

# LA ENZIMA LACASA: PROPUESTA INNOVADORA PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES DEL MUNICIPIO SANTA CLARA.

Elena Carvajal Ciomina<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-7158-2464>, [elena.carvajal@nauta.cu](mailto:elena.carvajal@nauta.cu)

Ahmed Amaury Ruiz Moré<sup>2</sup>, <https://orcid.org/0000-0003-1838-4607>, [ahmedamaury9@gmail.com](mailto:ahmedamaury9@gmail.com)

Lidia González Méndez<sup>3</sup>, <http://orcid.org/0000-0003-0583-1738>, [lgmendez@nauta.cu](mailto:lgmendez@nauta.cu)

Universidad de Ciencias Médicas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. Dirección de Ciencia e Innovación Tecnológica, Departamento de Investigaciones Biomédicas.

Autor para la correspondencia: [elena.carvajal@nauta.cu](mailto:elena.carvajal@nauta.cu)

## Resumen

La contaminación ambiental es un mal aparejado al desarrollo industrial, mientras no se regulen adecuadamente los desechos. Villa Clara es una provincia cubana cuya capital, Santa Clara, cuenta con múltiples industrias y hospitales potenciales contaminantes. La zona urbana de este municipio es atravesada por varios ríos que muestran señales de deterioro ambiental, producto del vertimiento inconsciente y descontrolado. Existen muchos procedimientos para mitigar la contaminación, entre ellos la biorremediación con microorganismos y enzimas, lo cual en nuestro medio no se ha implementado. Partiendo de lo anterior se hace una revisión exhaustiva de material especializado, para ilustrar y profundizar en la biorremediación de aguas residuales mediante el empleo de la enzima lacasa, una metalo-óxidorreductasa ampliamente representada en el mundo vivo. Esta enzima se ha aplicado libre o inmovilizada, purificada o en extractos crudos. Es muy versátil en la degradación de compuestos fenólicos altamente tóxicos por su baja especificidad de sustrato, lo cual se ha aprovechado para el tratamiento de aguas procedentes de la industria farmacéutica, textil y agrícola. No cabe dudas que estas tecnologías limpias deben implementarse, para que la industria crezca en armonía con el medio ambiente.

Palabras clave: biorremediación, hongos, lacasa, enzima, aguas residuales, antibióticos, colorantes.

## Abstract

Environmental pollution is an evil associated with industrial development, as long as wastes are not adequately regulated. Villa Clara is a Cuban province whose capital, Santa Clara, has multiple industries and potential polluting hospitals. The urban area of this municipality is crossed by several rivers that show signs of environmental deterioration as a result of unconscious and uncontrolled dumping. There are many procedures to mitigate contamination, including bioremediation with microorganisms and enzymes, which has not been implemented in our environment. Based on the above, an exhaustive review of specialized material is made to illustrate and deepen in the bioremediation of wastewater through the use of the laccase enzyme, a metallo-oxidoreductase widely represented in the living world. This enzyme has been applied free or immobilized, purified or in crude extracts. It is very versatile in the degradation of highly toxic phenolic compounds due to its low substrate specificity, which has been exploited for the treatment of water from the pharmaceutical, textile and agricultural industries. There is no doubt that these clean technologies should be implemented in order for the industry to grow in harmony with the environment.

**Key words:** bioremediation, fungi, laccase, enzyme, wastewater, antibiotics, dyes.

## Introducción

El desarrollo de las ciudades junto al desarrollo humano en la producción de bienes y servicios, mediado la industria ha traído por consecuencia serios problemas de contaminación de las aguas, con afectaciones elevadas a los ecosistemas.

La provincia Villa Clara, ubicada en el centro de Cuba, cuenta con un amplio sector industrial, donde Santa Clara, su cabecera municipal, muestra un elevado nivel de contaminación de su sistema acuífero, tanto ríos como aguas subterráneas.

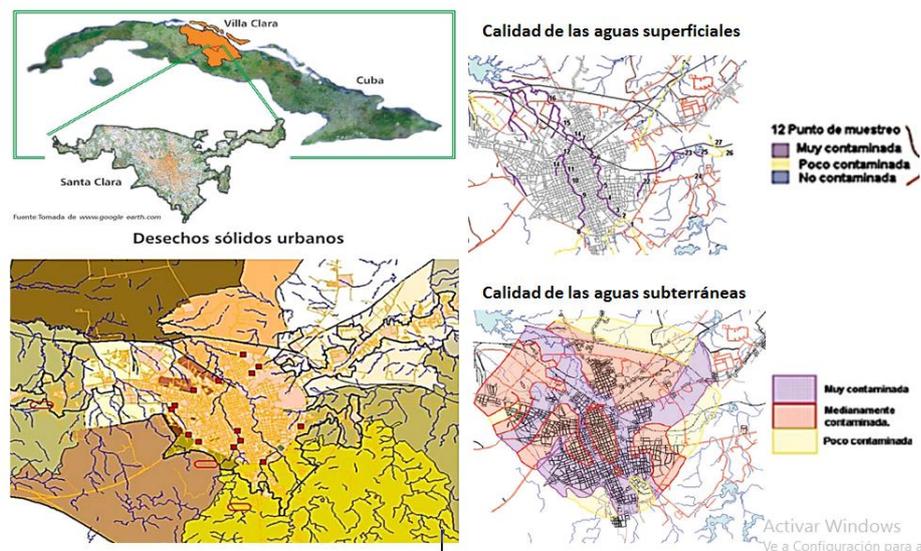


Figura 1. Municipio Santa Clara, Provincia Villa Clara, Cuba.<sup>1</sup> Desechos sólidos urbanos (cuadrados color pardo) y calidad de las aguas superficiales y subterráneas (según leyendas).

