

Deslignificación de pasta kraft de *Pinus radiata* con una levadura genéticamente modificada para producir lacasa

A. Arana-Cuenca^{1*}, A. Téllez-Jurado¹, S. Yagüe², E. Fermiñán³, J. M. Carbajo⁴,
A. Domínguez⁵, T. González⁴, J. C. Villar⁵ y A. E. González²

¹ Universidad Politécnica de Pachuca. Ctra. Pachuca-Cd. Sahagún, km 20. Rancho Luna.
Ex Hacienda de Sta. Bárbara. Municipio de Zempoala. 43830 Hidalgo. Mexico

² CBMSO-CSIC. C/ Nicolás Cabrera, 1. Cantoblanco-UAM. 28033 Madrid. España

³ Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. 37007 Salamanca. España

⁴ CIFOR-INIA. Laboratorios de Celulosa y Papel. Ctra. A Coruña, km 7,5. 28040 Madrid. España

⁵ Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Cuba

Resumen

Una posible aplicación biotecnológica de las lacasas fúngicas es el blanqueo de pasta de papel mediante la degradación de la lignina en la pasta cruda. Para ello es necesaria su producción a bajo coste y a concentraciones superiores a las secretadas por los hongos de forma natural. La expresión heteróloga en levaduras es una alternativa para su producción a mayor escala. En el presente trabajo se ha realizado la expresión heteróloga del gen *cglcc1*, responsable de la producción de lacasa en el hongo basidiomiceto *Corioloopsis gallica*, en la levadura *Kluyveromyces lactis*. Posteriormente y para verificar si la capacidad deslignificante se mantiene en la levadura, se ha tratado una pasta kraft de *Pinus radiata* con la cepa recombinante. Tras el tratamiento, el número kappa disminuyó en un 13%, mientras que el contenido en lignina lo hizo en un 22%, corroborando así el efecto deslignificador. Se concluye que el empleo de microorganismos carentes de actividades celulolíticas y genéticamente modificados para producir altos niveles de actividad lacasa constituye una opción para deslignificar aplicable a procesos de blanqueo de pasta de celulosa.

Palabras clave: lignina, bioblanqueo, pastas kraft, lacasa heteróloga, *Kluyveromyces lactis*, *Corioloopsis gallica*

Abstract

Delignification of *Pinus radiata* kraft pulp by treatment with a yeast genetically modified to produce laccases

Cellulose pulp bleaching is one of the main biotechnological applications of fungal laccases due to their capacity to degrade lignin from unbleached pulp. This application requires low cost enzyme production and higher enzyme concentrations than those obtained from the natural fungal producers. Heterologous expression of laccase in yeasts is an option for producing these enzymes on an industrial scale. In this work, we have demonstrated the heterologous expression of the *cglcc1* gene, responsible for laccase production in the basidiomicetous fungus *Corioloopsis gallica*, in the yeast *Kluyveromyces lactis*. In order to know if the transformed yeast has delignificant capability, a *Pinus radiata* kraft pulp has been incubated with it. After the treatment, a significant decrease in kappa number (13%) and in lignin content (22%) was observed. These results showed the delignificant capability of this transformed yeast. It can be concluded that the use of genetically modified microorganisms that do not demonstrate cellulolytic activity can produce high laccase levels and delignify cellulose pulps with a potential applications in cellulose pulp bleaching.

Key words: lignin, biobleaching, kraft pulp, heterologous laccase, *Kluyveromyces lactis*, *Corioloopsis gallica*.

Introducción

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas del grupo oxidasas azules que contienen átomos de cobre en su es-

tructura, tienen baja especificidad por sustrato, reducen el oxígeno molecular a agua y pueden oxidar diferentes compuestos fenólicos y no fenólicos (González *et al.*, 2005). Las lacasas secretadas por los hongos participan en varios procesos celulares, incluyendo deslignificación, esporulación, producción de pigmentos, formación del cuerpo fructífero y en mecanismos de patoge-

* Corresponding author: ainhoa@upp.edu.mx

Received: 15-01-10; Accepted: 24-06-10.

