungi, especially those of white rot. The physiological function of the laccases has not been fully understood, but is known to be characterized by their ability to degrade phenolic compounds. In several studies, they report that the laccases do not have a specific substrate by which it allows them to transform matter and in some cases completely mineralize a great variety of xenobiotic and recalcitrant agents. For this reason, its study has intensified in the last years, thus proposing possible applications that help to grow the knowledge and information of these. The present work is a contribution inclined towards the great range of products and applications as in: industries, chemical and clinical use and the environment.

Keywords: Basidiomycete, Phenolitic, Recalcitrant, Xenobiotic.

RESUMEN

El área de la biotecnología representa una gran importancia en la aplicación de diversos estudios científicos, uno de ellos son lacasas ya que estas son enzimas fenoloxidasas sintetizadas por organismos como insectos, bacterias, plantas y hongos en especial los de pudrición blanca. La función fisiológica de las lacasas no ha sido comprendida totalmente, pero se conoce que son caracterizadas por su capacidad de degradar compuestos fenólicos. En diversos estudios reportan que las lacasas no tienen un sustrato específico por lo que les permite transformar materia y en algunos casos mineralizar por completo gran variedad de agentes xenobioticos y recalcitrantes. Por este motivo su estudio se ha intensificado en los

últimos años, proponiendo así posibles aplicaciones que ayuden a crecer el conocimiento e información de estas. El presente trabajo es una contribución con inclinación hacia la gran gama de productos y aplicaciones como en: industrias, uso químico y clínico y del medio ambiente.

Palabras clave: Basidiomiceto, Fenólico, Recalcitrante, Xenobiótico.

1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas se han reportado como metaloproteínas con una actividad fenoloxidasas perteneciente al grupo de las oxidasas multicobre (Díaz *et al*, 2013). Estas enzimas catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos aromáticos en un proceso acoplado a la reducción del oxígeno molecular a agua. Son enzimas conocidas y estudiadas desde finales del siglo XIX, cuando se describieron por primera vez en el árbol de la laca japonés. Más tarde se descubrió su presencia en hongos, insectos y bacterias y actualmente se sabe de su existencia en arqueas (Maté, 2013).

2. *PLEUROTUS OSTREATUS*

Los hongos no son plantas ni animales, sino que están agrupados en un reino aparte, el reino fungí (Castiglia & kuhar, 2013). Los hongos son seres vivos que se incluyen desde un nivel de organismos unicelulares hasta organismos pluricelulares macroscópicos, (Kuhar *et al*, 2013). Los hongos tienen un papel importante en la degradación de la materia orgánica además de ser una fuente de sustancias bioactivas para producir antibióticos o fármacos, tales como alimentos funcionales y aditivos en productos de alimentación (Zepeda-Bastida *et al*, 2016).

Pleurotus ostreatus es un hongo agarical, a menudo se encuentra recubierto de una capa miceliar en la base y presenta carne delgada y blanca, al principio el piteliotienen forma de lengua y cuando madura tienen forma de concha, las láminas son blancas de color crema (Córdova, 2009). *Pleurotus ostreatus* pertenece al filo Basidiomycota, a la clase homobasidiomycota, orden agarica, familia pleuraceae (Carvajal, 2010), que degrada la materia orgánica ya que la toma como fuente de energía la lignina y la celulosa (Carbajal-Tocagón, 2010). La lignina es uno de los biopolímeros que se encuentra más abundante en las plantas junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono. La composición o distribución de los tres componentes en esas redes varía dependiendo del tipo de planta. En el caso de la composición de la madera, los rangos más comúnmente encontrados son: Celulosa: 38-50%; Hemicelulosa: 23-32% y Lignina: 15-25% (Chávez-Sifontes, 2013).

2.1. Ciclo de vida

El ciclo reproductivo del hongo *Pleurotus ostreatus* tiene un periodo de vida de siete a ocho semanas, este inicia cuando el hongo se encuentra en su estado maduro y suelta sus esporas, las esporas o también llamadas semillas son células que dan inicio a la vida del micelio, el siguiente paso es que este de origen al cuerpo fructífero y al final este ciclo concluye cuando el hongo maduro suelta sus esporas, después de cierto tiempo inicia a degradarse, luego a envejecer y muere. (Carbajal-Tocagón, 2010)

En la etapa de crecimiento del micelio debe obtener una buena carga nutricia a partir de carbono, nitrógeno, azufre y fosforo como principales fuentes, como complementarias algunas sales y minerales (Díaz-Godínez, 2015).