Incluso las dificultades en el abastecimiento de agua a la ciudad ha obligado a sus moradores a la construcción de pozos de manera manufacturada, lo cual aporta agua de dudosa calidad para el consumo humano. Sin menospreciar los ríos, cuyos afluentes atraviesan la ciudad, y muestran evidencias macroscópicas de contaminación.



Figura 2. Vistas del río Bélico, que atravieza la ciudad de Santa Clara, y es centro de vertimiento de residuos domésticos. Tomada por el autor.

Una de las tareas de la biotecnología moderna es el desarrollo de herramientas innovadoras para corregir tales efectos, de modo que debe centrar sus esfuerzos en la gran diversidad de moléculas contaminantes vertidas a las aguas, originadas tanto en el hogar como en la industria,<sup>2</sup> así como herbicidas, colorantes sintéticos, plásticos, fertilizantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos. Súmese a esta lista otros contaminantes llamados emergentes, relacionados con productos farmacéuticos (antibióticos, analgésicos, hormonas y disruptores endocrinos).<sup>3</sup>

Para el tratamiento de estos contaminantes se han implementado diferentes métodos físicos y químicos, entre ellos el empleo de una enzima muy versátil: la Lacasa.<sup>4</sup>

Lo anterior conformó las bases para profundizar y promocionar las aplicaciones de las Lacasas en la biorremediación enzimática de las aguas residuales, con el fin central de diseñar proyectos de investigación para su implementación en nuestro medio. Para cumplimentar lo anterior se realiza un exhaustivo análisis de la información encontrada en múltiples sitios especializados de internet, con la ayuda de buscadores como Google.

- **La Lacasa: una breve descripción de su estructura y función.**

Las Lacasas pertenecen a la familia de enzimas multicobre oxidasas (MCOs), son clasificadas como bencenediol oxígeno reductasas (EC 1.10.3.2) y son también conocidas como *p*-difenol oxidasas.<sup>5</sup> Son consideradas enzimas versátiles capaces de oxidar un gran número de compuestos fenólicos y no fenólicos, debido a su baja especificidad de sustrato; utilizando para ello el oxígeno como aceptor de electrones y dando lugar a la formación de agua como subproducto.<sup>6</sup>

- Fuentes de Lacasas útiles en la biorremediación de aguas residuales.

Las lacasas fúngicas fueron las primeras en ser reportadas por Bertrand.<sup>7</sup> Entre las especies de hongos, los basidiomycetes, específicamente *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, y *Coprinus cinereus*, producen varias isoformas de lacasa.<sup>8</sup> Se sabe están involucradas en la esporulación, producción de pigmentos, formación del cuerpo fructificante, defensa a estrés, patogénesis a plantas y degradación de lignina.<sup>9,10</sup>

Las lacasas existen en una variedad de estructuras, la mayoría de ellas son monoméricas, aunque algunas están presentes en formas de homodímeros, heterodímeros y multímeros. Tienen rangos de masa molecular entre 50 a 140 kDa, dependiendo del organismo, aunque una lacasa fúngica típica tendrá un rango de 60 a 70 kDa con un punto isoeléctrico alrededor de pH 4.0. Estas lacasas fúngicas usualmente están glicosiladas,

con un 10 a más de un 30% de aumento de masa; esta porción asegura la estabilidad conformacional de la enzima y la protege de la proteólisis y la inactivación por radicales.<sup>11</sup> El potencial redox ( $E^\circ$ ) de las lacasas tiene una relación directa con la energía requerida para remover un electrón del sustrato reductor, constituyendo una de las características fundamentales de estas enzimas. Por lo tanto, las lacasas con altos  $E^\circ$ , como las fúngicas son de especial interés para las biotecnologías, ya que son capaces de oxidar sustratos que también tengan altos  $E^\circ$  ( $E^\circ > 400$  mV).<sup>12</sup> Estas lacasas contribuyen a la biorremediación a través de la oxidación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), plásticos y compuestos fenólicos, colorantes, y la degradación de compuestos farmacéuticamente activos, entre otros.<sup>13-18</sup>

Dado que las lacasas del hongo de raíz blanca tienen potencial para degradar compuestos fenólicos, diversos estudios han involucrado su inmovilización para remover fenol,<sup>19</sup> y cloranfenicol (uno de los micro-contaminantes más persistentes en las aguas residuales de la industria farmacéutica y los hospitales).<sup>20</sup>

