



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

ITM

TESIS

**ESTUDIO DEL SISTEMA LACASA-MEDIADOR PRODUCIDO
POR *Trametes hirsuta* BM2 EN LA DECOLORACIÓN DE
TINTES INDUSTRIALES**

PARA OPTAR AL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
I.I.A SOCORRO DIAZ DE LEON YANEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. SARA ELENA SOLÍS PEREIRA

**21 SEPTIEMBRE DE 2018
MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.**

DEDICATORIA

*A mis padres Ángela Sofía y Lucio,
por brindarme su amor,
porque ellos son la razón de mi vida,
por sus consejos,
su apoyo incondicional
y su paciencia,
todo lo que soy es gracias a ellos.*

*A mi hermana Angélica,
por su apoyo incondicional
y siempre estar conmigo.*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por permitirme tener vida, salud y poder realizar uno de mis propósitos de estudiar MC.

A mi asesora, la Dra. Sara Solís, por aceptarme en el proyecto y apoyarme cada día en la continuación del mismo, por su paciencia y conocimiento brindado. Gracias por el tiempo que me dedico, por su comprensión.

A mis revisores, el Dr. Gabriel Lizama y la Dra. Susana Rincón Arriaga por la disposición y sus aportaciones en mis tutoriales y en este documento.

Al Dr. Alejandro Zepeda Pedreguera, por dedicarme de su tiempo para explicarme y darme herramientas para poder trabajar mejor el tema y sus aportaciones en mis tutoriales.

A mis padres agradecerle todo lo que soy y por apoyarme en esta decisión y por cuidar a "Nino", a mi hermana por estar pendiente de mí.

Al Instituto Tecnológico de Mérida y al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Microbiana por las instalaciones para la realización de este proyecto. A mis compañeros de generación Lenny y Ezequiel, por ser buenos amigos y apoyarnos en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio, Geovanny, Alejandrina, Paola y Dra. Wendy por su apoyo y amistad. A Vicky y Gaby, por su gran amistad a pesar del poco tiempo de conocernos. Dr. Alex y M.C Jesús por la amistad, sus conocimientos en sus clases y tiempo en apoyarme en mis dudas.

A mi amiga Denisse por apoyarme en mis ocurrencias, acompañarme para no sentirme sola y por su cariño, a su familia que me hicieron sentir querida en este lugar tan lejos de mi Familia, por todo su apoyo incondicional y por su amistad.

A mi amiga Lenny, porque desde el primer día me brindaste tu amistad, por nuestros paseos para conocer Mérida y por siempre estar presente con tu amistad.

Al Laboratorio de Instrumentación Analítica, por prestarme sus instalaciones, MC. Abraham Can Cauich, gracias por el apoyo para la realización de análisis.

Al Tecnológico Nacional de México por el Programa "1000 Jóvenes en la ciencia" y a la Dra. Elizabeth de la Luz por apoyarme en entrar al postgrado y que me otorgaran la beca Conacyt.

Al CONACYT por la beca brindada 498394 y al Proyecto Conacyt PDCPN 2014-248295.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	
VIII	
ABSTRACT	IX
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Efluentes textiles	3
2.2 Clasificación de tintes	5
2.3 Hongos ligninolíticos	10
2.4 Lacasa	13
2.5 Mecanismo de acción de las lacasas.....	16
2.6 Mediadores redox	17
2.6.1 Mecanismos de acción de mediadores redox.....	19
2.6.2 Mediadores redox de origen sintético	22
2.8 Mediadores redox de origen natural.....	24
3 JUSTIFICACIÓN	27
4 OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo general.....	28
4.2 Objetivos específicos	28
5 MATERIALES Y METODOS	29
5.1 Microorganismo.....	29
5.2 Propagación de la cepa	29
5.3 Preparación del inóculo.....	29
5.4 Producción de lacasas en salvado de trigo.....	29
5.5 Actividad de la enzima lacasa	30
5.6 Determinación de fenoles totales	30
5.7 Cuantificación de proteína	30
5.8 Concentración de lacasas.....	31

5.9 Obtención de los extractos fenólicos ultrafiltrados (CDL).....	31
5.10 Decoloración de tintes industriales por el sistema lacasa-mediador (CDL)	32
5.11 Efecto de la concentración del mediador y del pH en la decoloración de tintes	32
5.12 Decoloración de tintes con el sistema Lacasa-mediador grado reactivo....	33
5.13 Determinación de fenoles por cromatografía líquida de alta presión	33
5.14 Determinación de los productos de la transformación del índigo carmín ...	34
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1 Producción de lacasas y fenoles.....	35
6.2 Evaluación del sistema lacasa-mediador en la decoloración de tintes.....	38
6.3 Efecto de la concentración de CDL en la decoloración de tintes industriales.....	42
6.4 Efecto del pH en la decoloración de tintes con el sistema lacasa/CDL.....	44
6.5 Efecto de mediadores naturales y sintéticos en la decoloración de tintes ...	47
6.6 Identificación y cuantificación de Compuestos derivados de la lignina	53
6.7 Biotransformación del índigo carmín con el sistema L/CDL3.....	57
7 CONCLUSIONES	61
8 REFERENCIAS	62
ANEXOS	71
A. Índice de abreviaturas	71
B. Glosario	74
C. Preparación de medios.....	76
C1. Medio YMPG.....	76
C2. ABTS 5 mM (10 ml).....	76
C3. Solución Folin-Ciocalteu 1:9.....	76
C4. Na ₂ CO ₃ al 7.5%.....	76
D. Sistemas de reacción para cuantificar lacasas y fenoles	77
D1. Actividad de lacasa	77
D2. Cuantificar fenoles.....	77
D3. Curva estándar de fenoles	78
E. Cromatogramas HPLC	79
E1. Cromatogramas de compuestos fenólicos	79

E2. Curva de Calibración de fenoles	80
F. Cromatogramas de la cromatografía de gases masas	81
G. Cromatogramas de la biotransformación del índigo carmín	83
G1. Curva de calibración de Isatina	84
H. Compuestos y reactivos	85

RESUMEN

Los hongos de la podredumbre blanca son capaces de oxidar diversos tipos de tintes sintéticos, como los de tipo azo, antraquinona y trifenilmetano mediante la acción de enzimas inespecíficas como las lacasas, sin embargo la acción de estas enzimas es limitada. La adición de mediadores redox puede mejorar la eficiencia de los procesos de decoloración de tintes, por lo que es importante la obtención de mediadores naturales a partir de fuentes renovables como los residuos lignocelulósicos. En este estudio se produjeron lacasas y compuestos derivados de la lignina (CDL) durante el cultivo del hongo *Trametes hirsuta Bm-2* en salvado de trigo. La máxima producción de enzimas se obtuvo a las 168 h y los CDL de 24, 48 y 72 h de cultivo. Las lacasas mostraron baja capacidad de decoloración de siete tintes de diferente estructura química (15 %), sin embargo, la adición a la lacasa de extractos ultrafiltrados ricos en fenoles CDL2 y CDL3 mejoró la decoloración (20-40 %). La respuesta varió en función del tinte, concentración de CDL y el pH del sistema de reacción logrando remover de 50 a 98 % el color y el tiempo se redujo de 50 a 24 horas. Se evaluó la eficiencia del sistema lacasa-mediadores (SLM) sintéticos y naturales grado reactivo. El ABTS (sintético) mejoró de 0.5 a 2.2 veces la decoloración de tintes, mientras que el siringaldehído aumentó de 0.3 a 5 veces con respecto a la lacasa sola. A diferencia, el SLM/CDL2 mejoró de 4 a 6 veces la decoloración de los tintes polyR-478, rojo congo, remazol brillante y cristal violeta y el SLM/CDL3 de 3 a 10 veces: índigo carmín, verde malaquita y black 5, probablemente debido a un efecto sinérgico de la enzima y los fenoles presentes. Los cromatogramas (HPLC) mostraron monómeros fenólicos con alta concentración de siringaldehído en CDL2 y 4-hidroxibenzaldehído en CDL3 que han demostrado alta eficiencia como mediadores-redox. Durante la biotransformación del índigo carmín con la lacasa sola se acumuló la isatina que es un intermediario tóxico en la degradación del tinte por lacasas, mientras en el tratamiento con el SLM no estuvo presente, lo que sugiere una mayor eficiencia en la biodegradación del tinte. Los resultados muestran el potencial biotecnológico del SLM producido por *Trametes hirsuta Bm-2* para el tratamiento de efluentes de la industria textil.

ABSTRACT

The white rot fungi are capable of oxidizing various types of synthetic dyes, such as the type azo and anthraquinone and triphenylmethane by the action of non-specific enzymes such as the lacasas, however the action of these enzymes is limited. The addition of redox mediators can improve the efficiency of the processes of discoloration of dye, so it is important to obtain natural mediators from renewable sources such as lignocellulosic residues. In this study, there were lacasas and compounds derived from lignin (CDL) during the cultivation of the fungus *Trametes hirsuta* Bm-2 in wheat bran. The maximum enzyme production was get at 168 h and the CDL for 24, 48 and 72 h of cultivation. The lacasas showed low capacity fading of seven dyes of different chemical structure (15%), however, the addition to the lacasa of ultrafiltrate extracts rich in phenols CDL2 and CDL3 improved discoloration (20-40%). The response varied depending on the dye, CDL concentration and pH of the reaction system managing to remove color from 50 to 98% and the time was reduced from 50 to 24 hours. We evaluated the efficiency of the system laccase-mediator (SLM) natural and synthetic reagent grade. ABTS (synthetic) improved from 0.5 to 2.2 times the decolorization of dyes, while the syringaldehyde increased from 0.3 to 5 times over the single lacasa. Unlike, SLM/CDL2 improved from 4 to 6 times the decolorization of dyes polyR-478, congo red, remazol brilliant and crystal violet and the SLM/CDL3 from 3 to 10 times: indigo carmine, malachite green and black 5, probably due to a synergistic effect of enzyme and phenols present. (HPLC) chromatograms showed phenolic monomers with high concentration of syringaldehyde in CDL2 and 4-hidroxibenzaldehido in CDL3 who have demonstrated high efficiency as mediators-redox. During the biotransformation of the indigo Carmine with the lacasa single accumulated the isatin that is an intermediary toxic degradation of the dye by lacasas, while in the treatment with the SLM was not present, suggesting greater efficiency in biodegradation dye. The results show the biotechnological potential of the SLM produced by *T. hirsuta* Bm-2 for treatment of effluent from textile industry.

1 INTRODUCCIÓN

El sector textil representa dos tercios del mercado total de colorantes y emplea grandes volúmenes de agua así como productos químicos que son tóxicos, mutagénicos y cancerígenos, por lo que los efluentes generados representan un serio problema ambiental ([Dos Santos et al., 2015](#)). Para el tratamiento de tintes se han empleado tratamientos físico-químicos como la coagulación, floculación, oxidación con ozono entre otros. No obstante, la mayoría de estas técnicas son costosas y se generan subproductos aún más tóxicos ([Robinson et al., 2001](#)); por lo cual se han explorado otras opciones como la biosorción, la biodegradación aeróbica o anaeróbica y la producción de enzimas que catalizan la decoloración ([Prasad et al., 2011](#)).

Los hongos de la podredumbre blanca son capaces de remover el color de tintes debido a que producen enzimas inespecíficas asociadas a la degradación de la lignina. Estas enzimas oxidan los diferentes sustituyentes y los anillos aromáticos de tintes debido a que éstos tienen una estructura similar a las subunidades de fenilpropano que están presentes en la lignina ([Dashtban et al., 2010](#)). La enzima lacasa (E.C. 1.10.3.2), manganeso peroxidasa (E.C. 1.11.1.13) y lignina peroxidasa (E.C. 1.11.1.14) son las enzimas más estudiadas; sin embargo, otras enzimas como la peroxidasa versátil, cresolasas, catecol oxidasas, glioxal oxidasas, aril-alcohol oxidasas y tirosinasas, también pueden estar implicadas en la degradación de sustratos más sencillos con la producción de radicales libres. Su acción individual, cooperativa o sinérgica permite llevar a cabo el proceso de degradación por vía enzimática para formar intermediarios menos complejos, llegando incluso a la mineralización completa hasta CO₂ y agua ([Fernández et al., 2011](#)).

Aun cuando las lacasas son las enzimas más involucradas en los procesos de biorremediación, su acción se encuentra limitada debido a su bajo potencial redox (0.4-0.8 V) y a la elevada heterogeneidad de componentes en los efluentes en donde las lacasas actúan preferentemente sobre los fenoles ([Majcherczyk et al.,](#)

Capítulo 1. Introducción

[2008](#)). El rango de acción de las lacasas hacia los sustratos puede ser aumentado mediante el uso de moléculas de bajo peso molecular que actúan como mediadores-redox. La descripción del sistema lacasa-mediador amplió enormemente la versatilidad de las lacasas para su aplicación biotecnológica orientada a la degradación de sistemas que contienen diversos compuestos aromáticos recalcitrantes ([Cañas et al., 2010](#)). Se han descrito más de 100 posibles mediadores ([Johannes et al., 2000](#)) pero los más comúnmente utilizados son los mediadores sintéticos como el ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico), el HBT (1-hidroxibenzotriazol) y el ácido violúrico (VIO) que han sido eficientes en algunos procesos de biorremediación ambiental ([Moya-Lobo, 2011](#)). Sin embargo, estos mediadores tienen un precio elevado y propiedades tóxicas, y por otra parte, la enzima puede ser desnaturalizada por la formación de radicales activos. Una alternativa amigable con el medioambiente es el desarrollo de procesos microbianos con hongos de la podredumbre blanca que durante su crecimiento en sustratos con lignina producen lacasas y liberan compuestos fenólicos de diversa naturaleza química. Diversos fenoles derivados de la lignina son eficientes mediadores naturales debido a que generan como intermediarios de la reacción con lacasas, radicales libres con alto potencial redox (1-1.3 V). Algunos de éstos incluyen el ácido vainílico, guayacol, dimetoxifenol y el ácido siríngico entre otros. Recientemente se ha descrito la acción de la acetosiringona entre los mediadores naturales de lacasa más rápidos y eficaces debido a la elevada estabilidad de los radicales libres que se generan ([Martorana et al., 2013](#)).

En este trabajo se estudió el potencial del hongo nativo *Trametes hirsuta* ([Tapia-Tussell, 2011](#); [Zapata-Castillo et al., 2015](#)) en la producción de extractos fenólicos durante su cultivo en salvado de trigo. Se determinó la acción de los extractos que contienen compuestos derivados de la lignina como mediadores-redox en la decoloración de tintes industriales y se identificaron los perfiles de los compuestos por métodos cromatográficos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Efluentes textiles

La industria textil vierte al medio ambiente grandes volúmenes de agua residual que contaminan el medio ambiente debido a su alto contenido de tintes y otros contaminantes. Se estima que 7×10^5 Ton métricas de tintes están disponibles en el mercado y que el 10-30 % se pierden debido a la ineficiencia del proceso de teñido y son descargadas en los efluentes ([Sathiya et al., 2007](#)). El uso de una amplia variedad de colorantes químicos da origen, en periodos cortos de tiempo, a efluentes extremadamente variados en su composición, que requieren de un tratamiento de aguas muy complejo ([Nigam et al., 1996](#); [Kandelbauer et al., 2005](#)). Los tintes sintéticos son los más empleados porque tienen mayor variedad de colores, firmeza, costos moderados, poseen alta estabilidad a la luz, temperatura y al ataque microbiano ([Najafi y Movahed, 2009](#)), sin embargo por estas características son considerados compuestos recalcitrantes. La presencia de color en los efluentes afecta la estética y solubilidad de los gases en los cuerpos de agua, esto impide la penetración de la luz, decrece la actividad fotosintética y la concentración de oxígeno. Por esta razón pueden ser tóxicos para los organismos de la cadena alimentaria y para la vida acuática, asimismo, en muchos tintes se ha evidenciado su efecto mutagénico y carcinogénico ([Yetilmezsoy et al., 2009](#)).