2.2. Reproducción sexual

Pleurotus ostreatus que está formado generalmente, por un pie normalmente lateral, corto o ausente, aterciopelado y de color blanco; un anillo y un sombrero carnoso, grande de 8-15 cm, convexo al principio (Milla, 2007), con láminas que contienen los basidocarpos en esta región es donde se forman las basidiosporas que son órganos responsables de la reproducción sexual (Nabors, 2006). El medio de reproducción se basa en el que los basidios ($n + n$) tras una cariogamia forman núcleos diploides que tras una meiosis dan lugar a las basidiosporas. A partir de ellas, se desarrollan micelios monocarióticos de distinto tipo que finalmente se unen tras un proceso conocido como plasmogamia, obteniendo un micelio dicariótico que dará lugar al hongo y, posteriormente, a la seta, volviéndose a repetir el ciclo (Sánchez, 2015).

3. ISOENZIMAS FENOLOXIDASAS Y SU CLASIFICACIÓN

Las isoenzimas son enzimas que presentan diferente secuencia de aminoácidos pero que tienen la misma reacción química catalítica. La formación de las isoenzimas permite un equilibrio en el metabolismo para cumplir las necesidades de una determinada etapa de desarrollo o tejido.

Las isoenzimas fenoloxiasas juegan un papel importante en procesos de descomposición de carbono ya que constituyen un grupo biocatalizador capaz de catalizar la oxidación de compuestos aromáticos en quinonas, Los compuestos fenólicos también son oxidados por las oxidasas que dependen de H_2O_2 (Sánchez-Rosario, 2011).

Tabla 1. Clasificación y descripción de algunas fenoloxidasas.

Fenoloxidasas	Descripción
Lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14)	Cataliza la oxidación de la lignina solo con presencia de H ₂ O ₂ , su peso molecular es de aproximadamente 40 kDa, siendo glucosilada y tanto su punto isoeléctrico como su pH óptimo de acción son ácidos (Orth <i>et al</i> , 1993).
Manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13)	Tiene un peso molecular de aproximadamente 50-60 kDa, y es glicosilada, Su punto isoeléctrico y su pH óptimo son ácidos. Utiliza H ₂ O ₂ para oxidar manganeso divalente a manganeso trivalente (Santucci <i>et al</i> , 2000)
Lacasas (EC 1.10.3.2)	Glicoproteínas extracelulares e intracelulares, tienen un peso molecular alrededor de 25-80 kDa, poseen la capacidad de reducir oxígeno molecular a dos moléculas de agua y simultáneamente oxidan un electrón de un varios sustratos fenólicos y aminas aromáticas (Thurson, 1994).

3.1. Enzimas lacasas y estructura

La lacasa se descubrió en el exudado del árbol japonés *Rhus vernicefera*, como una sustancia termolábil responsable de catalizar la polimerización oxidativa de compuestos lipofílicos (Yoshida, 1883). Las laccasas son polifenol oxidasas que contienen moléculas de cobre que están implicadas en la degradación de la lignina por un mecanismo de oxidación de compuestos fenólicos o aminas aromáticas mediante la transferencia de electrones hacia átomos de oxígeno (Salmones *et al*, 2015).

Las laccasas extracelulares son constitutivamente producidas en pequeña cantidad, sin embargo, su producción puede ser estimulada por la inducción de sustancias, principalmente compuestos aromáticos o fenólicos relacionados con lignina o derivados (Salmones *et al*, 2015). Las lacasas tienden a conservar su actividad enzimática en un rango de pH entre 3 a 10 y un rango de temperatura entre 5 a 55 °C. (Ramírez *et al*, 2003).

La estructura depende del organismo de procedencia, en bacterias suele tener un átomo y en ocasiones hasta dos de cobre, mientras que en hongos tienen entre tres y cuatro átomos de cobre que se encuentran en el centro activo (Ospina, 2008). El centro activo está constituido por cuatro átomos de cobre (Cu²⁺) los cuales están distribuidos en tres sitios diferentes de su estructura (McGuirl & Dooley, 1999): el sitio Cu²⁺ tipo 1 muestra una absorción en la zona visible y provoca un color azul en la proteína purificada; el sitio Cu²⁺ tipo 2 posee una absorción que no se detecta, pero tiene una capacidad de interactuar con una gran cantidad de inhibidores aniónicos; por último el sitio Cu²⁺ tipo 3 se reconoce por su fuerte absorción en la región cercana al ultravioleta (Ainhoa *et al*, 2002).