El campo de las lacasas de fuentes naturales de hongos fracasa ante la industria, a veces por la producción silente de dichas enzimas en dichos microorganismos, su baja concentración o la presencia de isoenzimas, de las cuales solo una es la de interés, de ahí que la expresión heteróloga de lacasas sea una alternativa promisorio.<sup>21-23</sup>

La expresión heteróloga de muchas lacasas fúngicas se ha reportado en bacterias como *E. coli*, levaduras como *Pichia pastoris* y *Yarrowia lipolytica*,<sup>21</sup> hongos filamentosos<sup>17</sup> como *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, y *Trichoderma atroviride*<sup>24</sup> y plantas como *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*.<sup>22</sup> Así, las lacasas fúngicas recombinantes han sido ampliamente aplicadas en la biorremediación.<sup>22-25</sup>

#### - Estructura de las Lacasas.

Las Lacasas son multicobre oxidasas (MCOs), con cuatro átomos de cobre: uno tipo-1, uno tipo-2, y dos tipo-3, todos formando su sitio catalítico (Fig. 3). Son miembros de la superfamilia de las cupredoxinas, pero multi-dominio. Esta familia se caracteriza por el plegamiento cupredoxina, que consiste de dos hojas  $\beta$  ordenadas en una conformación de barril Greco, este motivo tiene al menos siete cadenas  $\beta$  antiparalelas torcidas para formar una estructura en barril cerrado, en la cual algunas cadenas están adyacentes en el espacio pero no en secuencia.<sup>26</sup>

La clasificación de los átomos de cobre está basada en el ambiente del ion metálico y sus características espectroscópicas; T1: cobre “azul” paramagnético, con una absorbancia a 610 nm, T2: cobre “no azul” paramagnético, y T3: un par cobre-cobre acoplado por espín

diamagnético, con una absorbancia a 330 nm.<sup>27</sup> El cobre T1 tiene el mayor  $E^\circ$  y es el sitio de oxidación del sustrato. El cobre tipo-2 y los dos tipo-3 forman un clúster, donde el oxígeno molecular es reducido, y el agua es liberada. Los átomos de cobre tipo-2 y 3 son coordinados por His de las cadenas laterales (T2 por dos de ellos y T3 por seis) (Fig. 3). Un puente hidroxilo mantiene el acoplamiento antiferromagnético entre los átomos de cobre T3.<sup>28</sup>

Las lacasas comúnmente contienen tres dominios homólogos de cupredoxina. Sus sitios de cobre mononuclear están formados en la interface entre los dominios 1 y 3.<sup>26</sup>

En las lacasas con esta tipología, la función del dominio 2 es juntar adecuadamente los dominios 1 y 3, permitiendo la formación del clúster trinuclear.<sup>29</sup> En contraste, en las lacasas de dos dominios, presentes en las bacterias (pequeñas lacasas), sus sitios de cobre mononucleares existen en los dominios 1 o 2, pero para la formación de su clúster trinuclear necesitan oligomerizar como homotrímeros, generando su sitio catalítico hacia la interfase entre el dominio 1 de un monómero y el dominio 2 del otro monómero.<sup>29</sup> En ambos casos, la distancia y la posición relativa entre los cobres T1 y el clúster son conservados; cercano a 12 Å en todas las lacasas.<sup>26</sup>

Hay varias hipótesis sobre la evolución de las lacasas; todas las cuales consideran que el dominio cupredoxina, con un átomo de cobre en su estructura, se desarrolló en diferentes formas de MCOs, incluyendo dicianina, ascorbato oxidasa, nitrito reductasa, ceruloplasmina, SLACs, y las lacasas de tres dominios.<sup>27</sup>

En hongos han sido estudiadas fundamentalmente lacasas de tres dominios, también observadas en algunas bacterias, archaea, plantas e insectos.<sup>30</sup> Las lacasas son consideradas proteínas pluriempleo (moonlighting) debido a sus múltiples actividades biológicas.<sup>31</sup> Una detallada descripción del mecanismo molecular de la oxidación de sustratos en el sitio T1, la transferencia de electrones intramolecular al clúster trinuclear ubicado a 12 Å, y la reducción de oxígeno a agua; son brindados por Sitarz et al.<sup>32</sup> Ahí muestra la complejidad y sutileza de la vía de reacción de la enzima. Estos mecanismos involucran un bolsillo de unión del sustrato,<sup>33</sup> el cuál confiere adecuada selectividad y también afecta la  $E^\circ$  por encaje inducido en el centro activo.