Para su tratamiento, suelen utilizarse tratamientos físicos o químicos (adsorción, precipitación, filtración, intercambio iónico etc.). Sin embargo estas tecnologías resultan a menudo ineficientes en la remoción de color, caras y poco adaptables a la amplia variedad de tintes presentes en los efluentes, incluso pueden sufrir diferentes reacciones que alteran la estructura química de los colorantes y resultan aminas aromáticas tóxicas que resultan nuevos componentes xenobióticos ([Hao et al., 2000](#)).

Tabla 2.1. Caracterización de efluentes de la industria textil

Parámetro	Valor
Color	Azul oscuro
pH	8.4 - 10.0
Sólidos Suspendidos (mg/L)	185.0 - 294.0
Sólidos Totales (mg/L)	1,500 - 2,470
Oxígeno Disuelto (mgO ₂ /L)	***
DBO (mgO ₂ /L)	420.0 - 674.0

[Prasad et al., 2011.](#)

Algunos estudios de descargas de efluentes textiles mostraron que el blanqueado, el calentamiento y el teñido son procesos que tienen el mayor consumo de agua y que la calidad del agua en el cuerpo receptor después de la descarga se afecta considerablemente (Tabla 2.1). Los colorantes que se usan en la industria poseen estructuras químicas complejas, las mezclas más utilizadas contienen grupos tipo azo, diazo, antraquinonas y complejos metálicos. Según sus propiedades los tintes pueden ser clasificados como ácidos, básicos, reactivos y directos ([Fischer et al., 2013](#)). La introducción en el mercado de colorantes reactivos bifuncionales ha permitido aumentar la fijación del colorante de 60 % a 90 %. Además, si estos colorantes son heterobifuncionales pueden aplicarse a menor temperatura y son menos sensibles a los cambios de pH.

2.2 Clasificación de tintes

Colorantes tipo azo

Estos colorantes son los más empleados en la industria textil. Se caracterizan por su grupo funcional cromóforo que está representado por $-N=N-$. En esta clase destacan tres familias: monoazo, diazo y triazo; cada una de ellas existe con diferentes propiedades. Así encontramos los colorantes azo: ácidos, básicos, reactivos, directos, dispersos y pigmentos, siendo los colorantes monoazo dispersos los que mayor consumo tienen debido a que se usan para teñir fibras e hilos de poliéster, acetato, nylon y acrílico ([Arslan-Alaton et al., 2009](#)).

Colorantes ácidos

Este término se le da a los colorantes capaces de tener interacciones de carga con el sustrato como la fibra de lana o seda. Los colorantes ácidos son compuestos orgánicos aniónicos que requieren para fijarse a la fibra que ésta esté disponible con sitios catiónicos. La ionización del colorante se logra al aplicar junto con él un ácido orgánico, puede ser ácido acético o sulfúrico, a un pH entre 2-6 unidades. El colorante que sobresale por su producción es el colorante diazo Rojo ácido 151 ([Piña, 2007](#)).

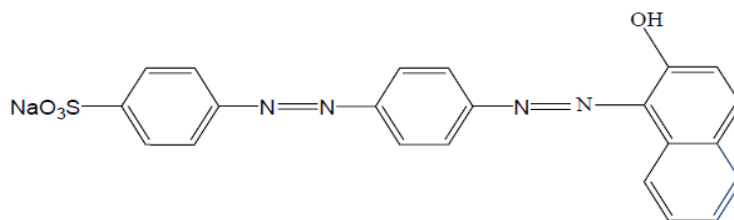


Figura 2.1. Colorante rojo ácido 151.

Colorantes básicos

Son colorantes catiónicos que llevan una carga positiva en el cromóforo de la molécula, aunque también la carga puede estar deslocalizada o distribuida a través de la porción catiónica del colorante ([Piña, 2007](#)). Estos colorantes se utilizan a

Capítulo 2. Antecedentes

menudo para teñir fibras de poliéster y nylon modificado debido a que producen alta intensidad de color y mayor brillantez en la fibra que otros colorantes. Se aplican en solución acuosa con suficiente ácido acético para mantener el pH entre 4 y 6 unidades, tienen gran capacidad de teñido ya que sólo 1 mg/l de colorante produce una fuerte coloración al agua, además de que tiene la capacidad de ser adsorbido en muchos minerales y en la materia orgánica del agua ([Arslan-Alaton et al., 2009](#)).

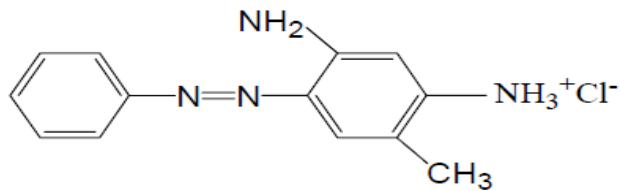


Figura 2.2. Colorante azo naranja básico 1.

Colorantes azo reactivos

Son colorantes aniónicos con varios grupos sulfónicos, que los hacen ser muy solubles en agua. Consisten básicamente de tres componentes: un colorante o grupo cromóforo, un grupo de unión y un grupo reactivo. Durante el teñido, el colorante se hidroliza lo que causa baja fijación de la fibra, además de incrementar su solubilidad ([Piña, 2007](#)). Estos colorantes se caracterizan por tener en su estructura uno o más grupos reactivos complejos que pueden ser sensibles a la hidrólisis. Ejemplos de grupos reactivos son mono o diclorotriazina y tricloropirimidina entre otros. La disminución de la reactividad de estos colorantes es causada por la presencia de grupos donadores de electrones, y el incremento de triazina sustituida con aminas se debe a grupos receptores de electrones como cloro, flúor o bromo en la estructura de la triazina ([Guaratini et al., 2000](#)). Los colorantes azo directos presentan una estructura compleja y se usan para teñir fibras de algodón, celulosa y viscosa entre otras. La principal ventaja de estos tintes es que son muy estables a la luz ([Piña, 2007](#)).

Colorantes tipo Antraquinonas

Las antraquinonas constituyen al grupo más numeroso de las quinonas naturales, son la base y fuente de una importante cantidad de colorantes. Son compuestos aromáticos polihidroxilados más o menos metilados y cuando hay sustituyentes en la posición del C2 o C3, el estado de oxidación del átomo puede variar ([Guaratini et al., 2000](#)). Constituyen el segundo grupo en importancia de los colorantes sintéticos, por detrás de los azoicos, y se emplean para teñir algodón y cuero; mientras los colorantes azoicos dominan los tonos amarillo, naranja y rojo, las antraquinonas dominan el azul y el turquesa. La razón por la que los colorantes de tipo antraquinona tienen menos importancia es exclusivamente económica; por un lado, presentan una menor absorptividad molar que los azoicos, y por otro, las materias primas son menos versátiles. Los anillos de antraquinona pueden considerarse como derivados condensados de la p-benzoquinona, obtenida mediante oxidación del p-difenol ([Robinson et al., 2001](#)). El anillo que soporta los dos grupos carbonilo no es aromático, aunque es un sistema muy conjugado y, por tanto, bastante estable.

Aunque la antraquinona ya tiene color amarillo, no se usa como colorante. Sí son colorantes muchos derivados de antraquinona con grupos amino, hidroxilo, sulfónicos u otros en distintas posiciones de los anillos de benceno. La antraquinona se puede obtener por tres procedimientos diferentes: 1). Oxidación directa del antraceno; 2). A partir de naftaleno y butadieno, usando una reacción de Diels-Alder como etapa clave de la síntesis; C). Mediante una reacción de Friedel-Crafts sobre el benceno, utilizando anhídrido ftálico o un derivado suyo ([Robinson et al., 2001](#)).

Colorantes de índigo

El Índigo es uno de los colorantes naturales más antiguos y más utilizados; el colorante era extraído por las civilizaciones antiguas de las plantas del género índigo. En la planta existe un β -glucósido denominado indican, que por fermentación genera indoxilo, el cual, por oxidación al aire, da lugar al índigo. En 1869, Von Baeyer propuso como estructura del Índigo la mostrada en la Figura 2.3a; no

Capítulo 2. Antecedentes

obstante, en 1928, mediante difracción de Rayos X se comprobó que la estructura propuesta por von Baeyer no era correcta, sino que la forma en la que el índigo existe, tanto en estado sólido, como en disolución, es el isómero trans (Figura 2.3b). ([Robinson et al., 2001](#)).

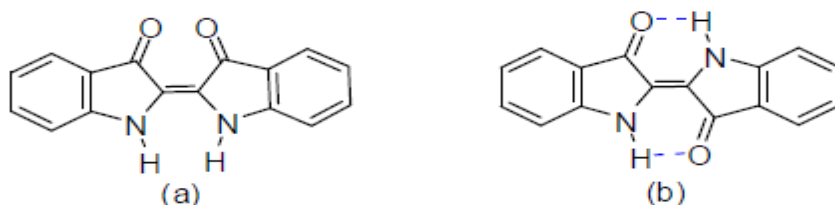


Figura 2.3. Estructura del índigo.

El uso de los colorantes de índigo está restringido actualmente a la fabricación de prendas para las que se busca un efecto desteñido intencionado, como los vaqueros, ya que son colores poco estables a la luz y poco resistentes al lavado.

Colorantes de Trifenilmetano

Los colorantes de trifenilmetano derivan del catión trifenilmetano, un catión muy estable, que se puede aislar en forma de sal, debido a la estabilización por resonancia. Estos colorantes también se denominan de tipo triarilmetina ([Robinson et al., 2001](#)).



Figura 2.4. Cati3n trifenilmetano.

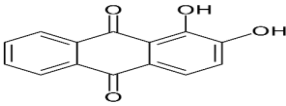
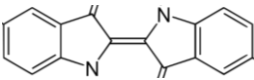
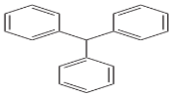
Dadas sus características de solubilidad y estabilidad, los métodos tradicionales de floculaci3n, sedimentaci3n o adsorci3n no son 3tiles en la remoci3n de estos

Capítulo 2. Antecedentes

compuestos. Esto resalta la importancia del desarrollo de procesos para el tratamiento de efluentes de la industria textil que sean eficientes, de bajo costo y que sean amigables con el medio ambiente, es decir que no generen subproductos tóxicos ([GilPavas et al., 2017](#)).

La clasificación de los colorantes según el grupo cromóforo que poseen, es decir según la familia estructural a la que pertenecen, se recoge en la Tabla 2.2. Se incluyen en ella solo los cuatro grupos más importantes desde el punto de vista industrial ([Prasad et al., 2011](#)).

Tabla 2.2. Clasificación de tintes

Familia	Grupo cromóforo	Gama de colores
Azoicos	$N=N$	Amarillo-Azul
Antraquinonas		Amarillo – Violeta
Indólicos		Azul – Violeta
Trifenilmetano		Naranja-Violeta

2.3 Hongos ligninolíticos

Los hongos ligninolíticos son los microorganismos más estudiados para la degradación de compuestos xenobióticos. Su capacidad de degradación de un compuesto tan complejo como la lignina ha hecho considerar estos hongos como una posible alternativa para la eliminación de otros muchos compuestos de baja biodegradabilidad ([Quintero, 2006](#)). Estos hongos se clasifican de acuerdo al modo en que atacan la madera en hongos de la podredumbre marrón, blanda y blanca.

Hongos de podredumbre parda o marrón: Son capaces de degradar los carbohidratos de la pared celular de las plantas, pero no la lignina. Dado que el color pardo de la madera es conferido por la lignina, dicho color permanece intacto.



Figura 2.5. Hongos de la podredumbre blanca.

Hongos de podredumbre blanda: Atacan la madera en condiciones de alta humedad, provocando el reblandecimiento de los tejidos y en consecuencia una pérdida de peso significativa.

Capítulo 2. Antecedentes

Hongos de podredumbre blanca: Son hongos basidiomicetos que tienen la capacidad para degradar simultáneamente la lignina y todos los carbohidratos de la pared celular. En muchas ocasiones estos hongos degradan preferentemente la lignina, de manera que permanecen la celulosa y hemicelulosa, confiriendo el color blanco a la madera. A este grupo de hongos pertenece *Phanerochaete chrysosporium*, que es el más comúnmente empleado para la degradación de la lignina, otros hongos que han sido estudiados son *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus eryngii*, *Trametes hirsuta* y *Pleurotus ostreatus* entre otros.

Los hongos de podredumbre blanca son capaces de degradar la lignina por medio de la secreción de enzimas extracelulares mediante su metabolismo secundario. En la degradación enzimática de la lignina intervienen una serie de reacciones inespecíficas que originan la formación de radicales libres en el biopolímero y dan como resultado la desestabilización de los enlaces y finalmente la ruptura de la macromolécula ([Quintero, 2006](#)).

La peculiar irregularidad estructural del polímero de lignina hace que estas enzimas se caractericen por tener mecanismos de acción poco específicos que oxidan los anillos aromáticos constitutivos de dicho polímero. Las enzimas que participan en este proceso son la lignina peroxidasa, la peroxidasa dependiente de manganeso y la lacasa, una fenoloxidasa que contiene principalmente cobre en su sitio activo. El patrón de expresión de esas actividades enzimáticas depende de los diferentes organismos y del medio en donde se desarrollen. La inespecificidad química y la intensa actividad oxidante de estas enzimas les confieren una considerable capacidad de degradar diferentes compuestos orgánicos con estructura similar a la de las unidades monoméricas que constituyen la lignina.

La lignina, junto con la celulosa y hemicelulosa son los componentes principales de las plantas y la forma más abundante de carbonos aromáticos en la biosfera. Las macromoléculas de lignina se forman a partir de tres precursores alcohólicos (alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico). Cuya polimerización

Capítulo 2. Antecedentes

al azar tras la formación de sus radicales correspondientes, produce una estructura totalmente heterogénea e irregular y finalmente una molécula tridimensional, amorfa e insoluble en agua. Debido a su complejidad, esta macromolécula confiere fuerza y rigidez a las paredes de las células y a los tejidos de todas las plantas vasculares actuando como un pegamento entre los polisacáridos. Además la lignina interviene en el transporte de agua en las plantas y forma una barrera contra la destrucción microbiana protegiendo a los polisacáridos fácilmente asimilables ([Hofrichter et al., 2010](#)).