3.2. Uso de las enzimas lacasas

Estas enzimas tienen la capacidad de oxidar sustratos de alto potencial en presencia de mediadores que permiten la degradación de compuestos xenobióticos (Salmones *et al*, 2015). La capacidad de reducir el oxígeno molecular a dos moléculas de agua y simultáneamente, trabajan en la oxidación de un electrón de muchos sustratos aromáticos. El rango de sustratos oxidables es amplio, e incluye polifenoles, manofenoles metoxisustituidos, aminas aromáticas y otros compuestos aromáticos fácilmente oxidables. (Ramírez *et al*, 2003)

Entre sus muchas aplicaciones y sus variaciones se encuentra la clarificación de vino ya que remueve los compuestos fenólicos, al distinguir la morfina de la codeína se puede utilizar en el análisis de drogas. Tiende a tener un efecto de decoloración de efluentes, blanqueamiento de la pulpa de papel, degradación de herbicidas, entre otros, por lo tanto, se utiliza como delignificación y procesos de biorremediación (Téllez-Téllez *et al*, 2008).

Se puede contar con una gran gama de usos de estas enzimas ya que tienen una fuerte capacidad de oxidación en diversos compuestos. Desde el punto de vista biotecnológico las lacasas son estables, oxidan un amplio rango de compuestos y sobre todo que la mayoría de lacasas se pueden inducir, es por eso que también tienen aplicaciones como: penetramiento de materiales lignolíticos con el objetivo de la obtención de celulosa a partir de la madera (Trotter, 1990), la decoloración de efluentes ya que son capaces de decolorar y disminuir la DQO (demanda química de oxígeno) de fluentes (González *et al*, 2000), Decoloración de colorantes textiles, tratamiento de hidrocarburos, entre otros.

4. TIPOS DE GENES DE LACASAS

Tabla 2. Genes de lacasas en hongos reportados por GeneBank.

Gen	Gen Bank	DNA	Organismo	Referencia
lacasse	XM_003169329.1	1959 pb	<i>Arthroderma gypseu</i>	The Broad Institute Genome Sequencing Platform
phenoloxidase	M60560.1	2904 pb	<i>Coriolus hirsutus</i>	Kojima <i>et al.</i> , 1990
Diphenol oxidase	Z22591	3155 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Giardina <i>et al.</i> , 1995
lacc1	X84683.1	2800 pb	<i>Trametes versicolor</i>	Jonsson <i>et al.</i> , 1995
POX2	Z49075	3571 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Giardina <i>et al.</i> , 1996

Lcc3-1	AF025481.1	2629 pb	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Eggert <i>et al.</i> , 1996
Lcs1	AF053472.2	3032 pb	<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	Karahanian <i>et al.</i> , 1998
poxA1b	AJ005017	3371 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Giardina <i>et al.</i> , 1999
Lacc3-2	AF123571.1	2840 pb	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Temp <i>et al.</i> , 1999
Lac1	AF170093.1	3331 pb	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Otterbein <i>et al.</i> , 2000
lap1A	AF414808.1	2554 pb	<i>Trametes pubescens</i>	Galhaup <i>et al.</i> , 2002
lap 2	AF414807.1	4996 pb	<i>Trametes pubescens</i>	Galhaup <i>et al.</i> , 2002
lck	AB089612	2929 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Okamoto <i>et al.</i> , 2003
poxa3	AJ344434	3480 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Palmieri <i>et al.</i> , 2003
laccase	AY485826.1	2804 pb	<i>Flammulina velutipes</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2004
lac1 ex 1-3	AJ420179	238 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Luis <i>et al.</i> , 2004
lac2 ex 1-2	AJ420180	198 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Luis <i>et al.</i> , 2004
lac3 ex 1-3	AJ420181	238 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Luis <i>et al.</i> , 2004
Lac 1-2	AB201164.1	3712 pb	<i>Termitomyces sp.</i>	Taprab <i>et al.</i> , 2005
LacA	AY839936.1	4009 pb	<i>Trametes sp</i>	Xiao <i>et al.</i> , 2006
Lcc2	EF050081.1	1934 pb	<i>Monilinia fructigena</i>	Hirschhauser & Frohlich, 2007
Lcc2	EF050080.1	1896 pb	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Hirschhauser & Frohlich, 2007
sspoxa3a	AM409318	1318 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Giardina <i>et al.</i> , 2007