Lo característico de las lacasas que hacen nombrar su actividad biológica como “catálisis verde” es que pueden oxidar diferentes sustratos con solo requerir moléculas de oxígeno como reactantes, y producir agua como subproducto. La estructura del sistema molecular es compleja, involucra la estructura de ésta proteína así como los restos de carbohidratos como soportes a la estabilización<sup>33</sup> y la coadyuvante funcional que incluye la estructura de

las moléculas de agua, un arreglo C-terminal, el estado de coordinación de los átomos de cobre, la transferencia de electrones a través de las cadenas principal y lateral, y mediadores.<sup>34</sup> Además, la composición del solvente es también una determinante en la estabilidad de la lacasa, por ejemplo la presencia de compuestos polihidroxilados.<sup>35</sup>

Aquí cabe mencionar el interés de implementar el silicato de sodio comercial procedente de la Empresa Electroquímica de Sagua la Grande, compuesto relativamente inerte que forma grandes cadenas polihidroxiladas, que puede contribuir a dar estabilización de soluciones de lacasa semi o totalmente purificadas. Además pudiera incursionarse en la inmovilización de la mencionada enzima, con el empleo del silicato comercial, y abrir una brecha más en la diversificación de la mencionada industria. Se cuenta, además, con un Departamento de Biología, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central Marta Abreu que pueden aportar las especies biológicas; y el grupo inNOVAcEnz, en la Universidad de Ciencias Médicas que trabaja enzimas redox.

Se han empleado diversas propuestas para el manejo de tales complejidades en el desarrollo de lacasas específicas para procesos de biorremediación dirigidas a diversas industrias.<sup>36</sup> Estas propuestas pueden ser clasificadas como racional (predicción informática basada en modelación molecular, mecánica cuántica, y simulaciones de dinámica molecular),<sup>36</sup> semi-razional (ensayos experimentales de prueba/error con mutantes), análisis de estructuras quiméricas e inmovilización de lacasa,<sup>36,37</sup> y la reciente biología sintética.<sup>38</sup>

Estas propuestas han producido eficazmente lacasas mutantes o derivados con potenciada estabilidad a la temperatura o solventes orgánicos; actividades astringidas al desarrollo de especificidad para ciertos sustratos; mayores  $E^{\circ}$  en el sitio T1, potenciado por expresión heteróloga, el cambio de perfiles de actividad con el pH, y la tolerancia a inhibidores químicos. En términos estructurales estas implementaciones fueron llevadas a cabo modificando los grupos funcionales en el sitio de unión del sustrato y los de coordinación de los cobres T1,<sup>39</sup> así como la introducción de mutaciones estabilizantes en el dominio interface.<sup>40</sup>

#### - Mecanismo de acción de las lacasas

La búsqueda de soluciones ambientales y para la industria, con la aplicación potencial de las lacasas en diferentes procesos biocatalíticos ha aumentado el interés por conocer su mecanismo de acción.

En general, se conoce que las lacasas oxidan un amplio rango de sustratos; típicamente fenoles sustituidos y aminas aromáticas, los cuales son transformados en radicales

libres.<sup>41</sup> Inestables productos químicos y radicales libres generados, inician reacciones en cadena que conducen a complejas transformaciones químicas de relevancia biológica tales como la síntesis y degradación de lignina.<sup>42</sup>

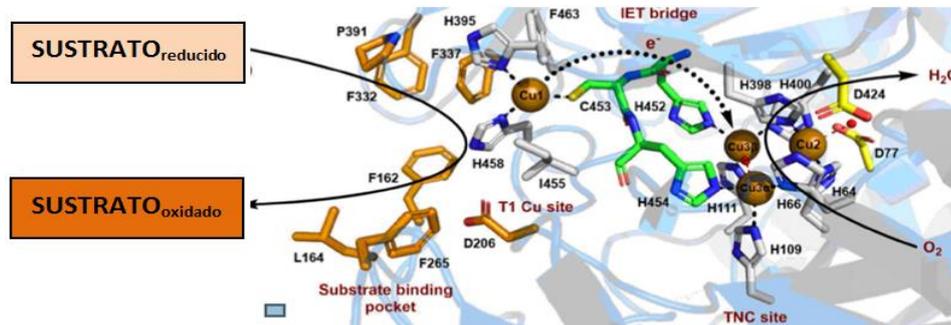


Figura 3. Mecanismo general de oxidación de sustratos por las lacasas. A la izquierda representación del sitio activo con el cobre T1 y el clúster trinuclear, en sus ambientes de coordinación representados por aminoácidos en modelos de bastones. Modificado de: Arregui et al. (2019).<sup>43</sup>

La reacción global de la lacasa involucra un electrón ( $1e^-$ ), oxidaciones secuenciales de cuatro moléculas de sustrato reducido, con las reducciones de dos dobles electrones ( $2 \times 2e^-$ ) de átomos de oxígeno para formar las respectivas moléculas de agua. Esto incluye un paso de transferencia interna de electrones (IET), asistida por los iones cobre catalíticos localizados en los sitios Cu-T1 y el clúster trinuclear (TNC) Cu-T2 / Cu $\alpha$ -T3 / Cu $\beta$ -T3.<sup>44</sup> La altamente conservada naturaleza de los 11 residuos (una Cys y 10 His) que forman los sitios de cobre T1 y el TNC en las lacasas, y en general todas las MCOs, explica su rol esencial en la actividad catalítica.<sup>45</sup>