Entre los diferentes xenobióticos que pueden ser transformados por hongos basidiomicetos se encuentran fundamentalmente plaguicidas, hidrocarburos aromáticos (fenantreno, pireno, etc.), compuestos orgánicos clorados (pentaclorofenoles, cloroanilinas, bifenilos policlorados). Azocolorantes, etc.

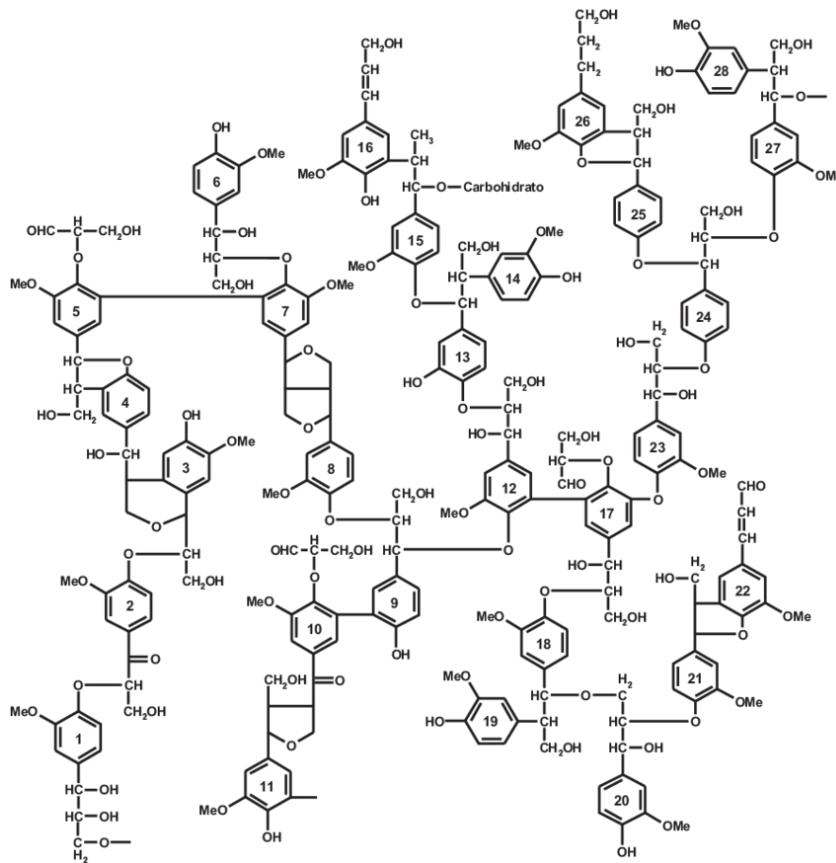


Figura 2.6. Estructura modelo de la lignina.

Este sistema ligninolítico, ha demostrado ser muy versátil y atractivo para fines ambientales, porque puede servir para eliminar diversos contaminantes difíciles de degradar ([Andrade-Ponce et al., 2012](#)).

2.4 Lacasa

Las lacasas (ρ -difenol: oxígeno óxido reductasas E.C: 1.10.3.2). Son enzimas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos incluyendo mono-, di- y polifenoles, aminofenoles, metoxifenoles, aminas aromáticas y ascorbato junto con la reducción de cuatro electrones de oxígeno a agua ([Galhaup et al., 2002](#)). Son enzimas que contienen cobre y por esto se encuentran dentro del grupo de las proteínas azules de cobre u oxidasas azules de cobre. La habilidad de las lacasas para oxidar compuestos fenólicos así como su habilidad para reducir oxígeno molecular a agua ha llevado a estudios intensivos de estas enzimas ([Madhavi et al., 2009](#)).

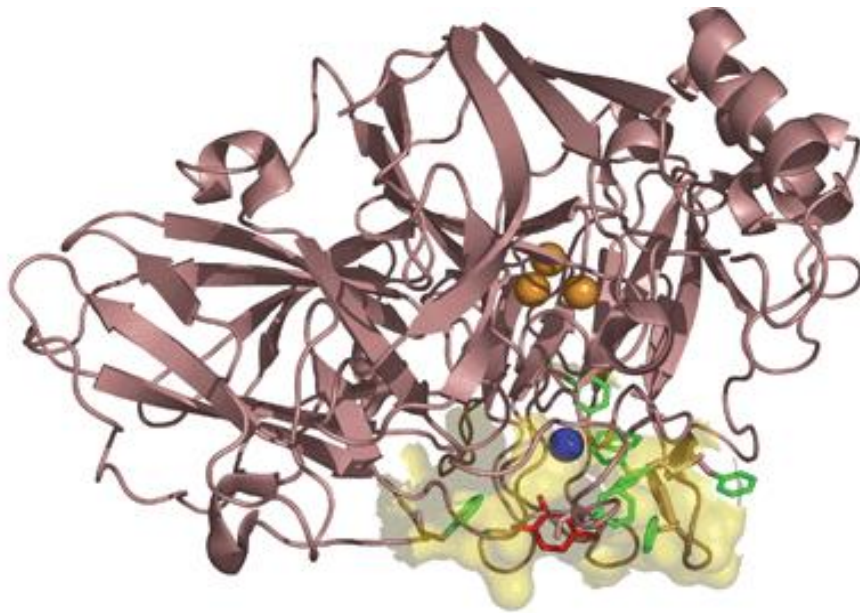


Figura 2.7. Estructura tridimensional de la enzima lacasa.

Capítulo 2. Antecedentes

Se han estudiado más de 100 lacasas, que han sido aisladas y caracterizadas de varios organismos ([Morozova et al., 2007](#)). Las lacasas son ampliamente distribuidas en plantas superiores tales como *Rhus vernicifera*, *Rhus succedanea*, *Lactarius piperatus* y *Prunus persica*. También están presentes en hongos por ejemplo *Polyporus versicolor*, *Pleurotus*, *Pholiata*, *Podospora anserina*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* y hongos de la podredumbre blanca como *Pyricularia oryzae*. Aunque las enzimas lacasas son ampliamente distribuidas en plantas y hongos, la actividad lacasa ha sido reportada sólo en algunas bacterias incluyendo *Azospirillum lipoferum*, *Marinomonas mediterránea*, *Streptomyces griseus* y *Bacillus subtilis* ([Loera et al., 2006](#)).

Las lacasas están involucradas en varias funciones fisiológicas. Las lacasas de origen vegetal tienen un importante papel en respuesta a heridas y también en la biosíntesis de la lignina, donde la actividad de la lacasa fue encontrada en las células lignificadas. En hongos, las lacasas están involucradas en la degradación de la lignina, así como en varias otras funciones, incluyendo: pigmentación, formación de cuerpos fructíferos, esporulación y patogénesis. Es bien reconocido que las lacasas juegan un papel en ambos procesos de polimerización y despolimerización de la lignina ([Palonen, 2004](#)). Otras funciones, como la oxidación de ácidos húmicos y oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} también se han propuesto para lacasas fúngicas ([Loera, et al., 2006](#)). Los tipos de isoenzimas de lacasas fúngicas son extracelulares e intracelulares. Hay esencialmente tres posibles funciones que han sido atribuidas a las lacasas fúngicas: (1). formación de pigmentos, (2). degradación de lignina y (3). Detoxificación ([Solomon et al., 2001](#)).

Las lacasas son glicoproteínas con un peso molecular de 50-130 kDa. Las porciones de carbohidratos de las lacasas vegetales constituyen cerca del 45% del peso molecular, mientras que las lacasas fúngicas contienen menos carbohidratos (10-30%). El carbohidrato contiene compuestos monosacáridos tales como hexoaminas, glucosa, galactosa, fructosa, arabinosa y principalmente manosa ([Leonowicz et al., 2001](#)).

Capítulo 2. Antecedentes

Las lacasas fúngicas tienen un punto isoeléctrico (pI) de un rango de 3 a 7, mientras que las lacasas de las plantas el punto isoeléctrico tiene un rango de valores hasta 9. La mayor diferencia entre las dos enzimas es que las enzimas fúngicas tienen un pH óptimo entre 3.6 y 5.2, mientras que las lacasas de plantas como *Rhus vernicifera* tienen un pH óptimo entre 6.8 y 7.4. El bajo pH óptimo de la enzima fúngica puede deberse a que están bien adaptados a crecer bajo condiciones ácidas, mientras que las lacasas de plantas son intracelulares, tienen su pH óptimo cerca del rango fisiológico. Las enzimas fúngicas son responsables del mecanismo de la remoción de fenoles tóxicos por el medio en que este hongo crece en condiciones naturales. Mientras que las enzimas de plantas son involucradas en procesos sintéticos tales como la formación de lignina ([Benfield et al., 1964](#)). Las lacasas pueden ser altamente inhibidas por varios agentes. Pequeños aniones tales como azidas, halidas, cianina, tiocinanina, fluorida y enlaces de hidróxido del tipo 2 y 3 del cobre, resultan en una interrupción de la transferencia del electrón interno y la inhibición de la actividad. Otros inhibidores incluidos los iones metálicos (ej. Hg^{2+}), ácidos grasos, agentes sulfidrilicos, hidroxiglicina, ácido Kojico, desferal y detergentes cuaternarios de amonio catiónicos que pueden estar involucrados en las modificaciones de los residuos de aminoácidos, cambios de conformación o quelación del cobre.

2.5 Mecanismo de acción de las lacasas

La lacasa contiene cuatro átomos de cobre que han sido clasificados de acuerdo a su característica del electrón por resonancia paramagnética (EPR). Las lacasas son oxidasas azules que contienen al menos un cobre tipo 1 (T1) o azul, que es presumiblemente el primer sitio de oxidación y que le da el color azul característico, estas oxidasas emplean al menos tres cobres adicionales; un tipo 2 (T2) o normal y dos cobres tipo 3 (T3) ordenado en un grupo trinuclear, siendo el último sitio donde se da la reducción de oxígeno molecular ([Piontek et al., 2002](#)).

La enzima lacasa oxida el sustrato por remoción de un electrón por vez y genera radicales libres que pueden ser polimerizados. La enzima guarda electrones libres de las reacciones de oxidación individual y en este estado es reducido totalmente, conteniendo un total de cuatro electrones, a esto, la enzima puede transferir estos electrones al oxígeno molecular para formar agua ([Loera et al., 2006](#)).

El potencial redox del sitio de cobre T1 es directamente responsable para la capacidad catalítica de la enzima y representa el paso limitante de la catálisis. El mecanismo de interacción entre la lacasa del sitio T1 y este sustrato parece ser identificado entre las lacasas fúngicas. Sin embargo, se han descrito importantes diferencias entre los sitios activos de la lacasa. En su estado nativo la enzima tiene átomos de cobre en un estado monovalente como Cu^+ . Cuando el dioxígeno se une al grupo trinuclear formado por cobre T2 y T3, los cuatro átomos de cobre son oxidados (Cu^{2+}) en dos pasos, mientras que al pasar por un nivel intermediario de peróxido el oxígeno es luego reducido a oxígeno divalente, y consecuentemente se convierte en agua.

La oxidación del sustrato (S) es siempre llevada a cabo por el cobre T1. Los electrones son transferidos del sitio T1 al grupo trinuclear por un triplete modificado de histidina-cisteína-histidina. Cada sustrato es oxidado por un electrón sucesivo del paso de oxidación. La captura de los cuatro electrones por el sustrato (S)

devuelve la enzima a su estado nativo. La proporción estequiométrica corresponde a la razón molar de transformación de sustrato/dioxígeno es generalmente 4/1. Cuatro electrones retirados por cuatro sustratos moleculares por un dioxígeno reducido Figura 2. 8. ([Majeau et al., 2009](#)).

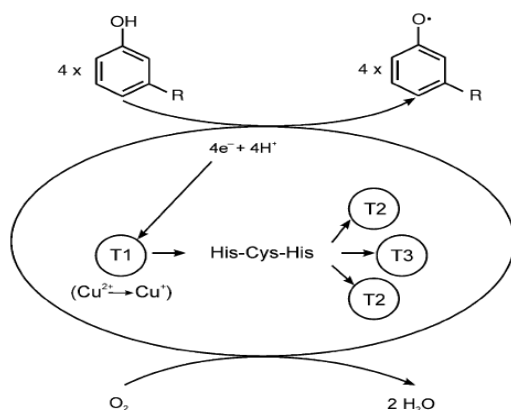


Figura 2.8. Ciclo catalítico de la lacasa.

2.6 Mediadores redox

Los mediadores redox, o simplemente "mediadores" comúnmente conocidos, son moléculas de bajo peso molecular que actúan como una especie de lanzadera de electrones: una vez que el mediador es oxidado por la enzima, se difunde lejos del sitio catalítico y a su vez oxida cualquier sustrato que debido a su tamaño no podría entrar directamente al sitio catalítico de la enzima. El mediador oxidado participa en el mecanismo de oxidación extendiendo el rango de actividad de la lacasa a compuestos de naturaleza no fenólica (Figura 2.9). ([Kokol et al., 2007](#)). En el sistema lacasa-mediador, el mediador actúa como un agente cooxidante, lo que permite aumentar la acción de la enzima sobre el sustrato o ampliar el número de sustratos sobre los cuales puede actuar la lacasa.

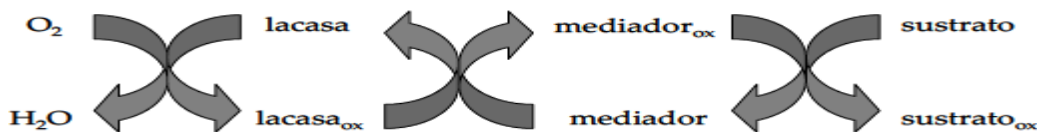


Figura 2.9. Mecanismo de óxido-reducción del sistema lacasa-mediador.

Capítulo 2. Antecedentes

La elección del mediador juega un papel muy importante en la efectividad del sistema enzima-mediador. Se han descrito más de 100 mediadores y se ha probado su aplicación en muchos campos, como es en la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos y en la decoloración de colorantes textiles, entre otros ([Kokol et al., 2007](#)). El mediador redox ideal debe ser un compuesto de bajo peso molecular, debe ser sustrato de la enzima, los radicales que forme no deben inactivar la lacasa, deben ser suficientemente estables y capaces de reciclarse en sucesivos ciclos de óxido-reducción sin degradarse. Además, desde el punto de su aplicación industrial y del medioambiente, los mediadores deberían ser compuestos de bajo costo, no tóxicos y de fácil biodegradación ([Cañas et al., 2010](#)).

Se han identificado compuestos mediadores de origen tanto natural como sintético. ([Bourbonnais y Paice 1990](#)) describieron por primera vez la capacidad del compuesto sintético, 2,2'-azino-bis-3-etiltiazolina-6-sulfonato (ABTS), ([Heap et al., 2014](#)) demostrando que es un mediador eficaz de la lacasa en la oxidación de compuestos no fenólicos del modelo de lignina con alto potencial redox (E°). Se han identificado otros mediadores sintéticos que incluyen el 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT), N-hidroxiptalimida (HPI), ácido violúrico (VA), 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (TEMPO) y ácido 1-nitroso-2-naft-3,6-disulfónico (NNDS) ([Johannes et al., 2000](#)). El ABTS y 1-HBT se utilizan industrialmente en la deslignificación de la pasta de celulosa, en la decoloración y detoxificación de colorantes textiles ([Loera et al., 2006](#)).