sspoxa3b	AM409319	1528 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Giardina <i>et al.</i> , 2007
Lcc1	EF990894.1	3470 pb	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cordoba-Cañero & Roncero, 2008
Lcc3	EF990894.1	4166 pb	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cordoba-Cañero & Roncero, 2008
Lcc5	EF990897.1	3229 pb	<i>Fusarium oxysporum</i>	Cordoba-Cañero & Roncero, 2008
pox3 ex 1-11	FM202669	2870 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pezzella <i>et al.</i> , 2009
pox 4 ex 1-20	FM202670	3191 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pezzella <i>et al.</i> , 2009
pox5 pseudogene	FM202671	2837 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pezzella <i>et al.</i> , 2009
pfal	EF446161.1	4589 pb	<i>Phanerochaete flavidoalba</i>	Rodríguez-Rincón <i>et al.</i> , 2010
lacasse	FJ858750.1	2119 pb	<i>Pycnoporus coccineus</i>	Uzan <i>et al.</i> , 2010
lacasse	FJ858751.1	2125 pb	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Uzan <i>et al.</i> , 2010
laccase	FJ473384.2	4505 pb	<i>Polyporus grammocephalus</i>	Huang <i>et al.</i> , 2011
lacasse	HM483869.1	1563 bp	<i>Trametes sp</i>	Fan <i>et al.</i> , 2011
Lac1	Jf927721.1	3668 pb	<i>Cerrera unicolor</i>	Janusz <i>et al.</i> , 2012
Lac1	DQ914874.1	1566 pb	<i>Ganoderma tsugae</i>	Tai, 2012
LAC2	AY676426.1	1715 pb	<i>Lentinula edodes</i>	Marabottini <i>et al.</i> , 2012
LAC3	AY676427.1	1790 pb	<i>Lentinula edodes</i>	Marabottini <i>et al.</i> , 2012
lacasse	AY485827.1	1638 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Zhang & Ma, 2012

lac2	AJ973225.1	1734 pb	<i>Pleurotus sapidus</i>	Linke <i>et al.</i> , 2012
lacp83	JF719064.1	2421 pb	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Téllez-Téllez <i>et al.</i> , 2012
lacasse	AY510604.1	2154 bp	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2012
Lacasse 1	JF906786.1	3816 pb	<i>Trametes gibbosa</i>	Zheng & Chi, 2012
Lac1	HM243485.1	1782 pb	<i>Trametes gibbosa</i>	Zheng & Chi, 2012
Laccase	AY485829.1	1776 pb	<i>Ganoderma lucidum</i>	Zhang & Ma, 2012

5. CONCLUSION

Pleurotus ostreatus ha mostrado ser un hongo con la capacidad de producir complejos enzimáticos con actividad lignolítica como lacasas. Diversos estudios han mostrado que las lacasas tienen efecto de degradación o son capaces de llevar a cabo la transformación y mineralización de agentes xenobioticos y recalcitrantes, por lo que se les atribuye como un medio biogenerador entre otros beneficios.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Ainhoa A., Téllez A., González T. & González A. 2002. Aspectos generales de la biodegradación de la madera: aplicaciones industriales de las lacasas. *BioTecnología*. 7(3): 40-55.

Chavéz-Sinfuentes M. & Domine M. E. 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 4(4):15-46

Cañero D. & Roncero M. I. G. 2008. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. 98: 509-518

Carvajal G. 2010. Evaluación de la producción del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre cinco tipos de sustratos (tamo de trigo, tambo de cebada, tambo de vicia, tambo de avena y paja de

paramo); enriquecidos con tuza molida, afrecho de cebada y carbonato de calcio. Tesis de doctorado. Escuela de ciencias agrícolas y ambientales, Ecuador.

Carvajal-Tocagón G. M. Evaluación de la producción del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre cinco tipos de sustratos (tamo de trigo, tamo de cebada, tamo de vicia, tamo de avena y paja de paramo); enriquecidos con tuza molida, afrecho de cebada y carbonato de calcio. Tesis de ingeniería. Pontificia Universidad de Ecuador, Ecuador.