Otros residuos altamente conservados juegan importantes roles en el reconocimiento y acomodamiento de los sustratos, IET desde el ion cobre T1 hasta el sitio TNC, y la reducción de átomos de oxígeno en dicho sitio. Como una regla, estos residuos están localizados en la vecindad de sus respectivos sitios de acción.<sup>46</sup>

A pesar de estos avances en el entendimiento de la actividad de las lacasas en términos de estructura-función aún quedan muchos aspectos por discernir, lo que si está claro que su diversidad se debe a procesos evolutivos donde los diferentes organismos han tenido que ajustar sus maquinarias moleculares para adaptarse al medio circundante.<sup>47</sup>

Dado la versatilidad catalítica de la lacasa, se han introducido novedosas herramientas tecnológicas tomando como base el análisis teórico de su estructura y mecanismos de acción.

- Aplicaciones de las Lacasas en la biorremediación de agua.

Hay más de 15 productos comerciales basados en lacasa, utilizados en las industrias textil, de alimentos y del papel, los cuales reflejan la viabilidad de su uso industrial.<sup>48</sup>

A continuación se ofrece un resumen sobre la ingeniería de lacasas de hongos, plantas y bacterias, en la biorremediación de aguas residuales.

#### I) Empleo de lacasas fúngicas:

En compuestos de la industria farmacéutica se han empleado la lacasa del *Pycnoporus sanguineus* que participa en la degradación de estrógenos con un 96% de eficiencia. Se sugiere un mecanismo de hidroxilación de los estrógenos.<sup>49</sup> Por otro lado, la lacasa de *Trametes versicolor* participa en la degradación de diclofenaco, trimetoprim, carbamacepina y sulfametoxazol con las respectivas eficiencias: 100, 95, 85 y 56%.<sup>50</sup> También se ha reportado la lacasa de *Trametes hirsuta* en la degradación de cloranfenicol, para ello se plantea como mecanismo la deshalogenación y la oxidación del cloranfenicol para formar el cloranfenicol-aldehído que no fue tóxico.<sup>20</sup>

Otro ejemplo es la lacasa de *Trametes versicolor*, que fue implementada para la degradación de clortetraciclina en un 60% por 2 horas. Este contaminante se considera recalcitrante y es sometido por la enzima a una oxidación de los enlaces C-C y C-O.<sup>51</sup>

Aplicado a compuestos plásticos, de protección a la salud y herbicidas se ha empleado la lacasa de *Pycnoporus sanguineus* que participa en el 100 % de la degradación del disruptor endocrino bisfenol A, en menos de 24 horas. Se plantea que el producto final es el 4-isopropenilfenol.<sup>13</sup> Otra lacasa, una recombinante de *Trametes sanguineus* en *Trichoderma atroviride*, intervino en la degradación de compuestos xenobióticos procedentes de aguas residuales de una industria de biocombustibles, como el fenantreno y el benzo [α] pireno, con una remoción del 97 y 99% respectivamente.<sup>24</sup>

Aplicado a los colorantes rosa Bengala, naftol azul, rojo congo, metil naranja, bromocresol verde, bromocresol azul, bromocresol morado y rojo fenol, se ha empleado la lacasa de *Ganoderma lucidum* E47.<sup>15</sup> También se ha implementado la lacasa recombinante (Lcc IIIb) de *Trametes versicolor* expresada en *Yarrowia lipolytica*, para degradar bromocresol morado, safranina, verde malaquita, violeta cristal, bromotimol azul, nigrosina y rojo fenol. La decoloración de estos colorantes fue seguida espectrofotométricamente.<sup>23</sup>

Es importante acotar que en todos los casos los hongos fueron cultivados bien a escala de laboratorio (placas Petri o erlenmeyers) o en diferentes tipos de bioreactores (a pequeña escala o mayores).

#### II) Empleo de lacasas vegetales:

La lacasa de *A. densiflorus*, contribuyó a remover la acumulación del colorante Rubina GFL (40 mg/L) hasta un 91% en 48 horas. Por su parte, el tejido de la raíz mostró actividades enzimáticas como: lacasa (138%), lignina peroxidasa (129%), riboflavina reductasa (111 %), DCIP reductasa (47 %), tirosinasa (26 %) y azo reductasa (18 %). Se ha propuesto la ruptura oxidativa y la desaminación del colorante, con demostrada reducción de la fitotoxicidad del producto obtenido.<sup>52</sup> Otro ejemplo es la lacasa de *Tagetes patula*, *Aster amellus*, *Portulaca grandiflora* y *Gaillardia grandiflora*, para el tratamiento de efluentes textiles, con reducciones hasta el 73 % de los colorantes.<sup>53</sup>

Suspensiones celulares de *Pichia pastoris* expresan las lacasas recombinantes de *Oryza sativa*, que participaron en la modificación y detoxificación de los herbicidas atrazina e isoproturon.<sup>54</sup>