A partir del descubrimiento del efecto potenciador de los mediadores, especialmente en la degradación de la lignina, el uso del SLM (sistema lacasa –mediador) se ha estudiado para mejorar el tratamiento de la lignocelulosa como en el blanqueo de pulpa de papel y refinación, así como otras modificaciones de la fibra. El SLM se ha utilizado en otras áreas de aplicación como la síntesis orgánica donde se han logrado catalizar reacciones diversas, y en el tratamiento de aguas residuales donde se ha logrado incrementar la eficiencia en la eliminación y/o detoxificación de

Capítulo 2. Antecedentes

compuestos xenobióticos como colorantes textiles y clorofenoles. En los últimos años, la investigación se ha centrado en la búsqueda de mediadores naturales para reemplazar los sintéticos ([Kokol et al., 2007](#)). Dependiendo de la estructura química de los compuestos, los mediadores de lacasa actúan por diferentes mecanismos. Por transferencia de electrones como ocurre en el ABTS, por transferencia de hidrógeno radical en los sustratos que son más difíciles de oxidar (también conocida como la ruta radical). Esto ha sido demostrado con el mediador 1-HBT y por medio de una oxidación iónica que es única para el mediador de lacasa TEMPO ([Fabbrini et al., 2002](#)).

2.6.1 Mecanismos de acción de mediadores redox

El ABTS y el mecanismo de transporte de electrones

El ABTS es oxidado por la lacasa produce el catión estable de color verde $\text{ABTS}^{+\cdot}$ que es lentamente oxidado al dicatión, ABTS^{2+} . El ABTS oxidado continúa la transferencia de electrones (TE), este mecanismo permite la oxidación de sustratos no fenólicos. A través de estas reacciones, se extrae un electrón del sustrato mono electrónicamente, seguido por la pérdida de H^+ ([Bourbonnais et al., 1998](#), [Fabbrini et al., 2002](#)) (Figura 2.10).

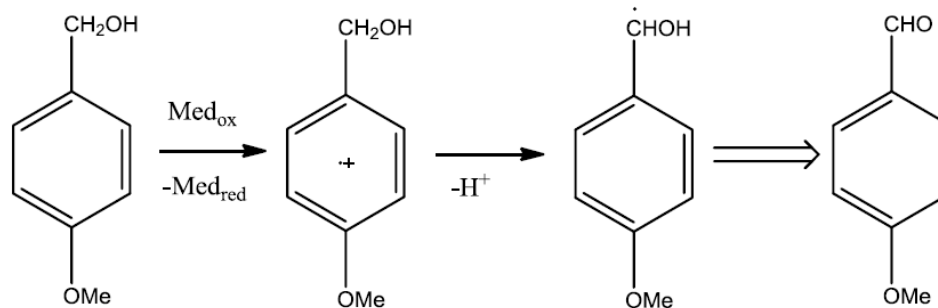


Figura 2.10 La oxidación del alcohol 4-metoxibencílico a metoxibenzaldehído a través del sistema lacasa-ABTS por la vía de transferencia de electrones.

Se ha demostrado que el catión ABTS reacciona de forma insuficiente con los compuestos no fenólicos por lo que se cree que el dicatión es el responsable de realizar la etapa de transferencia de electrones necesaria para la oxidación. Lo anterior está soportado por los potenciales redox del catión y dicatión que han sido establecidos como 0.69V y 1.1V respectivamente. El mecanismo exacto de oxidación del ABTS²⁺ a sustratos no fenólicos aún no ha sido totalmente esclarecido. [Branchi et al., 2005](#) sugirieron que los productos de la degradación de ABTS^{•+} y ABTS²⁺, se forman por hidrólisis durante la reacción entre la lacasa y ABTS y son los que participan en la oxidación de estructuras no fenólicas.

Mecanismo radical de transferencia de átomos de hidrógeno

El sistema mediador de lacasa más eficaz es el mecanismo de oxidación de radicales. Esto se aplica a la generación de radicales fenoxilo (PhO[•]) y nitroxilo (>N-O[•]). Los radicales nitroxilo se generan a partir de la oxidación por lacasa de mediadores sintéticos tales como 1-HBT, HPI, ácido violúrico (VLA) y N - hidroxiacetanilida (NHA). Los radicales fenoxilo se generan a partir de la oxidación de compuestos fenólicos por la lacasa como el ácido 3 - hidroxiantranílico (3 - HAA). Ambos radicales PhO[•] y NO[•] oxidan sustratos no fenólicos por un mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT). En esta vía, la lacasa oxida el mediador para producir una especie radical ([Xu et al., 2000](#)). Posteriormente, la especie radical sustrae un átomo de hidrógeno desde el sustrato para producir un sustrato de especies radicales, en el caso del sustrato bencílico, se producirá un radical bencílico (Figura 2.11). El sustrato reacciona con el oxígeno para generar los productos finales de oxidación ([Cantarella et al., 2003](#)).

A pesar de su alta eficiencia, se ha evidenciado que los radicales N-O[•] se pueden descomponer en especies que inactivan la lacasa. Por otro lado, los radicales PhO[•] presentan beneficios en el proceso mediante la protección de la enzima lacasa de los grupos N-O[•] y esta protección puede durar horas. Durante la oxidación del ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA), los radicales fenoxilo reactivos pueden experimentar

Capítulo 2. Antecedentes

reacciones de acoplamiento oxidativo produciendo dímeros fenólicos, que a su vez pueden comportarse como mediadores.

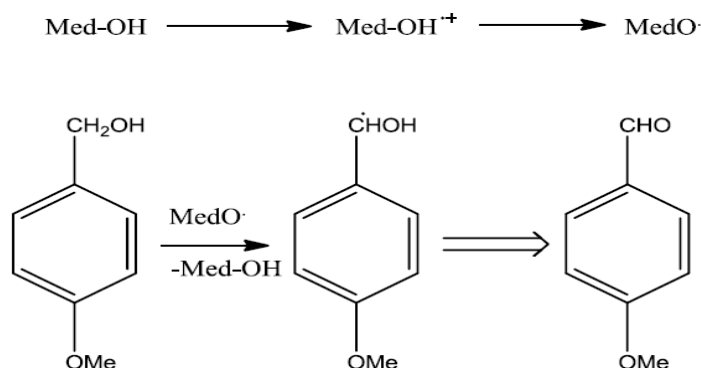


Figura 2.11. Oxidación del alcohol 4-metoxibencílico a 4-metoxibenzaldehído a través del mecanismo de transferencia del átomo de hidrógeno de la lacasa-1-HBT

TEMPO y la ruta iónica

El 2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-N-oxilo (TEMPO) es un radical aminoxilo estable que actúa como un mediador de lacasa, pero sigue un mecanismo diferente para permitir la oxidación de los sustratos no fenólicos. Se sigue una ruta de oxidación iónica y esta reacción se emplea para la oxidación de alcoholes primarios. La lacasa (y otros oxidantes químicos) oxidan TEMPO a un ion oxoammonio estable. El radical ataca entonces al sustrato como un nucleófilo y elimina un (α -protón). Esta reacción produce el sustrato oxidado y un TEMPO (N-OH) reducido, que puede ser oxidado de vuelta a TEMPO (N-O•) y luego sigue un ciclo para formar el ion oxoammonio de nuevo (Figura 2.12) ([Galli et al., 2004](#)).

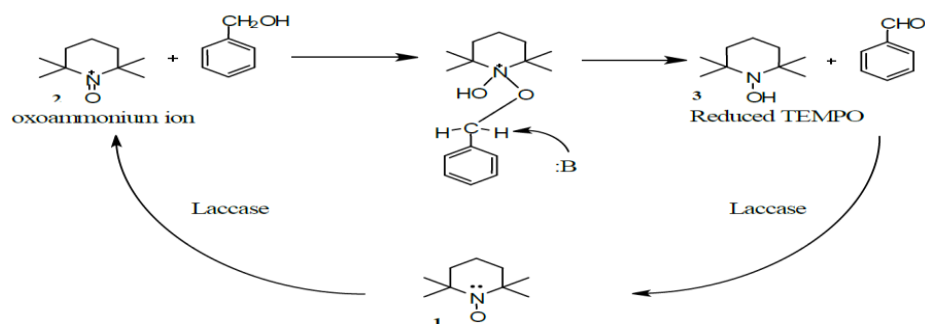


Figura 2.12. La oxidación de alcohol bencílico a benzaldehído por la ruta iónica de lacasa-TEMPO de oxidación. El radical N-oxilo "estable" de TEMPO.

2.7 Mediadores redox de origen sintético

El primer mediador sintético descrito fue el ABTS (ácido (2,2'-azinobis-(3-etil - benzotiazolina-6-sulfónico)) ([Bourbonnais y Paice, 1990](#)). El primer paso en su oxidación lleva a la formación del radical catiónico (ABTS^{•+}), el cual es oxidado posteriormente al dicatión (ABTS²⁺), que es el responsable último de la oxidación de lignina utilizando una vía de transferencia electrónica (TE). A partir de entonces, se han llevado a cabo numerosos estudios para encontrar nuevos mediadores sintéticos y determinar su mecanismo de acción. Los mediadores sintéticos han demostrado ser mediadores eficientes de las lacasas.

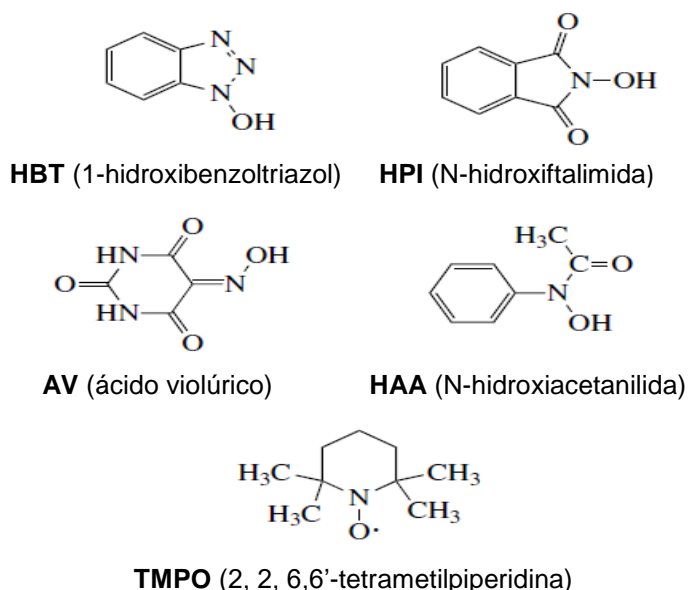


Figura 2.13. Estructura de mediadores sintéticos de lacasa de tipo N-OH.

Los principales problemas encontrados durante la detección de mediadores sintéticos están asociadas a la inestabilidad de los intermediarios del mediador, que dan lugar a ciclos redox incompletos o pobres en la oxidación del sustrato. Además, los mediadores sintéticos son caros, tóxicos, y difícil de reutilizar, ya que forman subproductos ([Srebotnik y Hammel, 2000](#)). La mayoría de los subproductos son además inhibidores de la lacasa a concentraciones superiores a 1 mM. En el caso

Capítulo 2. Antecedentes

del mediador TEMPO, aunque también es un compuesto de tipo NOH su mecanismo de acción es de tipo iónico, no radicalario ([Fabbrini et al., 2002](#)).

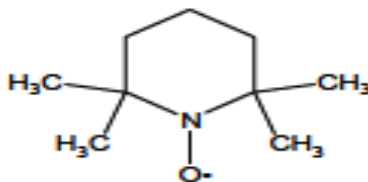


Figura 2.14. Estructura de mediador TEMPO.

Otros tipos de compuestos orgánicos también se han empleado como mediadores de lacasa en la oxidación de compuestos modelo de lignina, pasta kraft o colorantes textiles. Entre ellos se encuentran compuestos nitrosos y fenotiazinas como por ejemplo la promazina, el ácido propiónicofenotiazina o el ácido 2-nitro-1-naftol-4-sulfónico ([Camarero et al., 2006](#)). Por otro lado, iones metálicos como el Mn^{2+} pueden actuar como mediadores de lacasa al ser oxidados por la enzima a Mn^{3+} . Recientemente, compuestos metálicos llamados polioxometalatos han sido descritos como mediadores de lacasa en la degradación de la lignina. Se ha demostrado que la combinación de dos o más mediadores (por ejemplo, ABTS y HBT) puede producir un efecto sinérgico en la actividad oxidativa de compuestos aromáticos recalcitrantes ([Kokol et al., 2007](#)).

A pesar de todas las ventajas asociadas al sistema lacasa-mediador, existen aspectos que limitan su aplicación. Entre ellos se encuentran el elevado costo de los mediadores de origen sintético, la posible generación de derivados tóxicos (y la carencia de estudios suficientes sobre los efectos de éstos). Además la enzima puede ser inactivada por los radicales de algunos mediadores o la degradación del mediador a especies inactivas (como por ejemplo benzotriazol a partir del HBT). Esto ha llevado a canalizar los esfuerzos de investigación para obtener mediadores naturales que pueden ofrecer ventajas medioambientales y económicas ([Lew et al., 2014](#)).

2.8 Mediadores redox de origen natural

El medio ambiente natural también produce una serie de compuestos que se sugiere que se comporten como mediadores redox durante procesos naturales tales como la deslignificación de la madera por hongos blancos de la putrefacción. Estos "mediadores naturales" son a menudo referidos como "potenciadores" debido a su escasa estabilidad como verdaderos mediadores, y son, en la mayoría de los casos estructuras fenólicas. Los mediadores naturales pueden ser tanto los metabolitos fenólicos fúngicos o fenoles derivados de la lignina. La ventaja de los mediadores naturales es que pueden ser menos tóxicos y que podrían ser producidos a un costo menor que los sintéticos ([Camarero et al., 2006](#)). Los mediadores naturales constituyen un vehículo de transporte de electrones ya que, una vez oxidados por la enzima, y estabilizados en forma de radicales, difunden lejos del centro activo y, mediante mecanismos de oxidación diferentes del enzimático, oxidan sustratos que bien por su tamaño no pueden acceder al bolsillo enzimático ([Kokol et al., 2007](#)).