Castiglia V. & Kuhar F. 2013. Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. Revista boletín biológica. 28: 11-18

Córdova M. 2009. Estudio comparativo del crecimiento micelial del hongo (*Pleurotus ostreatus*) en acícula de pino, gabazo de caña y bagazo de maíz. Tesis de doctorado. Universidad de Azuay, Ecuador.

Díaz-Godínez G, Díaz R, Sanchez C. 2015. Requerimientos para el crecimiento microbiano. In: Metabolismo microbiano. Conciencia gráfica.

Díaz R., Téllez-Téllez M., Sánchez C., Bibbins-Martínez M., Díaz-Godínez G., & Soriano-Santos J. 2013. Influence of initial PH of the growing medium on the laccase activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentations. *Electric journal of biotechnology*, 1-13

Eggert, C., Temp U. & Eriksson K. E. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1151-1158.

Fan, F., Zhuo R., Sun S., Wan X., Jiang M., Zhang X. & Yang Y. 2011. Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes sp.* 48424 which had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes. *Bioresour. Technol.* 102: 3126-3137

Galhaup, C., Wagner H., Hinterstoisser B., & Haltrich D. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycetes *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 529-536

Galhaup, C., Goller S., Peterbauer C. K., Strauss J. & Haltrich D. 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169.

Giardina, P., Aurilia V., Cannio R., Marzullo L., Amoresano A., Siciliano R., Pucci P. & Sanna G. 1996. The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Eur. J. Biochem.* 235: 508-515.

Giardina, P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G. & Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.* 341: 655-663.

Giardina, P., Autore F., Faraco V., Festa G., Palmieri G., Piscitelli A. & Sannia G. 2007. Structural characterization of heterodimeric laccases from *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 1293-1300.

González T., Terrón M., Yague S., Zapico E., Galleti G., & González A. 2000. Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry monitoring of fungal-biotreated distillery wastewater using *Trametes sp.* I-62 (CECT 20197). *14:1417-1424*

Hirschhauser, S. & Frohlich J. 2007. Multiplex PCR for species discrimination of *Sclerotiniaceae* by novel laccase introns. *Int. J. Food Microbiol.* 118: 151-157.

Huang, S.J., Liu Z.M, Huang X. L., Guo L. Q. & Lin J. F. 2011. Molecular cloning and characterization of novel laccase gene from a white-rot fungus *Polyporus grammacephalus* TR16 and expression in *Pichia pastoris*. *Lett. Appl. Microbiol.* 52: 290-297

Janusz G., Mazur A, Checinska A., Malek W. & Rogalski J. 2012. Cloning and characterization of a laccase gene from the white-rot basidiomycete *Cerrena unicolor*. (<http://www.uniprot.org/uniprot/B8YQ97>).

Jonsson, L., Sjostrom K., Haggstrom 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.* 1251: 210-215.

Karahanian, E., Corsini G., Lobos S. & Vicuna R. 1998. Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochim. Biophys. Acta* 1443: 65-74.

Linke D., Bouws H., Peters T., Nimtz M., Berger R. G. & Zorn H. 2012. Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterization, cloning, and sustainable production. NCBI (GenBank).

Luis, P., Walther G., Kellner H., Martin F. & Buscot F. 2004. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1025-1036.

Ceriporiopsis subvermispora. *Biochim. Biophys. Acta* 1443: 65-74.

Kojima, Y., Tsukuda T., Kawai Y., Tsukamoto A., Sigiura J., Sakaino M. & Kita Y. 1990. Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *J. Biol. Chem.* 265: 15224-15230.

McGuirl M. & Dooley D. 1999. Copper-containing oxidases. *Curro pin chem biol.* 3: 138-144

Maté D. 2013. Diseño de lacasas fúngicas activas en sangre mediante evolución dirigida. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

Marabottini R., Ciaffi M. & D'Annibale A. 2012. Molecular characterization of gene sequences coding for laccase in *Lentinula edodes* NRRL 22663. NCBI (GenBank).

Milla A. 2007. Introducción al cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. Publicaciones INEA. España.

Nabors M.W. 2006. Introducción a la Botánica. España: Pearson Educación. 457-480.

Okamoto, K., Ito Y., Shigematsu I., Yanagi S.O. & Yanase H. 2003. Cloning and characterization of a laccase gene from the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* 44: 11-17.

Orth A., Royse D. & Tien M. 1993. Ubiquity of lignin-Degradind Peroxidases among various food-degrading fungi. *Applied and environmental microbiology*. 59: 017-023

Ospina X. 2008. Evaluacion de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleado *Pleurotus ostreatus*. Tesis doctorado. Pontifica universidad Javeriana, Bogotá.