### III) Empleo de lacasas bacterianas:

Para degradar compuestos farmacéuticos se ha empleado la lacasa recombinante de *Yersinia enterocolitica* expresada en *E.coli*, que degrada el diclofenaco por hidroxilación en las posiciones 4' o 5' del segundo anillo bencénico.<sup>55</sup> De similar manera, la lacasa de *Streptomyces mutabilis* A17, participa en la degradación de los antibióticos familia de las sulfas: sulfadiazina y sulfatiazol, con remociones de 73 y 90 %, respectivamente.<sup>56</sup>

En la industria de los colorantes ha sido muy eficaz el uso de la lacasa recombinante de *Klebsiella pneumoniae* expresada en *E. coli*, para la decoloración de colorantes sintéticos. Se probaron 10 colorantes y todos fueron oxidados eficientemente tanto en las condiciones acídicas como neutrales.<sup>57</sup> Otra implementada fue la lacasa recombinante de *E. coli* K-12 CueO expresada en *Pichia pastoris*, que decolora colorantes sintéticos como el rojo Congo, el verde malaquita y el azul brillante R.<sup>58</sup> Otra con muy alta la eficiencia frente a los colorantes azo, antraquinónicos, trifenilmetano y los heterocíclicos aromáticos fue la lacasa recombinante y mutante WLF de *Bacillus pumilus* expresado en *E. coli*.<sup>59</sup> También se han cultivado esporas en suspensión, para la obtención de lacasa de *Bacillus safensis* S31, que inactiva el verde malaquita, azul toluidina y reactivo negro 5.<sup>60</sup>

En la industria del plástico y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) se ha empleado la lacasa recombinante CotA de *Bacillus subtilis* expresada en *E.coli*, expresada en presencia de IPTG. Esta degrada el antraceno, pireno, benzo[ $\alpha$ ]pireno, fenantreno, fluoranteno, etc.<sup>61</sup>

### Conclusiones.

Las lacasas, dado su baja especificidad de sustrato y propiedades redox, tienen la capacidad de oxidar múltiples compuestos aromáticos, entre ellos colorantes, herbicidas,

antibióticos, anti-inflamatorios e hidrocarburos policíclicos aromáticos. Proceden de fuentes variadas como bacterias, hongos y plantas. Pueden emplearse como extractos crudos o purificadas, en biorreactores a escala de laboratorio o industrial. Dado el potencial contaminante de las industrias, hospitales y sector urbano en Santa Clara, se hace imperiosa la introducción de tecnologías de biorremediación que empleen estas versátiles enzimas: las lacasas

## Referencias Bibliográficas

1. Perspectivas del medio ambiente urbano. Geo Santa Clara. Colectivo de autores. Editorial Academia: La Habana; 2008:pp162.
2. Chatha S, Asgher M, Iqbal H. Enzyme-based solutions for textile processing and dye contaminant biodegradation—a review. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017;24:14005–18.
3. Bilal M, Asgher M, Parra R, Hu H, Wang W, Zhang X, Iqbal H. Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants—a review. *Sci Total Environ* 2017;576:646–59.
4. Rodríguez M, Orona C, García R, Hernandez C, Parra R, Mahlknecht J, Ornelas N. Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwaters by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. *Int Biodeter Biodegr* 2016;108:34–41.
5. Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol* 2016;24:219–26. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tibte.ch.2006.03.006>.
6. Upadhyay P, Shrivastava R, Agrawal P. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech* 2016;6:15.
7. Bertrand G. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *CR Hebd Seances Acad Sci* 1896;123:463–5.
8. Kiliç N, Nasiri F, Cansaran D. Fungal laccase enzyme applications in bioremediation of polluted wastewater. *Phytoremediation*. New York: Springer; 2016. p. 201–9.
9. Thurston C. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 1994;140:19–26. Disponible en: <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>.
10. Alcalde M. Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In: Polaina J, MacCabe A, editors. *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Dordrecht: Springer; 2007. p. 461–76.
11. Morozova O, Shumakovich G, Gorbacheva M, Shleev S, Yaropolov A. “Blue” laccases. *Biochemistry* 2007;72:1136–50.
12. Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresour Bioprocess* 2018;5:4.