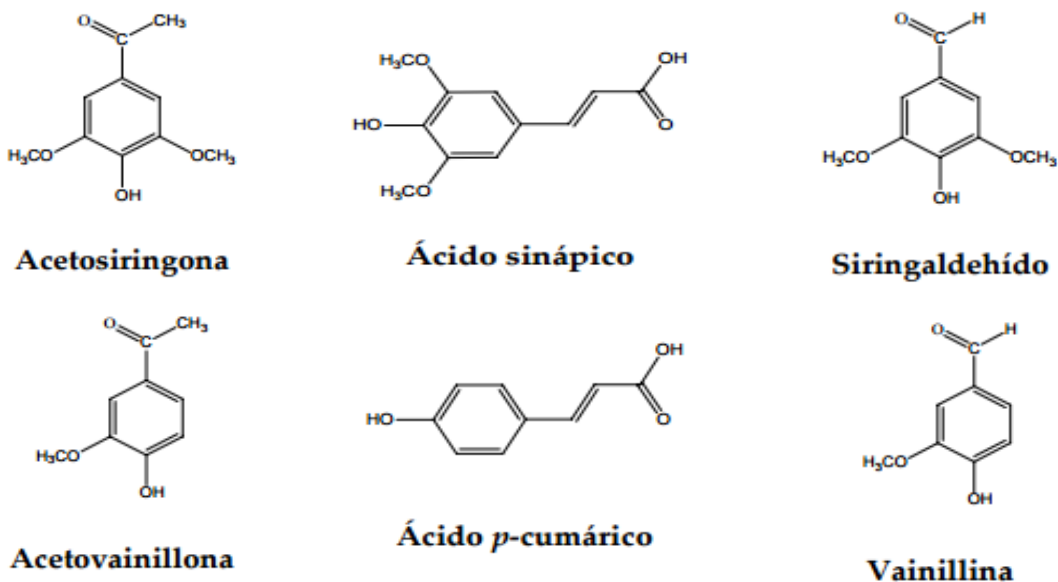


Figura 2.15. Estructura de Mediadores Naturales.

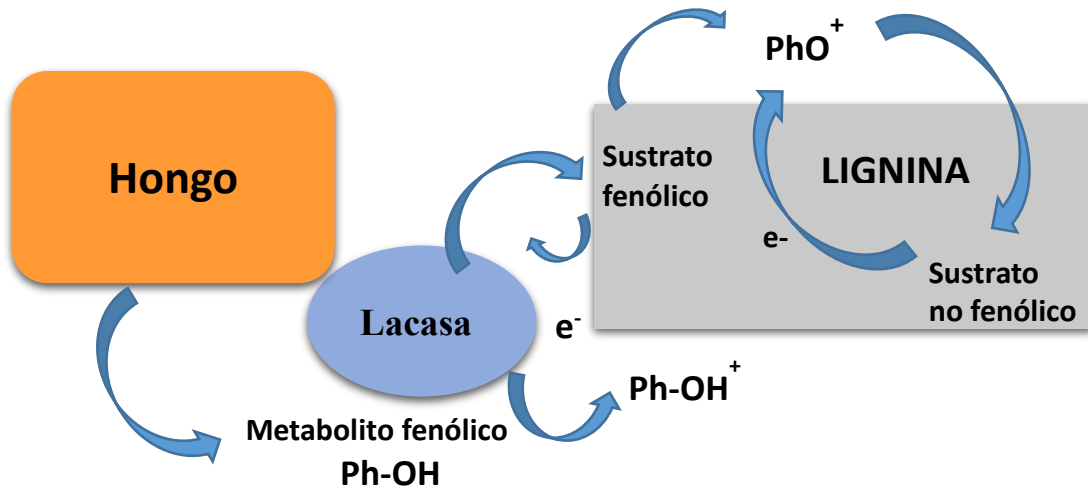


Figura 2.16. Representación de las reacciones mediadas por la lacasa.

Durante los estudios de la deslignificación enzimática, se determinó que la reactividad de la lacasa disminuye con el aumento del tamaño del sustrato, por lo tanto, la accesibilidad limitada del sustrato lignina se supera mediante el uso de mediadores de lacasa apropiados. En la etapa de reacción inicial, el mediador es oxidado por la lacasa a un compuesto con potencial redox intermedio alto. A partir de entonces, siguiendo la cinética de reacción de difusión controlada, el mediador oxidado se difunde lejos de la enzima, y debido a su tamaño pequeño es capaz de penetrar los poros de las paredes celulares de las plantas para alcanzar el sustrato. Como resultado, el sustrato (lignina, compuestos aromáticos, etc.), se oxidan por los compuestos intermedios que no se pueden oxidar directamente por lacasa, mientras que el mediador oxidado se reduce a su forma inicial. Por otra parte, el mediador debe ser capaz de mantener continuamente la conversión redox cíclica ([Lew et al., 2014](#)).

El uso de compuestos fenólicos naturales que son más baratos, no tóxicos y más respetuosos con el medio ambiente, ha despertado recientemente gran interés. En particular, los fenoles derivados de la lignina son mediadores eficientes, sin embargo, hasta el momento, existe muy poca información sobre las estructuras de los intermediarios que se generan durante las reacciones catalíticas en el SLM ([Martorana et al., 2013](#)).

Capítulo 2. Antecedentes

El ácido 3-hidroxiantranílico es un metabolito secundario sintetizado por *P. cinnabarinus* que fue el primer compuesto de origen natural descrito como mediador en la oxidación de sustratos no fenólicos y lignina sintética por la lacasa de *P. cinnabarinus* ([Li et al., 2001](#)). Se han identificado mediadores naturales no tóxicos, tales como anilina, el ácido 4-hidroxibenzóico, el alcohol hidroxibenzílico, ácido gálico, ácido cafeico y ácido p-hidroxibenzóico que han demostrado ser más eficientes que el ABTS y el HBT. También se ha reportado un incremento proporcional de la oxidación de la lacasa, con los potenciales redox de los aminoácidos metionina, cisteína y glutamato reducido. Estos aminoácidos contienen grupos sulfhídricos, que se activan como compuestos mediadores ([Johannes et al., 2000](#)). El siringaldehído y la Acetosiringona, han sido descritos como mediadores en la decoloración del índigo carmín, así como para la transformación del fungicida cyprodinil y la degradación de hidrocarburos. Una amplia búsqueda de mediadores naturales fue realizada por ([Camarero et al., 2007](#)), en este estudio probaron 44 compuestos naturales derivados de la lignina y entre ellos se seleccionaron 10 compuestos fenólicos como el ácido siríngico, guayacol y p-hidroxifenil, caracterizados por la presencia de una o dos subunidades no metoxi (en posiciones orto con respecto al fenol hidroxílico). El siringaldehído, Acetosiringona, vainillina, acetovainilina, metilvainilato y el ácido p-cumarico han sido descritos por ser los más efectivos para la oxidación mediada usando lacasas de *P. cinnabarinus* y *T. villosa*. Entre ellos, el siringaldehído y la Acetosiringona pertenecen a los productos principales de ambas degradaciones biológica y enzimática de lignina rica en ácido siríngico ([Baldrian, 2006](#)).

3 JUSTIFICACIÓN

Los efluentes textiles contienen mezclas complejas de tintes que representan una fuente de contaminación ambiental por su elevada toxicidad. Actualmente se utilizan métodos físico-químicos que generan grandes cantidades de lodos difíciles de disponer. Las lacasas son fenol oxidasas que actúan sobre diversos sustratos fenólicos como los que se encuentran en los efluentes. Sin embargo, estas enzimas tienen un bajo potencial redox que limita su acción en los procesos. Los mediadores-redox han sido descritos como potenciadores de la actividad de lacasas en procesos de deslignificación y decoloración de tintes. En los últimos años se han dirigido los esfuerzos a la búsqueda de mediadores naturales inocuos y de bajo costo. Los hongos de la podredumbre blanca liberan compuestos fenólicos durante su crecimiento en sustratos lignocelulósicos que pueden ser utilizados como mediadores redox en el tratamiento de tintes industriales, por lo que este trabajo está dirigido a la obtención de mediadores a partir de fuentes naturales renovables como el salvado de trigo y demostrar su eficiencia en la decoloración mediante el sistema lacasa-mediador de *Trametes hirsuta* Bm2.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la eficiencia del sistema lacasa-mediador de *Trametes hirsuta* Bm2 en la decoloración de tintes industriales.

4.2 Objetivos específicos

Obtener lacasas y extractos de compuestos derivados de la lignina (CDL) a partir del cultivo de *T. hirsuta* en salvado de trigo.

Establecer las condiciones del SLM (CDL) en la decoloración de tintes industriales.

Comparar la eficiencia de mediadores naturales y sintéticos con el SLM (CDL) en la decoloración de tintes industriales.

Determinar el perfil de los compuestos fenólicos presentes en los extractos CDL.

Analizar los productos de transformación del tinte índigo carmín durante el tratamiento con el SLM (CDL).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismo

Se utilizó el hongo de la podredumbre blanca *Trametes hirsuta* Bm2 que fue aislado de desechos de madera de Yucatán ([Tapia-Tussell, 2011](#)). Este hongo forma parte de la colección de cultivos del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Microbiana de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida.

5.2 Propagación de la cepa

La cepa *Trametes hirsuta* Bm 2 se propagó en placas de medio sólido con extracto de malta al 2% y agar bacteriológico al 2%. Se transfirió un cuadro de micelio en el centro de la placa y se incubó a 35 °C durante 4 días.

5.3 Preparación del inóculo

Se usaron matraces Erlenmeyer de 125ml con 50ml de medio YMPG líquido que contenía en g/L: glucosa 10g, extracto de malta 10g, peptona 2g, KH₂PO₄ 2g, MgSO₄*7H₂O 1g y tiamina HCl 1mg ajustado a pH 4.5. A cada medio se adicionó 1 cm² del micelio propagado en el medio sólido. Los matraces se incubaron a 35 °C y 150 rpm en una incubadora Lab-line por 5 días. El pellet formado se homogeneizó durante 1 min con un homogeneizador ultraturrax para usarlo como inóculo en las fermentaciones con salvado de trigo.

5.4 Producción de lacasas en salvado de trigo

Se usaron matraces Erlenmeyer de 150 ml con 50 ml de buffer de fosfatos (1M) a pH 6 y 3% de salvado de trigo (All Bran de Kellogg's). Los medios se inocularon con 1 ml del micelio homogeneizado y se mantuvieron en una incubadora Lab-line a 35 °C, 150 rpm, durante 11 días. Se tomaron los 50 ml de muestra cada 24 h en condiciones estériles. Para obtener los extractos, las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 30 min a 4 °C. Se descartó el paquete celular y el extracto libre

Capítulo 5. Materiales y métodos

de células se utilizó para determinar la actividad de lacasa, proteína extracelular, contenido fenólico y los ensayos lacasa-mediador.

5.5 Actividad de la enzima lacasa

La actividad de lacasa se determinó por espectrofotometría, cuantificando la cantidad de ABTS oxidado a 420 nm de acuerdo a ([Johannes et al., 2000](#)). Este ensayo se realizó directamente en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer Lambda XLS+. El volumen del sistema de reacción fue de 1.0 ml. Para el ensayo se usaron 100 μ l de amortiguador de acetatos 1.0 M de pH 4.5, 770 μ l de agua destilada, 30 μ l de extracto enzimático; esta mezcla se preincubó durante 5 min a 40 °C. Después, se adicionó 100 μ l de una solución de ABTS 5 mM y se incubaron a 40° C por 20 min más. El coeficiente de extinción molar del ABTS es de $\epsilon=36,000$. Posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm. El blanco se preparó siguiendo la misma metodología anterior, sustituyendo el volumen de la enzima por 30 μ l de agua destilada. La unidad de actividad de lacasa es la cantidad de la enzima que oxida 1 μ m de ABTS/ml por minuto, bajo las condiciones de ensayo (U/ml).

5.6 Determinación de fenoles totales

La concentración de fenoles totales se determinó por la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu ([Singleton et al., 1965](#)). A 60 μ l de extracto se adicionó 1.460 ml de agua destilada y 100 μ l de Folin Ciocalteu (1:9). Después de 5 min., se adicionaron 300 μ l de Na₂CO₃ al 7.5 %. Se dejó reposar 30 min a 40°C en oscuridad. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer Lambda XLS. Los valores de absorbancia se extrapolaron a una curva estándar de ácido gálico ([Anexo D3](#)). El contenido de fenoles totales y se expresó como mg de ácido gálico/ml de muestra.

5.7 Cuantificación de proteína

La proteína se determinó por el método de ([Bradford 1976](#)). Se adicionaron 10 μ l de muestra en 190 μ l de agua destilada y 1000 μ l del reactivo de Bradford. La solución

Capítulo 5. Materiales y métodos

se agitó y después de 5 minutos en reposo, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteína en las muestras se determinó extrapolando los valores de absorbancia a una curva estándar de albúmina sérica bovina.

5.8 Concentración de lacasas

Un litro del extracto libre de células obtenido a las 168 h (E168) fue precipitado con sulfato de amonio utilizando el 60% de saturación ([Zapata-Castillo et al, 2012](#)). La sal se adicionó poco a poco al extracto enzimático en baño de hielo a 4°C, se mantuvo en agitación lenta durante 12 horas y después se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. El precipitado se suspendió en 400 ml de amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 5 y se dializó durante 24 horas, con recambio de amortiguador cada 8 horas. La muestra fue dializada y se determinó la actividad de lacasa en ABTS y la concentración de proteína por el método de Bradford (5.1.7). La muestra liofilizada se resuspendió en amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 5, y se dializó durante 6 horas, con recambio de amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 5, y se dializó 6 horas, con recambio de amortiguador cada hora. La actividad específica se determinó mediante el cociente: U de actividad volumétrica/mg de proteína.

5.9 Obtención de los extractos fenólicos ultrafiltrados (CDL)

Se transfirieron 10 ml de los extractos obtenidos a 24, 48 y 72 h de cultivo en salvado de trigo (E₂₄, E₄₈, E₇₂) a columnas de ultrafiltración Amicon Ultra-3 de 10 kDa, las cuales fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 60 min a 4 °C. El ultrafiltrado se colectó como extracto fenólico (CDL1, CDL2, CDL3) y el contenido en la parte superior de la membrana se colectó como extracto enzimático. Los extractos CDL fueron utilizados posteriormente para evaluar su acción como mediadores redox de las lacasas.

5.10 Decoloración de tintes industriales por el sistema lacasa-mediador (CDL)

Se utilizaron tintes de diferente estructura química: poly R-478, remazol brillante, rojo congo, cristal violeta, black 5, verde de malaquita e índigo carmín. Los tintes índigo carmín, remazol brillante, black 5 se disolvieron en amortiguador de acetatos 1 M a pH 5 y poly R-478, rojo congo, cristal violeta y verde de malaquita se disolvieron en agua destilada a pH 5 a una concentración final de 20 mg/L. La decoloración se determinó: a) usando el extracto rico en lacasas (E₁₆₈) sin mediador y b) con la lacasa suplementada individualmente con los extractos ultra centrifugados CDL1, CDL2 y CDL3. El sistema de reacción contenía: 4 ml de la solución del tinte al que se adicionó (a) 0.5 ml de E₁₆₈ (300 U) y 0.5 ml de agua (sistema sin mediador), (b) 0.5 ml del extracto lacasas y 0.5 ml de CDL24, CDL48 y CDL72 (SLM), (c) Paralelamente se corrió un control donde se adicionó 1 ml de agua destilada a la solución de tinte. Las muestras se incubaron a 40°C en obscuridad y se midió espectrofotométricamente la pérdida de color a la máxima absorbancia de cada tinte a diferentes intervalos de tiempo. La decoloración fue expresada en términos del porcentaje de pérdida de color calculada de acuerdo a la siguiente ecuación: Decoloración (%) = $[(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$. Donde A₀ es la absorbancia a la λ_{max} del tinte medida inmediatamente después de la adición de la enzima y A_t es la absorbancia después de cada intervalo de tiempo.