Otterbein, L., Record E., Longhi S., Asther M. & S. Moukha. 2000. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.* 267: 1619-1625.

Palmieri, G., Cennamo G., Faraco V., Amoresano A., Sannia G. & Giardina P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 220-230.

Pezzella, C., Autore F., Giardina P., Piscitelli A., Sannia G. & Faraco V., 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Curr Genet.* 55: 45-57.

Ramírez N.E., Vargas M.C., Ariza J.C., Martínez C. 2003. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2:64-72.

Rodríguez-Rincón F., Suarez A., Lucas M, Lar Rondo L. F., De la Rubia T., Polaina J. & Martínez J. 2010. Molecular and structural modeling of the *Phanerochaete* flavido-alba extracellular laccase reveals its ferroxidase structure. *Arch. Microbiol.* 192: 883-892

Salmones D. & Mata G. 2015. Laccase production by *Pleurotus djamor* in agar media and during cultivation on wheat Straw. *Revista Mexicana de Micología.* 42: 17-23

Sánchez R. 2015. Hongos superiores como fuente de salud. Tesis doctorado. Universidad Complutense.

Sánchez-Rosario Y., Sánchez J., Vásquez-Duhalt & Andrade-Gallegos R. 2011. Producción y caracterización de la fenol oxidasa de *Scytalidium thermophilum*. Revista mexicana de micología. 34:31-42

Santucci R., Bongiovanni C., Marini S., Del Conte R., Tien M., Banci L. & Coletta M. 2000. Redox equilibria of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: functional rol of residues on the proximal side of the haem pocket. Biochemical Journals. 249: 85-90

Tai Y.R. 2012. Cloning, classification and heterologous expression of laccases from *Ganoderma species*. NCBI (GenBank).

Taprab, Y., Johjima T., Maeda Y., Moriya S., Trakulnaleamsai S., Noparatnaraporn N., Ohkuma M. & Kudo T. 2005. Symbiotic fungi produce laccases potentially involved in phenol degradation in fungus combs of fungus-growing termites in Thailand. Appl. Environ. Microbiol. 71: 7696-7704.

Téllez-Téllez M, Fernández FJ, Montiel-González AM, Sánchez C, Díaz-Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solidstate fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. 81: 675-679

Téllez-Téllez M., Díaz-Godínez G., Aguilar M. B. & Fernández F. J., 2012. Description of laccase gene from *Pleurotus ostreatus* expressed under submerged fermentation conditions. BioRes. (in press).

Temp, U., Zierold U. & Eggert C. 1999. Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. Gene. 236: 169-177.

Thurson C. 1994. Th estructure and function of fungal laccases. Microbiology. 140: 19-26

Trotter P. 1990. Biotechnology in the pulp and paper industry: a review. Tappi Journal. 29: 395-403

Uzan, E., Nousiainen P., Balland V., Sipila J., Piumi F., Navarro D., Asther M., Record E. & Lomascolo A. 2010. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. J. Appl. Microbiol. 108: 2199-2213

Xiao Y.Z., Hong Y. Z, Li J. F., Hang J, Tong P. G., Fang W. & Zhou C. Z. 2006. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71: 493-501

- Yoshida H. 1883. Chemistry of lacquer (urushi). J Chem Soc Trans. 43:472–486
- Zepeda-Bastida A., Ojeda-Ramírez D., Soto-Simental S., Rivero-Pérez N. & Ayala-Martínez. 2016. Comparison of Antibacterial Activity of the Spent Substrate of *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. Journal of Agricultural Science. 8(4): 43-49
- Zhang, Y. & Ma L. 2012. Cloning a laccase gene from *Ganoderma lucidum* and its expression in *Pichia pastoris*. NCBI (GenBank).
- Zhang Y.B., Jiang Q., & Jiang M. L., 2004. Cloning of a laccase gene from *Flammulina velutipes* and study on its expression in *Pichia pastoris*. Acta Microbiol. Sinica. 44: 775-779
- Zhao M., Song X. & Liu G. 2012. Cloning and characterization of laccase gene from white rot fungus, *Pycnoporus sanguineus*. NCBI (GenBank).
- Zheng M. & Chi Y. 2012. Cloning and sequence analysis of two laccase genes from white-rot fungus *Trametes gibbosa*. NCBI (GenBank).