nicidad (Arana *et al.*, 2002). Debido a su baja especificidad de sustrato se han propuesto varias aplicaciones industriales como el mantenimiento de la calidad en vinos, el aumento de la digestibilidad de piensos obtenidos a partir de residuos agrícolas y la conversión de intermedios químicos (Rodríguez Couto y Toca Herrera, 2006). No obstante, la función más estudiada de estas enzimas es su participación en el proceso de deslignificación natural, por lo que se ha propuesto emplearla en la industria de pasta de papel en procesos de biopulpeo y de bioblanqueo (Bajpai *et al.*, 2007) donde sustituiría total o parcialmente el uso de reactivos químicos con la consecuente mejora medioambiental. Kirk y Yang (1979) reportaron que *Phanerochaete chrysosporium* puede deslignificar parcialmente pulpa no blanqueada y se han realizado numerosos estudios usando hongos ligninolíticos o las enzimas que secretan para reducir la cantidad de lignina.

El número kappa disminuyó 11 puntos tras 8 días de incubación con *Phlebia sp.* MG-60 (Li *et al.*, 2002); además Tavares *et al.* (2004) reportan 50% de reducción usando un tratamiento multietapa con aumento a 110°C, seguido de un tratamiento con la lacasa de una pasta de eucalipto. Según Balakshin *et al.* (2001) se reduce de 13,7 a 8,5 el número kappa de una pasta kraft de eucalipto usando la lacasa, aumentando la temperatura a 65°C y con una presión parcial de oxígeno de 5 bar.

Para que estos procesos puedan ser rentables es necesaria una fuente de proteínas de bajo costo. Dado que en la mayoría de las ocasiones la producción de esta enzima por las cepas silvestres es baja, es difícil alcanzar los niveles mínimos necesarios para que su producción sea rentable y se investigan posibles alternativas, siendo una de las más factibles su expresión, de forma regulada, como proteína heteróloga en organismos modelo.

La expresión heteróloga de la lacasa se ha estudiado desde 1990 (Kojima *et al.*, 1990) y las lacasas de diferentes microorganismos se han expresado en levaduras y hongos. La empresa Novo Nordisk Co. comercializa el producto DeniLite II consistente en la lacasa de *Myceliophthora thermophila* expresada heterológicamente en *Aspergillus oryzae* usado en la industria textil para el destintado del azul índigo. También se han realizado estudios de producción de lacasa recombinante en *Saccharomyces cerevisiae* que, transformada con el gen que codifica para la lacasa de *Trametes versicolor*, puede fermentar azúcares transformándolos en etanol sin inhibir su crecimiento por la presencia de fenoles (Larsson *et al.*, 2001). La expresión heteróloga del gen que

codifica para la lacasa de *Coprinellus congregatus* aumenta la supervivencia de *S. cerevisiae* frente al estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2006). *Trichoderma reesei*, transformado con el gen lacasa de *Phlebia radiata*, puede modificar la fracción soluble de una pasta kraft (Salheimo y Niku-Paavola, 1991).

Corioloopsis gallica es un hongo basidiomiceto de podredumbre blanca con capacidad ligninolítica (Calvo *et al.*, 1998). Se ha probado que puede decolorar y disminuir la DQO de efluentes de la industria cervecera con alto contenido fenólico (Yagüe *et al.*, 2000) y decolorar colorantes textiles (Robinson *et al.*, 2001). Se ha clonado y caracterizado el gen *cglcc1* que codifica para una lacasa y su ADNc correspondiente (GenBank, No. de acceso AF297874, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se ha estudiado la expresión de dicho gen usando ácido tánico como inductor (Carbajo *et al.*, 2002). Por otra parte, *Kluyveromyces lactis* es una levadura muy estudiada en la industria alimentaria, específicamente en la producción de β -galactosidasa (lactasa). Su habilidad para crecer en sustratos baratos como lactosa, aumenta su potencial como huésped para producir proteínas heterólogas. Esta levadura ya ha sido usada con éxito para producir lacasa de modo heterólogo (Piscitelli *et al.*, 2005; Faraco *et al.*, 2008).