5.11 Efecto de la concentración del mediador y del pH en la decoloración de tintes

Se evaluó el efecto de la concentración de CDL2 y CDL3 en la decoloración de los siete tintes a pH 5 y 40 °C. Se adicionaron volúmenes de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 ml de los extractos fenólicos que corresponden a concentraciones de 0.150, 0.300, 0.525, 0.700, 0.875, 1.0 mg de ácido gálico/ml y 300 U de lacasas. Los tratamientos se realizaron en las condiciones descritas en el inciso 5.10.

Posteriormente, se evaluó la decoloración de los tintes a pH: 4, 4.5, 5, 6 y 7 usando la concentración seleccionada del extracto (CDL). En ambos tratamientos (de concentración y pH) se midió la decoloración con la lacasa sola, con el sistema

lacasa-mediador y un control negativo sin enzima en las condiciones descritas en el inciso 5.10.

5.12 Decoloración de tintes con el sistema Lacasa-mediador grado reactivo

Se evaluaron los mediadores siringaldehído, 2,6 dimetoxifenol, ácido p-Cumárico, guayacol, ABTS y HBT en la decoloración de los tintes mencionados. La concentración del mediador fue 50 μM ([Jin et al., 2016](#)) en 300 μl de lacasa. Los tratamientos se llevaron a cabo en buffer de acetatos y agua ácida a diferentes valores de pH (4.5 a 6) a 40 °C, en oscuridad. El descenso de absorbancia se midió a diferentes tiempos de incubación en las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorbancia de cada colorante.

5.13 Determinación de fenoles por cromatografía líquida de alta presión

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó en un HPLC-1220 Infinity (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con un inyector manual (Loop de 20 ml) y un detector UV-Vis. El instrumento fue controlado por el OpenLAB paquete de software CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies). Los extractos fenólicos CDL2 y CDL3 fueron filtrados usando un filtro Tekanokroma de 0.22 μM . Se inyectó una muestra de 20 μl en una columna Nucleosil C18 (250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μm , 280 nm) con una fase móvil de ácido fórmico 1% (Fase A) y acetonitrilo (Fase B) a flujo constante (0.5 ml/min a 25°C). La separación de los fenoles se realizó con elución en gradiente constante, de 2 a 100% de la fase B de 0 a 70 min. Los estándares de fenoles fueron siringaldehído, ácido p-cumárico, guayacol, 4-hidroxibenzaldehído, ácido vanílico, ácido siríngico, alcohol veratril, acetosiringona (Sigma-Aldrich). La concentración de los estándares de fenoles fue determinada a 280 nm. Los compuestos fenólicos en las muestras fueron identificados de acuerdo a su orden de elución y comparando con los tiempos de retención de cada estándar. La concentración del compuesto fenólico (mg/L) fue interpolada a partir de las áreas de picos correspondientes.

Capítulo 5. Materiales y métodos

5.14 Determinación de los productos de la transformación del índigo carmín

Las muestras de índigo carmín antes y durante el tratamiento enzimático con y sin mediador (0, 8, 12 16, 24 h) fueron analizadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC-1220 Infinity) según la metodología de [Cano *et al.*, 2011](#). Las muestras fueron filtradas usando un filtro Teknokroma de 0.22 µM. Una muestra de 20 µl fue inyectada a una columna nucleosil C18 (250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm). Se utilizó una fase móvil de metanol: agua 30:70 (v/v) con un flujo de 0.3 ml/min a temperatura ambiente. Las muestras eluidas se detectaron de 403-600 nm. La identificación del tinte y la isatina fue realizada considerando su orden de elución y comparando con el tiempo de retención de los estándares que fueron obtenidos en las mismas condiciones descritas.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Producción de lacasas y fenoles

La eficiencia del sistema lacasa-mediador en diferentes procesos ha dirigido a la búsqueda de nuevas fuentes de mediadores de bajo costo a partir de fuentes lignocelulósicas que son renovables ([Arias et al., 2003](#)). Los mediadores fenólicos pueden ser obtenidos de residuos de plantas, efluentes y de cultivos a partir de los cuales son fácilmente extraídos ([Gutiérrez et al., 2007](#)). Con el propósito de obtener mediadores naturales se realizó un cultivo del hongo *Trametes hirsuta* Bm2 en salvado de trigo bajo las condiciones previamente descritas por [Ancona-Escalante et al., 2018](#). En la Figura 6.1, se observa que la actividad de lacasa fue detectada a partir del tercer día y mostró un incremento progresivo en función del tiempo hasta alcanzar la máxima actividad (6,920.13 U/ml) a los 7 días (168 h). Esta Actividad coincide con la reportada por [Ancona-Escalante et al., 2018](#), en este estudio los extractos fenólicos ultrafiltrados mejoraron la eficiencia hasta 50 veces en la oxidación del ABTS por lacasas de *Trametes hirsuta* Bm2. La producción de lacasas por hongos de la podredumbre blanca (HPB) han sido realizados en diversos sustratos lignocelulósicos como la cáscara de plátano, residuos de café y bagazo de caña entre otros, en donde han sido reportados altos niveles de lacasas ([González et al., 2013](#)). Sin embargo, es difícil comparar la actividad entre los estudios ya que se utilizan diferentes métodos para medir y definir las unidades de actividad enzimática. La lignina presente en los residuos agroindustriales estimula la síntesis de lacasas en relación a los medios salinos debido a que los hongos liberan fenoles que actúan como inductores. La inducción de lacasas por sustancias fenólicas puede ocurrir en respuesta al estrés oxidativo causado por los fenoles que afectan el crecimiento del hongo. Algunos monómeros fenólicos presentes en el cultivo incluyen el alcohol cumarílico, alcohol coniferílico, alcohol sinapílico, guayacol, veratrol, ácido vainílico, mismos que han demostrado estimular la síntesis de éstas enzimas ([El-Shora et al., 2008](#)). También ha sido demostrado que la inducción de lacasas por fenoles ocurre a nivel transcripcional ([Piscitelli et al., 2011](#)).

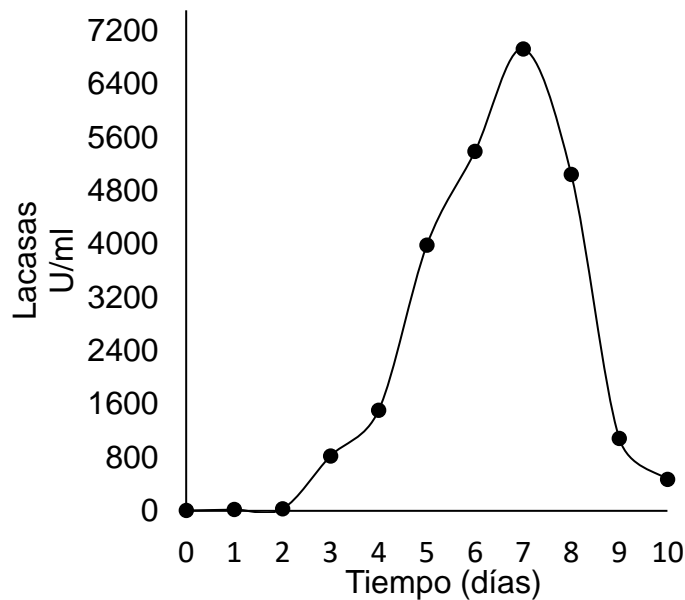


Figura 6.1. Producción de lacasa de *Trametes hirsuta* Bm2 en un medio con salvado de trigo a 35°C, pH 6.

Los fenoles totales mostraron un comportamiento irregular, con incremento y decremento en su concentración durante el cultivo (Figura 6.2). Este comportamiento puede ser atribuido a que el cultivo es un evento dinámico, en el cual el hongo simultáneamente libera fenoles de la lignina y los usa como inductores o como fuente de carbono. Entonces, la velocidad con la que estos eventos ocurren puede variar con las condiciones cultivo y la etapa fisiológica del organismo que varían con el tiempo. Las mayores concentraciones de fenoles fueron detectadas en los primeros tres días de cultivo y posteriormente disminuyeron un 50% aproximadamente. En estos extractos (24, 48 y 72 h) la actividad de lacasa fue nula o baja probablemente debido al efecto inhibitorio que producen altas concentraciones de fenoles en la síntesis y/o actividad de lacasa. Los fenoles presentes en los extractos libres de células también pueden actuar como mediadores redox, contribuyendo a mejorar la eficiencia en la degradación de la lignina.

Capítulo 6. Resultados y discusión

Las lacasas producidas a la 168 h y los extractos fenólicos de 24, 48 y 72 h fueron seleccionados para evaluar su efecto redox en la decoloración de tintes por lacasas.

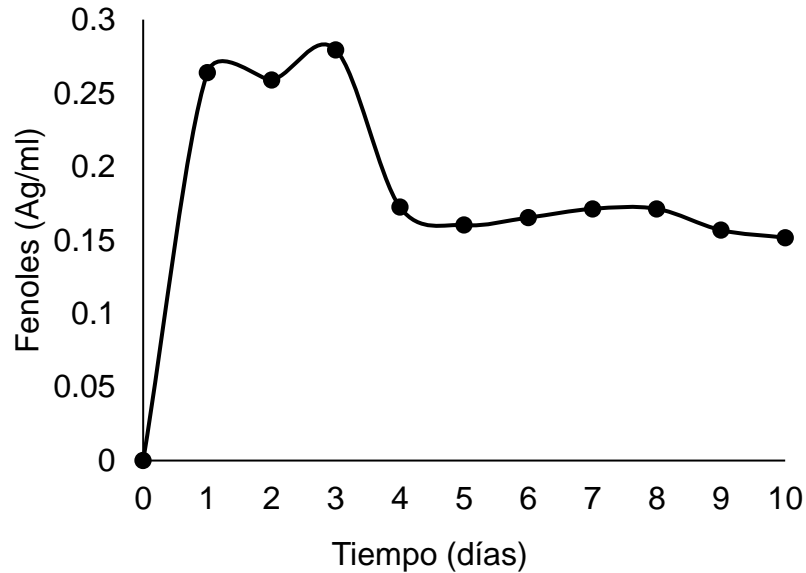


Figura 6.2. Contenido de fenoles en los extractos libres de células producidos durante el cultivo de *Trametes hirsuta* en salvado de trigo.

Para determinar el efecto de los fenoles en la decoloración de tintes por lacasas, la enzima fue concentrada y separada de los fenoles. El extracto crudo de las lacasas producidas a las 168 h fue sometido a precipitación con sulfato de amonio ([Zapata-Castillo et al., 2012](#)), ultrafiltración y liofilización como se muestra en la Tabla 6.1 Posteriormente a los tratamientos se obtuvo el extracto rico en lacasas que fue purificado 6 veces y los extractos fenólicos de 24, 48 y 72 h libres de lacasas denominados CDL1, CDL2 y CDL3.

Tabla 6.1 Concentración de la enzima lacasa

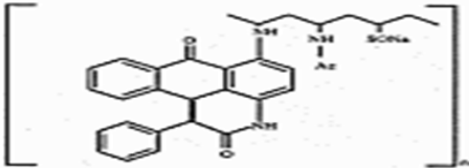
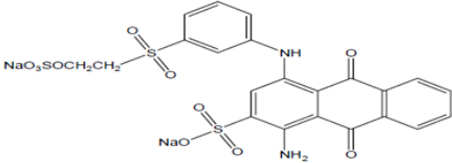
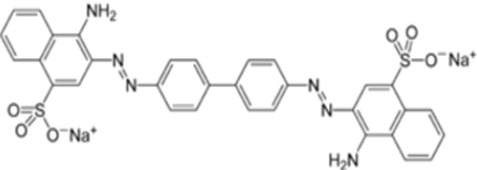
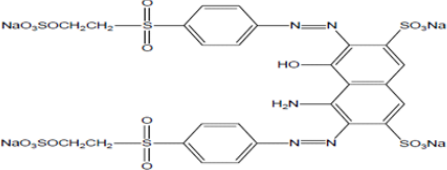
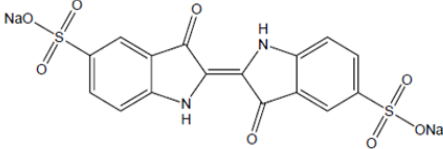
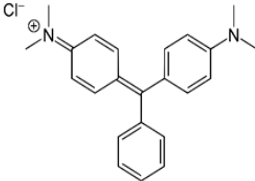
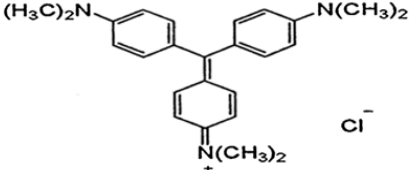
Tratamiento	Proteína (mg)	AV (U/ml)	AE (U/mg)	FP
Extracto crudo *	6	6,920.1	1,153.3	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (60%)	4.1	13,640.2	3,310.7	2
Ultrafiltración	3.9	13,750.3	3,507.7	2.3
Liofilización	2.3	36,221.9	15,479.4	6

* Las lacasas se obtuvieron a las 168 h de cultivo de *Trametes hirsuta* Bm2 en salvado de trigo. AV: actividad volumétrica, AE: actividad específica, FP: factor de purificación

6.2 Evaluación del sistema lacasa-mediador en la decoloración de tintes

Para evaluar la eficiencia de los CDL (Compuestos derivados de la lignina) en la decoloración tintes por lacasas (L), se usaron tintes pertenecientes a diversos grupos pero que tienen en común la presencia de anillos aromáticos. Se usaron siete tintes, un indigoide, dos tintes azo, dos antraquinonas y dos trifenilmetano. La Tabla 6.2 muestra las estructuras de los tintes y la longitud de onda máxima de cada tinte determinada a través de un barrido de absorbancia.

Tabla 6.2. Estructura de los tintes usados en este estudio

Nombre	Estructura	Tipo Cromóforo	Max. Abs. (λ nm)
Poly R-478		Antraquinona	420
Remazol brillante		Antraquinona	592
Rojo congo		Azo	597
Black 5		Azo	640
Indigo carmín		Indólico	600
Verde malaquita		Triphenilmetano	617
Cristal Violeta		Triphenilmetano	590

Capítulo 6. Resultados y discusión

Como se mencionó anteriormente, las lacasas son enzimas que presentan baja especificidad de sustrato, lo que les permite actuar sobre un amplio rango de moléculas fenólicas y aromáticas. Sin embargo, su nivel de acción sobre los tintes industriales puede variar dependiendo de su potencial redox y la estructura del tinte, aun cuando presenten el mismo grupo cromóforo. En este estudio se evaluó la acción de la lacasa (300 U/ml) en la decoloración de siete tintes con diferentes estructuras y grupos cromóforos en ausencia y en presencia de los extractos fenólicos CDL1, CDL2, CDL3 (Figura 6.3).