13. Barrios C, de Jesús M, Parra A, Belleville M, Sanchez J, Iqbal H et al. Potentialities of active membranes with immobilized laccase for bisphenol A degradation. *Int J Biol Macromol* 2018;108:837–44.
14. Simões M, Maiorano A, dos Santos J, Peixoto L, de Souza R, Neto A, Brito A, Ottoni C. Microbial fuel cell-induced production of fungal laccase to degrade the anthraquinone dye remazol brilliant blue R. *Environ Chem Lett* 2019.
15. Palazzolo M, Postemsky P, Kurina M. From agro-waste to tool: biotechnological characterization and application of *Ganoderma lucidum* E47 laccase in dye decolorization. *3 Biotech* 2019;9(6):213.
16. Iark D, dos Reis A, Garcia J, Côrrea V, Helm C, Corrêa R et al. Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*. *Bioresour Technol* 2019.
17. Garcia L, Lacerda M, Thomaz D, de Souza J, Pereira M, de Souza G et al. Optimization of laccase-alginate-chitosan based matrix toward 17  $\alpha$ -ethinylestradiol removal. *Prep Biochem Biotechnol* 2019;49:375–83.
18. Singh S, Khajuria R, Kaur L. Biodegradation of ciprofloxacin by White rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *3 Biotech*. 2017;7(1):69.
19. Carabajal M, Perullini M, Jobbágy M, Ullrich R, Hofrichter M, Levin L. Removal of phenol by immobilization of *Trametes versicolor* in silica–alginate–fungus biocomposites and loofa sponge. *CLEAN Soil Air Water* 2016;44:180–8.
20. Navada K, Kulal A. Enzymatic degradation of chloramphenicol by laccase from *Trametes hirsuta* and comparison among mediators. *Int Biodeter Biodegr* 2019;138:63–9.
21. Pardo I, Rodríguez D, Aza P, De Salas F, Martínez A, Camarero S. A highly stable laccase obtained by swapping the second cupredoxin domain. *Sci Rep* 2018;8:15669.
22. Wang B, Yan Y, Xu J, Fu X, Han H, Gao J et al. Heterologous expression and characterization of a laccase from *Laccaria bicolor* in *Pichia pastoris* and *Arabidopsis thaliana*. *J Microbiol Biotechnol* 2018;28:2057–63.
23. Darvishi F, Moradi M, Jolivalt C, Madzak C. Laccase production from sucrose by recombinant *Yarrowia lipolytica* and its application to decolorization of environmental pollutant dyes. *Ecotox Environ Safe* 2018;165:278–83.
24. Balcázar E, Méndez L, Batista R, Esquivel U, Ayala M, Kumar V et al. Xenobiotic compounds degradation by heterologous expression of a *Trametes sanguineus* laccase in *Trichoderma atroviride*. *PLoS ONE* 2016;11:e0147997.
25. Campos P, Levin L, Wirth S. Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFC 463. *Process Biochem* 2016;51:895–903.

26. Hakulinen N, Rouvinen J. Three-dimensional structures of laccases. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:857–68. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1827-5>.
27. Mot A, Silaghi R. Laccases: complex architectures for one-electron oxidations. *Biochemistry* 2012;77:1395–407.
28. Claus H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 2004;35:93–6.
29. Chauhan P, Goradia B, Saxena A. Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech* 2017;7:323.
30. Geng A, Wu J, Xie R, Li X, Chang F, Sun J. Characterization of a laccase from a wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus*. *Insect Sci* 2016;25:251–8.
31. Roberts S, Weichsel A, Grass G, Thakali K, Hazzard J, Tollin G et al. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:2766–71.
32. Sitarz A, Mikkelsen J, Meyer A. Structure, functionality and tuning up of laccases for lignocellulose and other industrial applications. *Crit Rev Biotechnol* 2016;36:70–86.
33. Ernst H, Jørgensen L, Bukh C, Piontek K, Plattner D, Østergaard L et al. A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases. *PLoS ONE* 2018;13:e0206589.
34. Azimi M, Nafissi N, Mogharabi M, Faramarzi M, Aboofazeli R. Study of laccase activity and stability in the presence of ionic and nonionic surfactants and the bioconversion of indole in TX-100 system. *J Mol Catal B Enzym* 2016;126:69-75.
35. Kang C, Ren D, Zhang S, Zhang X, He X, Deng Z, Huang C, Guo H. Effect of polyhydroxyl compounds on the thermal stability and structure of laccase. *Pol J Environ Stud* 2019;28:3253–9. Disponible en: <https://doi.org/10.15244/pjoes/94839>.
36. Mehra R, Muschiol J, Meyer A, Kepp K. A structural-chemical explanation of fungal laccase activity. *Sci Rep* 2018;8:17285.
37. Drozd R, Rakoczy R, Wasak A, Junka A, Fijałkowski K. The application of magnetically modified bacterial cellulose for immobilization of laccase. *Int J Biol Macromol* 2018;108:462–70.
38. Mateljčak I, Rice A, Yang K, Tron T, Alcalde M. The generation of thermostable fungal laccase chimeras by SCHEMA-RASPP structure-guided recombination *in vivo*. *ACS Synth Biol* 2019;8:833–43. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00509>.
39. Mate D, Alcalde M. Laccase engineering: from rational design to directed evolution. *Biotechnol Adv* 2015;33:25–40.
40. Herrera L, Millán C, Viniegra G, Villegas E, Arregui L, Rojo A. Molecular dynamics on laccase from *Trametes versicolor* to examine thermal stability induced by salt bridges. *Chem Phys* 2019;517:253–64.
41. Lassouane F, Aït H, Amrani S, Rodriguez S. A promising laccase immobilization approach for bisphenol A removal from aqueous solutions. *Bioresour Technol* 2019;271:360–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.129>.