El objetivo del presente trabajo ha sido producir actividad lacasa en la levadura *Kluyveromyces lactis*, carente de actividades celulolíticas. El propósito ha sido obtener un microorganismo eficaz para deslignificar pasta de celulosa, donde el empleo directo de hongos de pudrición blanca como *Corioloopsis gallica* está desaconsejado pues provoca a su vez la degradación de la celulosa. Para ello, se pretende introducir el ADNc del gen *cglcc1*, responsable de la producción de la proteína lacasa del hongo *C. gallica*, en *K. lactis*, una levadura de interés industrial. Una vez comprobada la producción activa de la proteína heteróloga, el siguiente paso será comprobar la capacidad deslignificante de la levadura transformada, para lo que ésta se aplicará a una pasta kraft de *Pinus radiata* y se medirá el efecto producido y sus repercusiones sobre un blanqueo posterior.

Material y métodos

Obtención y caracterización de la pasta

La madera de *P. radiata* se recibió en forma de trozas, fue descortezada manualmente y astillada en una astilladora semi-industrial de volante de dos cuchillas.

Las astillas fueron posteriormente tamizadas para recoger la fracción entre 8 mm y 30 mm.

La cocción kraft de las astillas se realizó en un digestor de 25 L de capacidad con recirculación forzada de las lejías y calentamiento indirecto por vapor. La temperatura se ha controlado desde un ordenador provisto de una interfase y una aplicación informática diseñada a tal efecto. Previamente a la cocción, las astillas se sometieron a un tratamiento con vapor a 100°C durante 10 min. Las condiciones de la cocción kraft fueron:

- Peso seco de astillas: 1 kg.
- Alcali activo: 20%.
- Sulfidez: 25%.
- Relación lejía/astillas: 4 L/kg.
- Temperatura de cocción: 170°C.
- Tiempo de calentamiento (hasta 170°C): 40 min.
- Tiempo de cocción en condiciones isoterma:

50 min.

Tras la cocción, las pastas se lavaron, desintegraron y tamizaron. Sobre la pasta tamizada se determinó el número kappa (UNE 57 034: 1991) y el contenido en lignina Klason (UNE 57 100: 1986).

Microorganismos

Se empleó la cepa *Escherichia coli* JM109 en las clonaciones necesarias para la construcción del plásmido final. Esta cepa se mantuvo mediante resiembra periódicas en medio LB (1% bacto-triptona, 0,5% NaCl, 0,5% extracto de levadura). Las bacterias se mantuvieron en crecimiento durante 24 h a 37°C y se conservaron a 4°C.

La expresión del gen *cglcc1* se realizó en la cepa *K. lactis* 2369/152F (*MATa*; *metA1-1* y *ura3-20*). El mantenimiento de la cepa silvestre se realizó mediante resiembra periódicas en medio YEPD (2% glucosa, 2% bacto-peptona, 1% extracto de levadura), mientras que las cepas transformadas se mantuvieron en medio mínimo (2% glucosa, 0,7% nitrógeno levadura base sin aminoácidos) suplementado con metionina (50 µg L⁻¹). En ambos casos, las levaduras se incubaron durante 48 h a 30°C y se conservaron a 4°C.

Para obtener el gen *cglcc1* de *Corioloropsis gallica* se utilizó la cepa A-241 de la colección IJFM. Su mantenimiento se realizó mediante resiembra periódicas en medio MEA (2% extracto de malta, 2% agar bacteriológico). El crecimiento del microorganismo se realizó a 28°C durante 1 semana y se conservó a 4°C.

Construcción del plásmido y transformación de *K. lactis*

En primer lugar se construyó el «cassete» promotor-terminador. Para ello se usó el plásmido pBluescript II SK (+) donde se insertó el promotor del gen *klpho5*, el ADNc del gen *cglcc1* y finalmente el terminador del gen *klpho5*. Para las ligaciones se usaron 50 ng de plásmido con una relación molar 1:3 (plásmido:inserto) y la transformación en *E. coli* se realizó según Hanahan (1983). En los casos necesarios se comprobó la clonación del fragmento en dirección correcta mediante las enzimas de restricción apropiadas.

El «cassete» obtenido se clonó en el plásmido Kep6, capaz de replicar en la levadura (Wesolowski-Louvel *et al.*, 1996). La transformación en *K. lactis* se realizó según el método de sal de litio (Ito *et al.*, 1983) usando 1 µg del plásmido. La transformación se realizó tanto con el plásmido obtenido, como con el plásmido KEp6 sin modificar, usado como control. La selección de los transformantes tuvo lugar en placas con medio mínimo suplementadas con metionina (50 µg L⁻¹).