La lacasa sola fue prácticamente incapaz de decolorar los tintes, sólo alcanzó porcentajes de decoloración desde 5 % hasta 20 % en 50 horas, este hecho podría ser relacionado con la naturaleza aromática o al alto potencial redox de los tintes que difiere del bajo potencial redox de la enzima. Cuando se evaluó el sistema lacasa/CDL, el nivel de decoloración incrementó en función del tinte y el extracto fenólico. El sistema L/CDL2 mejoró la decoloración de poly R-478 **[G]** (44%), rojo congo **[F]** (20 %), cristal violeta **[D]** (41) % y remazol brillante **[E]** (38%), a diferencia, CDL3 fue el mejor mediador en la decoloración del tinte black5 **[C]** (35%), verde malaquita **[B]** (33 %) e índigo carmín **[A]** (77%). Esta mejora podría ser relacionada con la presencia de fenoles en los extractos como el 4-hidroxibenzaldehído, guayacol, vainillina, ácido gálico y otros que pueden ser sustratos reconocidos por las lacasas y también pueden ser útiles como mediadores. La respuesta de los CDL en la decoloración de tintes fue diferente entre ellos aun cuando el contenido de fenoles en los extractos fue similar (0.27-0.28 mg AG/ml). Esta variación en el comportamiento podría ser atribuida a diferencias en la mezcla y/o proporción de fenoles, tipo de sustratos, reversibilidad en la reacción, estabilidad del radical fenoxi y el potencial redox del mediador ([Fernández-Sánchez et al., 2002](#), [Rosado et al., 2012](#)).

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que los extractos CDL2 y CDL3 contienen mediadores efectivos para la decoloración de tintes, por lo que fueron seleccionados para continuar con los estudios.

Capítulo 6. Resultados y discusión

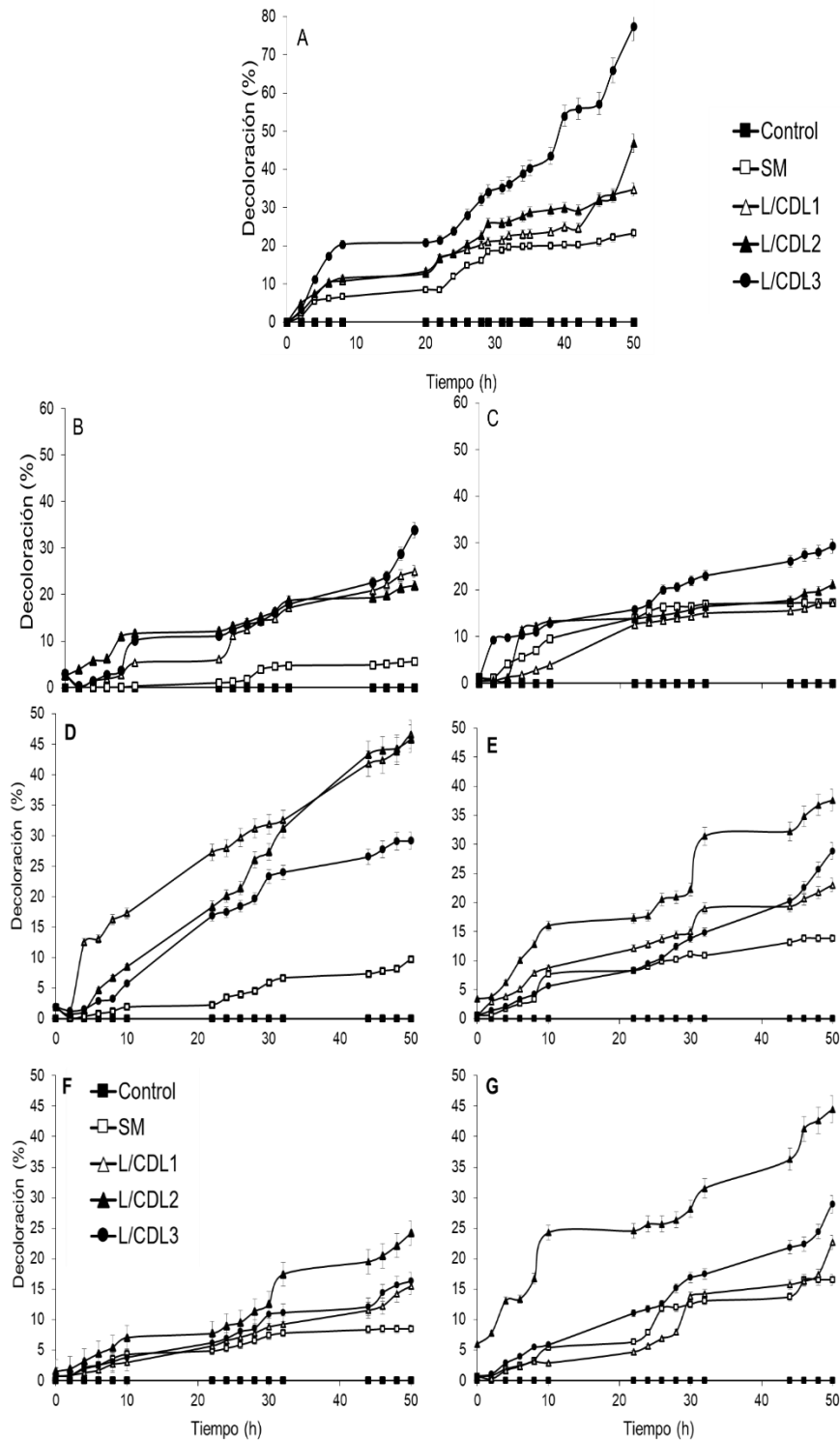


Figura 6.3. Decoloración de tintes industriales con el sistema lacasa-CDL, lacasa sin mediador (SM) y control sin enzima a pH 5, 40°C. **[A]** índigo carmín, **[B]** verde malaquita, **[C]** black5, **[D]** cristal violeta, **[E]** remazol brillante, **[F]** rojo congo, **[G]** poly R-478.

Capítulo 6. Resultados y discusión

6.3 Efecto de la concentración de CDL en la decoloración de tintes industriales

El establecimiento de la concentración del mediador es importante debido a su efecto variable sobre las lacasas; bajas concentraciones pueden limitar la acción de la enzima y altas concentraciones pueden actuar como inhibidores. Las concentraciones evaluadas fueron 0.150, 0.300, 0.525, 0.700, 0.875 y 1.0 (mg AG/ml). La Figura 6.4 muestra que la adición de CDL2 y CDL3 a la lacasa, incrementó la decoloración de manera dependiente a la concentración de fenoles cuando la actividad de la lacasa fue constante. El incremento de CDL2 hasta 0.7 mg/ml aumentó de 16% a 57% la decoloración, pero a mayor concentración se observó un efecto inhibitorio. Durante el tratamiento del tinte rojo congo el mayor incremento se obtuvo con 0.88 mg/ml del mediador alcanzando un máximo de 38% de decoloración con respecto al 7% obtenido en su ausencia. La decoloración del remazol brillante y cristal violeta fue mayor con 0.7 mg/ml, donde la decoloración aumentó de 8 % a 38 % y de 11% a 40 % respectivamente en ausencia y presencia del mediador. La concentración de CDL3 también mostró un efecto en la decoloración. El tratamiento del tinte black 5 mejoró de 5 % a 43 % con 0.55 mg, verde malaquita de 17 a 37% y el índigo carmín de 20 a 77 % con 0.7 mg/ml; así mismo concentraciones mayores a las señaladas mostraron un efecto negativo en la decoloración. En todos los tratamientos el tiempo se redujo de 50 horas a 24 horas, lo que indica que la velocidad de decoloración de los tintes con las lacasas de *T. hirsuta* Bm2 fue positivamente relacionado con la concentración del mediador. Los resultados de nuestro estudio coinciden con los reportados por [Bibi et al., 2011](#), quienes evaluaron el efecto del incremento en la concentración de mediadores fenólicos obtenidos de la cáscara de nuez. Los resultados mostraron que al aumentar la concentración de los extractos fenólicos incrementó 38% la decoloración del verde de malaquita. [Lew et al., 2014](#), evaluaron extractos fenólicos ultrafiltrados (AU) producidos por el hongo *Pleurotus ostreatus*, donde encontraron un efecto positivo al aumentar la concentración de AU en la degradación de un hidrocarburo aromático policíclicos por lacasas, la adición de AU aumentó la velocidad de oxidación del antraceno de 27.8 % a 60.4 %.

Capítulo 6. Resultados y discusión

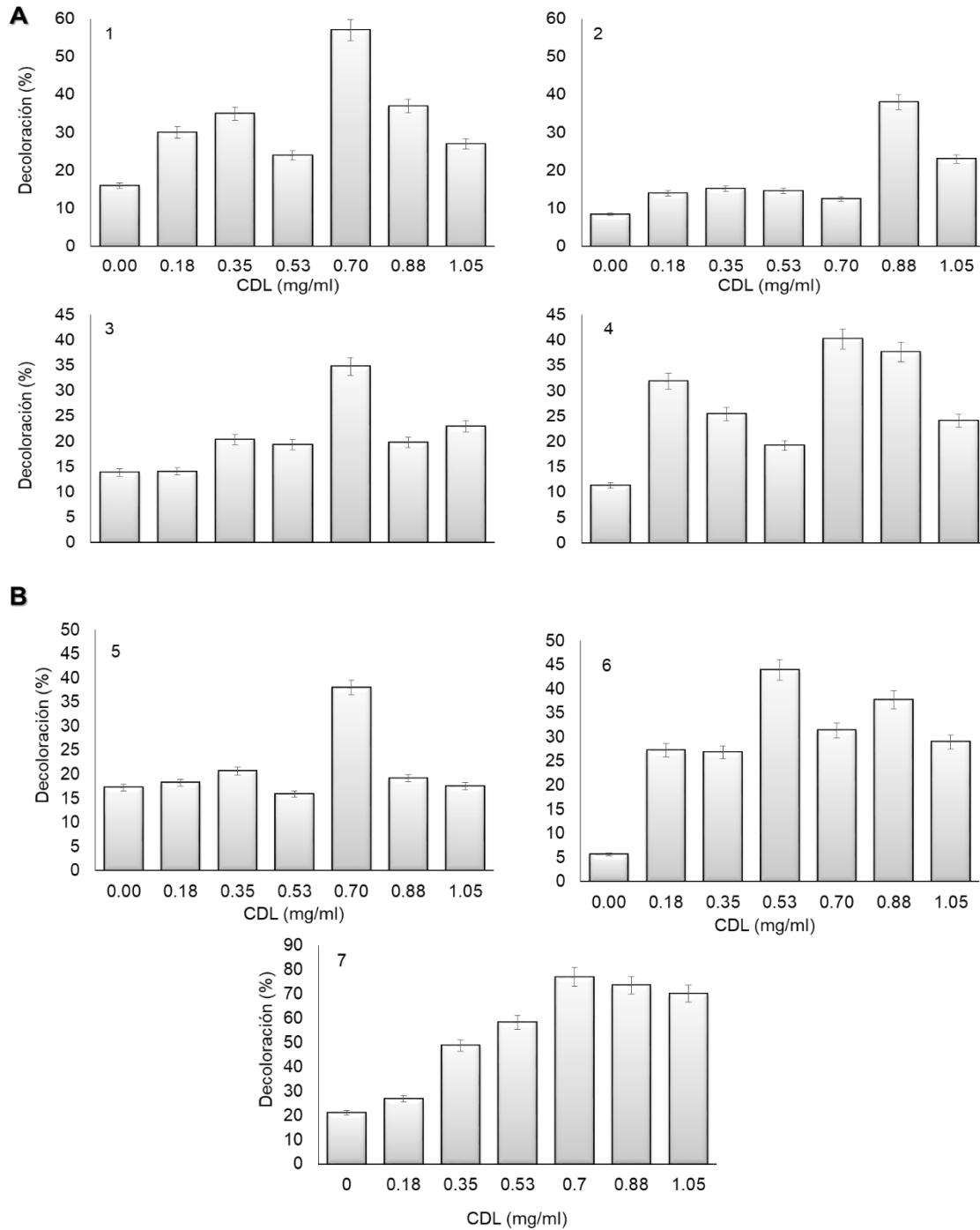


Figura 6.4. Efecto de la concentración del mediador **A** (CDL2) y **B** (CDL3) en la decoloración de tintes in por lacasas (24 h, pH 5, 40°C). La decoloración fue monitoreada a la longitud de onda máxima de cada tinte. 1) poly R478, 2) rojo congo, 3) remazol brillante, 4) cristal violeta, 5) verde malaquita, 6) black 5, 7) indigo carmín.

Capítulo 6. Resultados y discusión

6.4 Efecto del pH en la decoloración de tintes con el sistema lacasa/CDL

El pH ha demostrado ser un parámetro que afecta la actividad catalítica de las lacasas de *T. hirsuta* Bm2, cuya máxima actividad de tres isoenzimas aisladas es de pH 4.5 ([Zapata-Castillo et al, 2012](#)). El pH óptimo en el sistema lacasa-mediador es factor determinante en los procesos, ya que el pH afecta el grado de ionización de la enzima, del mediador y del tinte influyendo en la eficiencia en la decoloración. Se evaluó el sistema lacasa-CDL en un rango de pH de 4 a 7 usando la mejor concentración del mediador y lacasas (300 U) a 40°C para determinar la pérdida de absorbancia del tinte en intervalos de 2 h durante tres días. La Figura 6.5 muestra que el pH óptimo del sistema de reacción se encuentra en el rango ácido aunque varía en función del tinte. El tratamiento L/CDL2 mostró que el mejor pH los tintes azo (rojo congo y black 5) es de 4.5 con 52% de remoción de color, los trifenilmetano (cristal violeta y verde de malaquita) mostraron la máxima decoloración (53%) a pH 6, el indigoide a pH 6 fue removido 98% y en los antraquinónicos (remazol brillante y poly R-478) a pH 5 y 6 la decoloración fue 71 y 76 % respectivamente. [Montoya et al., 2014](#) determinaron que a pH 6 la decoloración del remazol brillante la enzima lacasa fue capaz de oxidar este colorante de tipo cromóforo antraquinona en un 14 %, a diferencia, con la adición de compuestos derivados de la lignina incrementaron la decoloración a 71 % a pH 6. En otro estudio, [Cañas et al., 2010](#) reportó que la decoloración del índigo carmín fue incrementada de 12 a 52% a pH5. Cuando utilizó el sistema lacasa/ mediadores naturales de la lignina. En nuestro estudio el SLM de *Trametes hirsuta* Bm2 mostró ser más eficiente en la decoloración de tintes en comparación con otros reportes como el de [Moreira, et al., 2017](#), quienes reportaron que la decoloración del polyR-474 fue ineficiente en un rango de pH de 3.5-6 aún con la adición del SLM; evaluó el efecto del pH en la decoloración del rojo congo cuyo máximo fue 21.3% a pH 4.5-5. También la decoloración del tinte black 5 fue ineficaz con la lacasa sola en un amplio rango de pH, sin embargo mejoró a 38% con la adición del sistema lacasa-extractos de licor de eucalipto a pH 6 ([Cañas et al., 2010](#)).