42. Llevot A, Grau E, Carlotti S, Grelier S, Cramail H. Selective laccase catalyzed dimerization of phenolic compounds derived from lignin: towards original symmetrical bio-based (bis) aromatic monomers. *J Mol Catal B Enzym* 2016;125:34–41.
43. Arregui L, Ayala M, Gomez X, Gutierrez G, Hernandez C, Herrera M et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb Cell Fact* 2019;18:200. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
44. Polyakov K, Gavryushov S, Ivanova S, Fedorova T, Glazunova O, Popov A et al. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: insights into the reaction mechanism. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 2017;73(Pt. 5):388–401.
45. Gabdulkhakov A, Kostareva O, Kolyadenko I, Mikhaylina A, Trubitsina L, Tishchenko S. Incorporation of copper ions into T2/T3 centers of two-domain laccases. *J Mol Biol* 2018;52:23–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1134/S0026893318010041>.
46. Kjaergaard C, Jones S, Gounel S, Mano N, Solomon E. Two-electron reduction versus one-electron oxidation of the type 3 pair in the multicopper oxidases. *J Am Chem Soc* 2015;137:8783–94. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jacs.5b04136>.
47. Wu M, Lee C, Hsiao A, Yu S, Wang A, Ho T. Kinetic analysis and structural studies of a high-efficiency laccase from *Cerrena* sp. RSD 1. *FEBS Open Bio*. 2018;8:1230–46.
48. Rodríguez S. Fungal laccase: a versatile enzyme for biotechnological applications. En: Yadav A, Mishra S, Singh S, Gupta A, editores. Recent advancement in white biotechnology through fungi. *Fungal biology*. Cham: Springer; 2019. p. 429–57.
49. Golveia J, Santiago M, Sales P, Sartoratto A, Ponezi A, Thomaz D et al. Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) residue and its potential application in the bioremediation of 17- $\alpha$ -ethinylestradiol as a *Pycnoporus sanguineus* laccase inducer. *Prep Biochem Biotechnol*. 2018;48(6):541–8.
50. Alharbi S, Nghiem L, van de Merwe J, Leusch F, Asif M, Hai F et al. Degradation of diclofenac, trimethoprim, carbamazepine, and sulfamethoxazole by laccase from *Trametes versicolor*: transformation products and toxicity of treated effluent. *Biocatal Biotransform*. 2019.
51. Pulicharla R, Das R, Brar S, Drogui P, Surampalli R. Degradation kinetics of chlortetracycline in wastewater using ultrasonication assisted laccase. *Chem Eng J*. 2018;347:828–35. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.162>.
52. Watharkar A, Kadam S, Khandare R, Kolekar P, Jeon B, Jadhav J et al. *Asparagus densiflorus* in a vertical subsurface flow phytoreactor for treatment of textile effluent: a lab to land approach for in situ soil remediation. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018;161:70–7.
53. Chandanshive V, Kadam S, Khandare R, Kurade M, Jeon B, Jadhav J et al. *In situ* phytoremediation of dyes from textile wastewater using garden ornamental plants, effect on soil quality and plant growth. *Chemosphere*. 2018;210:968–76.

54. Huang M, Lu Y, Zhang S, Luo F, Yang H. Rice (*Oryza sativa*) laccases involved in modification and detoxification of herbicides atrazine and isoproturon residues in plants. *J Agric Food Chem*. 2016;64:6397–406.
55. Singh D, Rawat S, Waseem M, Gupta S, Lynn A, Nitin M et al. Molecular modeling and simulation studies of recombinant laccase from *Yersinia enterocolitica* suggests significant role in the biotransformation of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;469:306–12.
56. Reda F, El-Mekkawy R, Hassan N. Detoxification and bioremediation of sulfa drugs and synthetic dyes by *Streptomyces mutabilis* A17 laccase produced in solid state fermentation. *J Pure Appl Microbiol*. 2019;13(1):85–96.
57. Liu Y, Huang L, Guo W, Jia L, Fu Y, Gui S et al. Cloning, expression, and characterization of a thermostable and pH-stable laccase from *Klebsiella pneumoniae* and its application to dye decolorization. *Process Biochem*. 2017;53:125–34.
58. Ma X, Liu L, Li Q, Liu Y, Yi L, Ma L et al. High-level expression of a bacterial laccase, CueO from *Escherichia coli* K12 in *Pichia pastoris* GS115 and its application on the decolorization of synthetic dyes. *Enzyme Microb Technol*. 2017;103:34–41.
59. Luo Q, Wang K, Liao X, Guan Z, Chen Y, Cai Y et al. Functional expression enhancement of *Bacillus pumilus* CotA-laccase mutant WLF through site-directed mutagenesis. *Enzyme Microb Technol*. 2018;109:11–9.
60. Siroosi M, Amoozegar M, Khajeh K, Dabirmanesh B. Decolorization of dyes by a novel sodium azide-resistant spore laccase from a halotolerant bacterium, *Bacillus safensis* sp. strain S31. *Water Sci Technol*. 2018;77(12):2867–75.
61. Zeng J, Zhu Q, Wu Y, Lin X. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons using *Bacillus subtilis* CotA with high laccase activity and copper independence. *Chemosphere*. 2016;148:1–7.