Detección de actividad lacasa en medio sólido

La actividad en sólido se ensayó mediante la preparación de placas con medio bajo en fosfato (Whickerham, 1946) modificado (20 g L⁻¹ glucosa, 0,1 g L⁻¹ KI, 400 µg L⁻¹ riboflavina, 50 mM solución tampón ácido cítrico-citrato sódico pH 4,3) al que se agregó ácido 2-2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) 5 mM y de CuSO₄ 0,2 mM (Wolfenden y Wilson, 1982). El medio se solidificó añadiendo agarosa 1%. Como control positivo de actividad lacasa se incubó la cepa de *C. gallica* (de la cual procede el ADNc utilizado) en medio agar-malta con un suplemento de ABTS 5 mM.

Deslignificación y caracterización de pastas

La comprobación de la capacidad deslignificante de levadura transformada se realizó sobre una pasta kraft de *P. radiata* con número kappa 42,9. Las levaduras (testigo y transformada) se prepararon tal y como se ha descrito anteriormente. La pasta (20 g) se introdujo en una bolsa de polietileno y se impregnó con 4 mL de una suspensión de medio bajo en fosfato con levadura. La consistencia de la pasta se ajusta con agua

desionizada y se fijó en el 10%. La bolsa se cerró y su contenido se mezcló manualmente. Se mantuvo en incubación durante 10 días a 28°C. Transcurrido este tiempo, la pasta se lavó con agua destilada para eliminar las células de levadura y evitar interferencias en las determinaciones posteriores. Sobre la pasta lavada se midieron el número kappa (el parámetro papelerero correlacionado con la cantidad de lignina residual en la pasta) y el contenido en lignina Klason.

Para la formación de hojas de ensayo la pasta tratada y la control se desintegraron en un equipo de laboratorio siguiendo la norma UNE EN ISO 5236. Las hojas se elaboraron en un formador Rapid-Köthen de acuerdo con la norma UNE EN ISO 5269-1, tras lo cual se acondicionaron en atmósfera normalizada (23°C y 50% H.R.) durante 24 horas para determinar sus características.

Se determinaron: la resistencia al estallido (UNE EN ISO 2758) con un equipo tipo Müllen, la resistencia al rasgado (UNE EN 21974) con un sistema de péndulo Elmendorf y la resistencia a la tracción y el alargamiento (UNE EN ISO 1924-2) con un dinamómetro Lhomargy.

Resultados y discusión

Transformación de *Kluyveromyces lactis* con el gen lacasa *cglcc1* de *Corioliopsis gallica*

La transformación del gen *cglcc1* del basidiomiceto *C. gallica* en la levadura *K. lactis* necesitó una cons-

trucción previa en el plásmido pSK(+) que contuviera el «cassete» promotor-gen-terminador. El promotor y terminador elegido para la expresión del gen fueron los correspondientes a la fosfatasa ácida de la propia levadura que se expresa en un medio bajo en fosfato (Fermiñán y Domínguez, 1997). En el presente estudio se obtuvo el plásmido pAIT (Fig. 1a), basado en pSK(+) que contiene el «cassete» necesario para la expresión del gen de interés (el promotor del gen *klpho5*, el ADNc del gen *cglcc1* con su propio péptido señal para que la enzima sea secretada y el terminador del gen *Klpho5*). El plásmido capaz de replicar en la levadura se obtuvo mediante la inserción del «cassete» del plásmido pAIT en el plásmido KEp6 obteniéndose el plásmido KEpA (Fig. 1b) con el cual se transformó *K. lactis*.

Se obtuvieron cepas transformadas tanto con el plásmido KEpA como con el plásmido KEp6 (control). Las colonias de las levaduras transformadas se mantuvieron en placas con medio mínimo suplementado con 50 µg L⁻¹ de metionina.

Actividad enzimática

Una vez obtenidas las cepas transformantes se realizó el estudio de inducción en medio sólido con dos finalidades: comprobar que la levadura puede secretar la proteína de forma activa y elegir aquellas colonias de levaduras con mayor actividad, ya que no todas introducen el mismo número de plásmidos en su interior. Como control positivo de actividad lacasa se

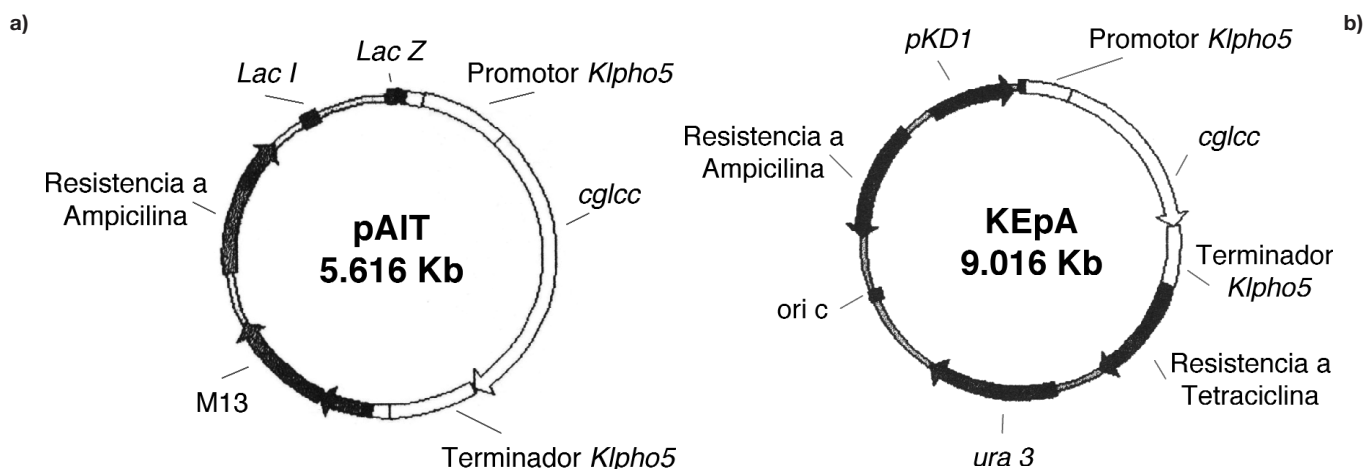


Figura 1. Plásmidos obtenidos de la clonación del promotor del gen *Klpho5*, el gen *cglcc1* y el terminador del gen *Klpho5*. a) En el plásmido PBluescript II SK(+). b) En el plásmido KEp6.

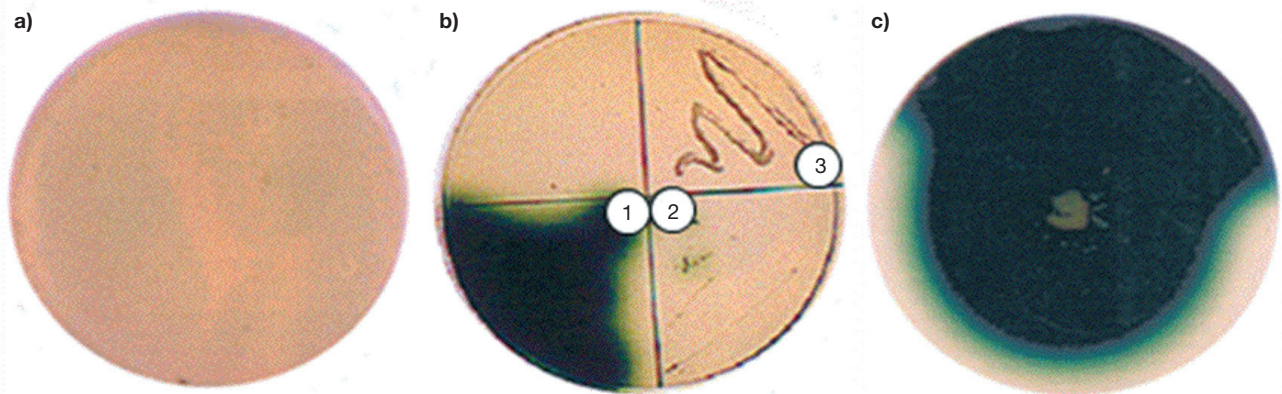


Figura 2. Inducción de la actividad lacasa en sólido. a) Control abiótico. b) Inducción de la levadura *K. lactis*. 1 y 2, levaduras transformadas con el plásmido KEpA; 3, levadura control. c) Control de actividad lacasa; crecimiento de *C. gallica*.

preparó una placa de medio agar-malta y un suplemento con la misma cantidad de ABTS donde se incubó *C. gallica*, una cepa que produce alta actividad lacasa en este medio.

En un primer intento, el medio de cultivo se preparó con 2% agar bacteriológico sin obtener coloración alguna del medio por las levaduras transformadas. Una posible causa podría ser que el agar contuviera fosfato que afectara a la inducción del promotor del gen fosfatasa ácida. Por ello se solidificó el medio con un sustrato inerte, 1% agarosa, que proporcionó los resultados esperados. En la Figura 2 se observan los resultados del estudio de inducción en placa tras 10 días de incubación a 28°C. *C. gallica* produce gran actividad lacasa como muestra el oscurecimiento de la placa debido a la oxidación del ABTS. Lo mismo ocurre con la cepa *K. lactis* 1 (levadura transformada con el gen lacasa) pero no en *K. lactis* 3 (levadura transformada con el plásmido KEp6 como control). Esta cepa transformada está produciendo una proteína lacasa activa extracelular, como prueba el que el halo de coloración sea mayor que el diámetro de la colonia. En la cepa *K. lactis* 2 la coloración del medio es mínima, es decir, la cantidad de lacasa producida es mucho menor que en *K. lactis* 1.

La lacasa de *C. gallica* se puede expresar de manera activa y extracelular en la levadura *K. lactis* (muy versátil en la secreción de las proteínas que produce de manera heteróloga) reconociendo los péptidos señal de varios microorganismos como la glucoamilasa de la levadura *Asxula adenivorans*, la β -lactoglobulina ovina y la aminoglucosidasa del ascomiceto *Aspergillus niger*. Los resultados del presente trabajo corroboran dicha versatilidad ya que *K. lactis* reconoce un péptido señal del basidiomiceto *C. gallica*.

La expresión de la proteína heteróloga usando un plásmido replicativo como KEp6 depende del número de copias introducidas en la célula (Morlino *et al.*, 1999). Por esta razón se obtuvieron cepas *K. lactis* transformadas con el gen lacasa con mayor actividad (*K. lactis* 1 respecto a 2; Fig. 2).

Los resultados del presente estudio concuerdan con los obtenidos por Faraco *et al.* (2008) y por Piscitelli *et al.* (2005) quienes reportan que *K. lactis* puede expresar eficientemente la enzima lacasa.

Ensayos de deslignificación

Una vez comprobada la capacidad de la levadura para secretar la enzima en medio sólido se estudió la capacidad de las cepas transformadas para degradar la lignina de una pasta kraft de *P. radiata*. Como se observa en la Tabla 1, el tratamiento de la pasta con las levaduras transformadas causa una disminución del número kappa en 5,5 puntos (12,8%) respecto a su valor para el control abiótico. También se observa que, respecto a la pasta original, el tratamiento con la levadura control produce un aumento de 6,7 unidades

Tabla 1. Efecto deslignificador de las cepas transformadas con el gen lacasa sobre pasta kraft de *P. radiata*

	N.º kappa	Lignina (%)
Control abiótico	42,9 (—)	8,9 (—)
<i>K. lactis</i> control	49,6 (—)	7,9 (11,2)
<i>K. lactis</i> A1 transformada	37,4 (12,8)	6,9 (22,4)

Entre paréntesis» % de disminución sobre el control abiótico.

del número kappa. Esto puede deberse a que no toda la levadura se elimine de la pasta durante el lavado y sus restos contribuyan al número kappa al ser materia oxidable por el permanganato. No obstante, esta circunstancia debería afectar por igual a las levaduras transformadas y control, por lo que, para esclarecer esta duda, se decidió determinar el contenido en lignina Klason, que no está afectado por los restos de levadura que pudieran estar presentes.

La medida de la lignina Klason (Tabla 1) muestra, por una parte, una disminución tanto en la pasta tratada con la cepa control de *K. lactis* (11%) como en la pasta tratada con la cepa de *K. lactis* transformada con el gen lacasa (22%). Estos valores suponen una gran discrepancia con los porcentajes de variación experimentados por el número kappa, lo que indica que este parámetro papelero no es un modo eficaz de estimar la lignina residual cuando la pasta ha sido tratada con este tipo de levaduras. Si, como se ha supuesto, parte de las levaduras no fueron totalmente eliminadas de la pasta tras el lavado, esta sustancia sería oxidada por el permanganato potásico elevando así el valor del número kappa. Otro hecho destacado es que la pasta tratada con la levadura control también ha reducido significativamente su contenido en lignina, lo que aparentemente entra en contradicción con la ausencia de actividad lacasa en esta cepa. La modificación se atribuye a que la incubación con la levadura puede producir alteraciones en las fibras que posibiliten la extracción de la lignina durante la etapa de lavado, aunque no se ha podido elucidar la naturaleza de esta transformación. No se ha encontrado ninguna descripción de genes o proteínas capaces de degradar la hemicelulosa (xilanasas o mananasas) en *K. lactis*. Se sabe que esta especie produce altas cantidades de β -galactosidasa, pero en principio esta enzima solo es capaz de degradar lactosa y no otros oligosacáridos. Además, esta descrito que esta enzima actúa de modo intracelular, lo que limitaría su efecto sobre la pasta de celulosa.

Los resultados obtenidos en la deslignificación de la pasta kraft de *P. radiata* indicaron que se puede usar las levaduras transformadas en un potencial proceso de biBlanqueo. La reducción de 12 puntos en el número kappa (25% respecto a la pasta tratada con la cepa testigo) puede deberse a la acción de la enzima heteróloga.

La medida de lignina Klason, antes y después del tratamiento con la levadura, redujo 25% con respecto al testigo abiótico y 10% respecto al testigo con la le-

vadura sin actividad lacasa. Esto indica que la levadura transformada tiene una función importante en el proceso de deslignificación. La reducción de 10% en lignina con la levadura testigo respecto al testigo abiótico puede resultar de la acción de la propia levadura lo que aumenta su interés para esta aplicación. Asimismo, se elaboraron hojas de ensayo con las pasta control y tratadas determinando su resistencia mecánica (mediante los índices de estallido, desgarró y tracción), no encontrándose diferencias significativas, lo que era de esperar dada la ausencia de actividad celolítica en el microorganismo empleado.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son similares a los de otros investigadores que usan microorganismos o metodologías más complicadas. Una ventaja de esta metodología, en la que se usa por primera vez un microorganismo genéticamente modificado, es que *K. lactis* puede ser mejorado en su capacidad de secretar la enzima (por ejemplo, cambiando el promotor), puede ser transformado con otra enzima que complemente a la lacasa en la deslignificación o puede suprimirse algún gen de la levadura que optimice dicha delignificación. Así puede proseguir la mejora de la levadura y trasladar este proceso a la industria.

Conclusiones

Es posible expresar el gen de la lacasa del basidiomiceto *Coriopsis gallica* (*cglcc1*) en la levadura de interés industrial *Kluyveromyces lactis* (carente de actividad celolítica), obteniendo la proteína extracelular y activa en medio sólido. La actividad ligninolítica de dicha enzima, verificada sobre una pasta kraft de *P. radiata*, ha puesto de manifiesto la capacidad de esta levadura transformada para deslignificar (reducción del 22% de la lignina Klason). La reducción de lignina en pastas de celulosa por microorganismos genéticamente modificados para degradar lignina abre nuevas posibilidades para un blanqueo limpio y eficaz.

Referencias bibliográficas

- ARANA A., TÉLLEZ A., GONZÁLEZ T., GONZÁLEZ A.E., 2002. Aspectos generales de la biodegradación de la madera: aplicaciones industriales de las lacasas. *Bio-Tecnología* 7(3), 40-55.
- BAJPAI P., ANANDA A., BAJPAI P.K., 2007. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. *Biotechnol Ann Rev* 12, 349-378.

- BALAKSHIN M.Y., EVTUGUIN D.V., PASCOAL NETO C., CAVACO-PAULO A., 2001. Polyoxometalates as mediators in the laccase catalyzed delignification. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16, 131-140.
- CALVO A.M., COPA-PATIÑO J.L., ALONSO O., GONZÁLEZ A.E., 1998. Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Corioloropsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Arch Microbiol* 17, 31-36.
- CARBAJO J.M., JUNCA H., TERRÓN M.C., GONZÁLEZ T., YAGÜE S., ZAPICO E., GONZÁLEZ A.E., 2002. Tannic acid induces transcription of laccase gene *cgllc1* in the White-rot fungus *Corioloropsis gallica*. *Can J Microbiol* 48, 1041-1047.
- FARACO V., ERCOLE C., FESTA G., GIARDINA P., PISCITELLI A., SANNIA G., 2008. Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 1329-1335.
- FERMIÑÁN E., DOMÍNGUEZ A., 1997. The KIPHO5 gene encoding acid phosphatase in the yeast *Kluyveromyces lactis* sequencing and transcriptional analysis of the gene, and purification and properties of the enzyme. *Microbiology* 143, 2615-2625.
- GONZÁLEZ A.E., TERRÓN M.C., GONZÁLEZ T., ARANA-CUENCA A., CARBAJO J.M., 2005. Biodegradación de compuestos aromáticos por hongos basidiomicetos. En: *Biotecnología y medioambiente* (Marín I., Sanz J.L., Amils R., eds). Editorial ephemera, Madrid. pp. 90-111.
- HANAHAN S., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Molecular Biol* 166, 557-580.
- ITO H., FUKUDA Y., MURATA K., KIMURA A., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkaline cations. *J Bacteriol* 153, 163-168.
- KIM D., KWAK E., CHOI H.T., 2006. Increase of yeast survival under oxidative stress by the expresión of the laccase gene from *Coprinellus congregatus*. *J Microbiol* 44, 617-621.
- KIRK T.K., YANG H.H., 1979. Partial delignification of unbleached kraft pulp with ligninolytic fungi. *Biotechnol Letters* 9, 347-352.
- KOJIMA Y., TSUKUDA Y., KAWAI Y., TSUKAMOTO A., SIGUIRA 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* 25, 15224-15230.
- LARSSON S., CASSLAND P., JONSON L.J., 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl Environ Microbiol* 67, 1163-1170.
- LI X., KODO R., SAKAI K., 2002. *In vivo* and *in vitro* biobleaching of unbleached hardwood kraft pulp by a marine fungus *Phlebia* sp. MG0-60. En: *Biotechnology in the pulp and paper industry* (Viikari L., Lantto R., eds). Elsevier Science B. pp.185-191.
- MORLINO G.B., TIZZANI L., FLEER R., FRONTALI L., BIANCHI M.M., 1999. Inducible amplification of gene copy number and heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Appl Environ Microbiol* 65, 4808-4813.
- PISCITELLI, A., GIARDINA P., MAZZONI C., SANNIA G., 2005. Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccase in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69, 428-439.
- ROBINSON T., CHANDRAN B., NIGAM P., 2001. Studies on the decolourisation of an artificial textile-effluent by White-rot fungi in N-rich and N-limited media. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57, 810-813.
- RODRÍGUEZ COUTO S., TOCA HERRERA J.L., 2006 Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24, 500-513.
- SALOHEIMO M., NIKU-PAAVOLA M.L., 1991. Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expresión of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. *BioTechnology* 9, 987-990.
- TAVARES A.P.M., GAMELAS J.A.F., GASPAR A.R., EVTUGUIN D.V., XAVIER A.M.R.B., 2004. A novel approach for the oxidative catalysis employing polyoxometalate-laccase system: application to the oxygen bleaching of kraft pulp. *Catalysis Communications* 5, 485-489.
- WESOLOWSKI-LOUVEL M., BREUNING K.D., FUKUHARA H., 1996. *Kluyveromyces lactis*. En: *Nonconventional yeast in biotechnology*. Ed Wolf Springer-Verlag, Berlin, Germany
- WHICKERHAM L.J., 1946. A critical evaluation of the nitrogen assimilation test commonly used in classification of yeast. *J Bacteriol* 52, 293-301.
- WOLFENDEN R.S., WILLSON D.L., 1982. Radical cation as reference chromogens in the kinetic studies of one electron transfer reaction. *J Chem Soc Perkin Trans II*, 805-812.
- YAGÜE S., TERRÓN M.C., GONZÁLEZ T., ZAPICO E., BOCHINI P., GALLETI G.C., GONZÁLEZ A.E., 2000. Biotreatment of tannic-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete *Corioloropsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14, 905-910.