Capítulo 6. Resultados y discusión

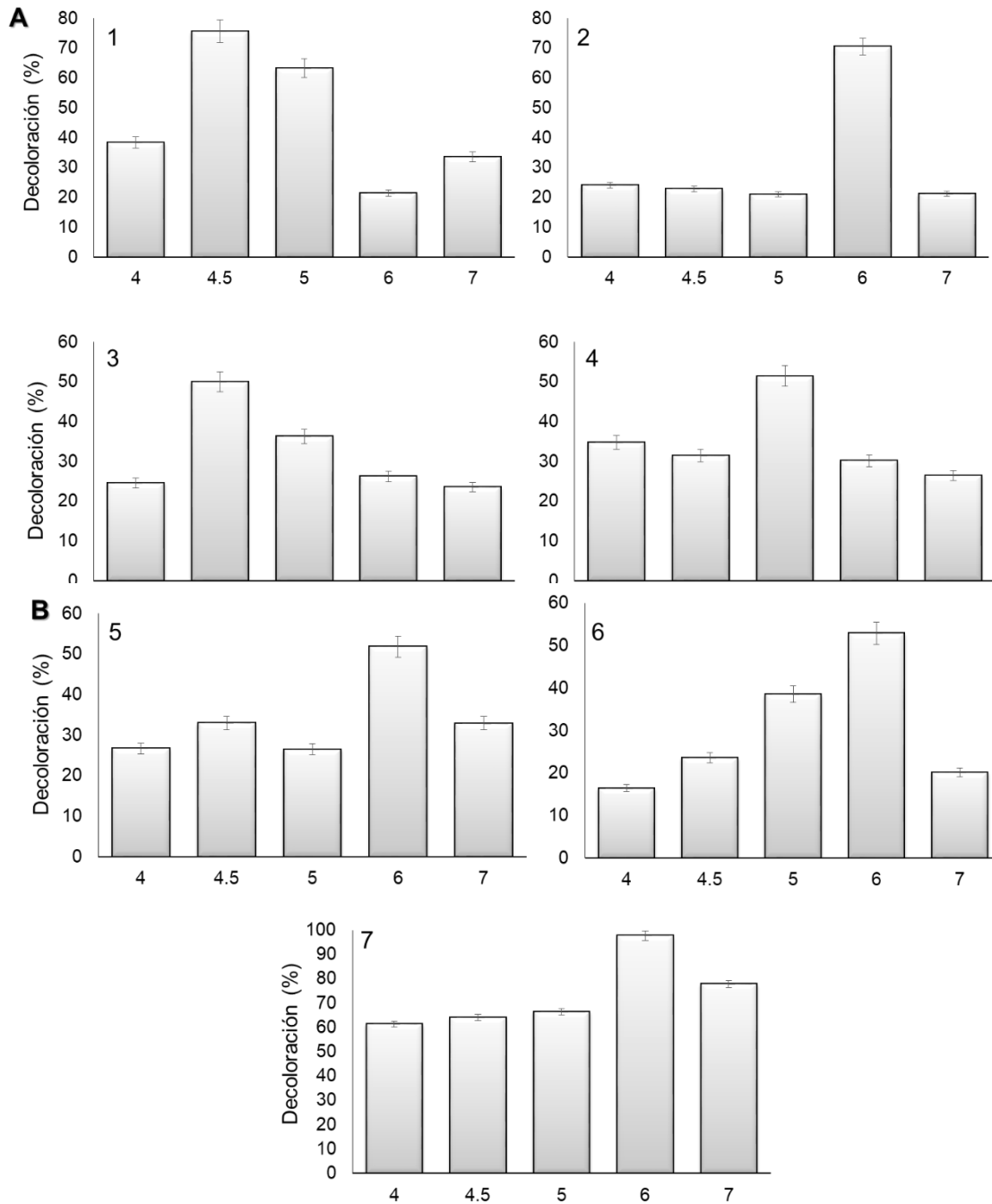


Figura 6.5. Influencia del pH en la decoloración de tintes con **A**: L/CDL2, **B**: L/CDL3 durante 24 h de tratamiento. 1) poly R478, 2) remazol brillante, 3) rojo congo, 4) cristal violeta, 5) black 5, 6) verde malaquita, 7) indigo carmín.

Capítulo 6. Resultados y discusión

Es conocido que la acción catalítica de la mayoría de las lacasas fúngicas opera en el rango de pH ácido y que la eficiencia en la pérdida de color disminuye por arriba del pH óptimo el sistema de reacción de la lacasa sola y/o del SLM. [Zeng et al., 2017](#), señalaron que el potencial redox de los tintes y mediadores aumenta preferentemente cuando el pH es menor a 5. La diferencia entre el potencial redox del mediador oxidado (radical libre), tinte/ y la enzima que comúnmente presenta un bajo potencial redox, disminuye cuando el pH se incrementa, lo cual decrece la oxidación del sustrato. Sin embargo el pH óptimo del sistema lacasa-mediador dependerá también de la estructura del tinte.

Por ejemplo [Peyratout et al., 1994](#) determinaron que la mayor decoloración de un efluente textil usando el sistema lacasa-mediador HBT (hidroxibenzotriazol) ocurrió a pH 5 y al aumentar el pH disminuyó progresivamente. Esta respuesta se atribuyó a que el aumento de la concentración del anión hidroxilo contribuye a que el anión hidróxido se una al ligando protonado en el closter de cobre T2/T3 de la lacasa deteniendo la transferencia de electrones del sitio de cobre T1 a los centros T2/T3 y por tanto inactivando la actividad de lacasa. Asimismo, se ha reportado que el potencial redox del sitio de cobre T1 de la lacasa es muy poco influenciado por el pH [Xu et al., 1999](#).

La Tabla 6.2 compara la eficiencia de la lacasa y el SLM y muestra las condiciones establecidas para el sistema lacasa-mediador L/CDL2 y L/CDL3 relacionados con la mejor concentración del mediador, pH óptimo y los tintes. No hubo una correlación entre el mediador y el tinte, L/CDL2 mostró una acción preferencial sobre dos tintes antraquinónicos, un azo y un tinte trifenilmetano cuya pérdida de color fue 4-6 veces mayor que sin mediador. El sistema L/CDL3 mejoró 3.12 a 10.4 veces la pérdida de color de un tinte diazo, un indigoide y un trifenilmetano en relación a la lacasa sola, lo que muestra el potencial de los extractos fenólicos obtenidos del salvado de trigo en la decoloración de tintes.

Tabla 6.2. Comparación de la decoloración de tintes por la lacasa y el SLM

Sistema	Tinte	pH	Conc. (mg/ml)	Decoloración (%)		Incremento (veces) LM vs L
				L	LM	
L/CDL2	Poly R-478	4.5	0.70	16	76	4.75
	Remazol B	6	0.70	14	71	5.07
	Rojo congo	4.5	0.87	8	50	6.25
	Cristal violeta	5	0.70	11	52	4.73
L/CDL3	Black 5	6	0.52	5	52	10.4
	Verde malaquita	6	0.70	17	53	3.12
	Índigo carmín	6	0.70	21	98	4.67

6.5 Efecto de mediadores naturales y sintéticos en la decoloración de tintes

Muchos estudios han evidenciado la eficiencia de mediadores sintéticos y naturales en la decoloración de tintes y la eliminación de otros compuestos xenobióticos. En este trabajo se evaluó el efecto de los mediadores sintéticos ABTS y HBT que han sido descritos como los más potentes mediadores de lacasas. También se evaluaron cuatro mediadores naturales: siringaldehído (Sir), 2,6 dimetoxifenol (DMF), ácido p-cumárico (AC) y guayacol (G) a concentración 50 mM en base a lo reportado por [Jin et al., 2016](#) y se compararon con la decoloración con las lacasas sin mediador. Los resultados se muestran en las Figuras 6.6.

Capítulo 6. Resultados y discusión

El siringaldehido mostró ser un potente mediador de las lacasas de *Trametes hirsuta* Bm2 en la decoloración del índigo carmín (indigoide) que alcanzó una remoción de 79%

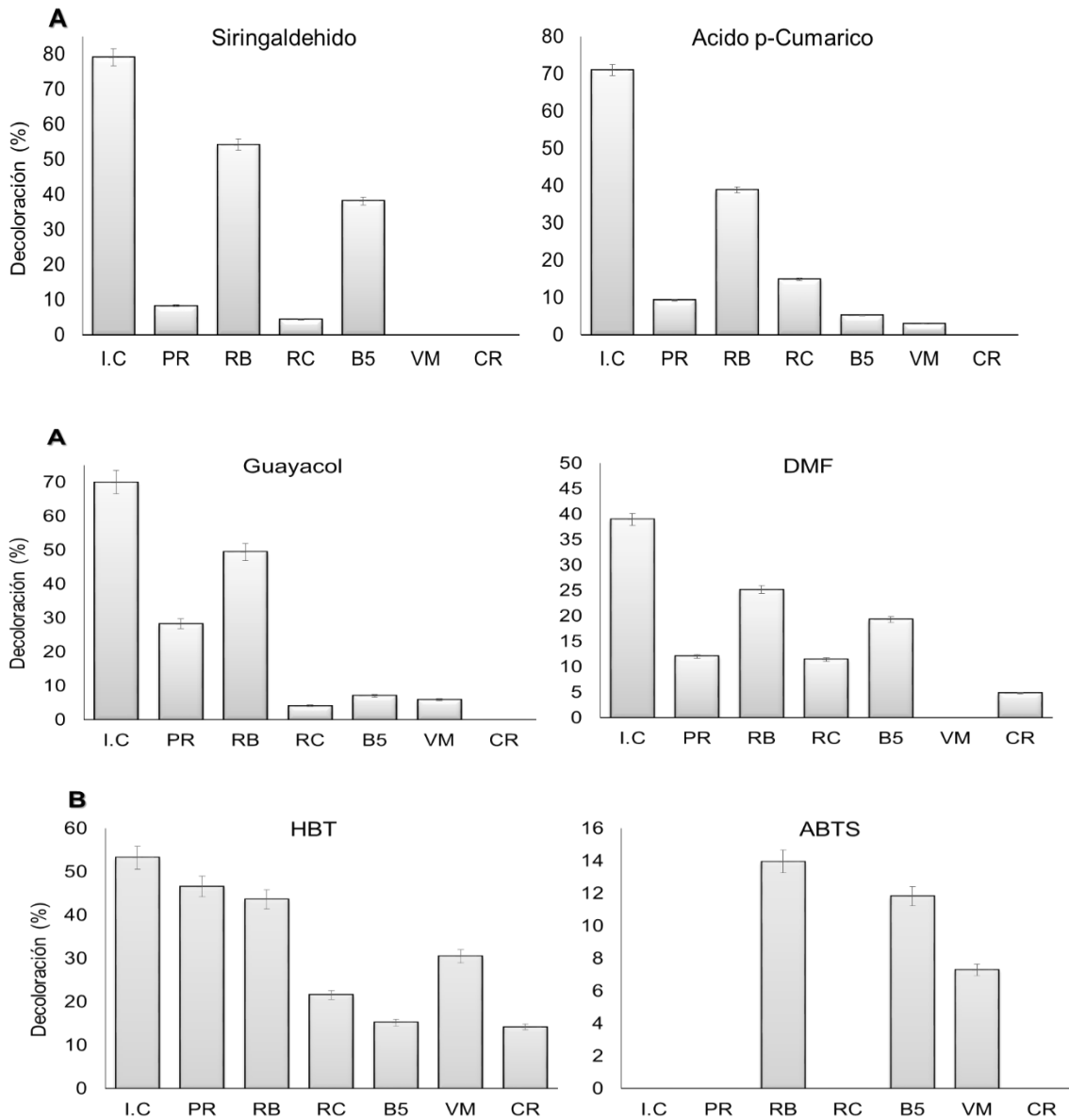


Figura 6.6. Efecto de la adición de mediadores naturales (A) y mediadores sintéticos (B) a la lacasa de *T. hirsuta* Bm2 a 40°C. La pérdida de la absorbancia fue monitoreada a la longitud de onda máxima de cada tinte. **I.C** (índigo carmín), **PR** (poly R-478), **RB** (remazol brillante), **RC** (rojo congo), **B5** (black 5), **VM** (verde malaquita), **CR** (cristal violeta).

Capítulo 6. Resultados y discusión

También la decoloración del tinte black 5 (dialo) fue notablemente influenciada por la adición de Sir que aumentó 6 veces con respecto al control, aunque la máxima decoloración fue de 37% debido a la alta recalcitrancia del tinte. Este resultado coincide con lo reportado por [Heap et al., 2014](#) quienes determinaron que el Sir incrementó 15% la decoloración del black 5. Los resultados también mostraron que Sir afecta negativamente la decoloración de otros tintes. El efecto mediador del ácido p-cumárico y guayacol solo fue evidenciado en la decoloración del índigo carmín y el remazol brillante, mientras que el DMF únicamente mostró ser un buen mediador para el índigo carmín. [Camarero et al., 2007](#) sugirió que la presencia del grupo fenolato en el ácido p-cumárico podría ser relacionado a su acción como mediador de lacasas. También fue observado que estos mediadores produjeren una drástica reducción en la decoloración de otros tintes. Estos resultados coinciden con otros estudios en donde los mediadores naturales muestran acción preferencial sobre unos tintes pero afectan negativamente la decoloración de otros. Esta respuesta ha sido relacionada con las diferencias en la estructura del tinte, la estructura del mediador así como la afinidad de la enzima lacasa por el sustrato tinte (mediador y tinte).

Se conoce poco sobre los mecanismos de acción redox del sistema lacasa-mediador. El potente efecto mediador del siringaldehido en la decoloración de algunos tintes ha sido relacionado con la presencia de dos grupos metoxilos en su estructura química que disminuye su potencial redox. Esto le permite reaccionar con la lacasa que también presenta un bajo potencial redox generando radicales libres con alto potencial redox, que mejoran la eficiencia en la decoloración ([Moya-Lobo, 2011](#)). Estudios recientes han señalado a la acetosiringona como un potente mediador natural en la biotransformación, de tintes, antibióticos y fungicidas. El sistema lacasa-acetosiringona fue estudiado por [Martorana et al, 2013](#). En este estudio analizaron por resonancia magnética nuclear (RMN) los productos de transformación de la acetosiringona por la lacasa purificada de *Corioloopsis gálica*. Los resultados mostraron que el mediador fue oxidado repetidamente por la lacasa

Capítulo 6. Resultados y discusión

formando intermediarios (radicales libres) estables durante tres horas lo que permitió mejorar la acción del sistema lacasa-mediador.

El mediador sintético HBT mejoró tres veces la decoloración del IC y B5 y dos veces la de PR, VM y RC. [Moreira et al., 2017](#) evaluó diferentes mediadores sintéticos y determinó que el HBT fue el más eficiente en la decoloración del PR cuya máxima reducción del color fue de 46%, siendo este resultado similar a lo encontrado en este estudio. Se ha descrito que el mecanismo de acción del HBT sobre el tinte black 5 ocurre por transferencia de electrones. El mediador HBT es oxidado por la lacasa generando el radical HBT^{*}, a su vez éste oxida al ácido sulfónico que es el grupo más inestable del tinte así como el doble enlace N=N generando un HBT reducido (HBTr). El mediador es oxidado nuevamente por la lacasa para generar otro radical HBT^{*} que continúa degradando el tinte ([Heap et al., 2014](#)). Aun cuando este mediador es efectivo, se ha descartado la aplicación industrial de este compuesto debido a su alto costo y elevada toxicidad.

El ABTS fue el primer compuesto que demostró su acción como mediador de las enzimas lacasas. Aunque se ha mostrado que el ABTS ha mejorado la transformación de compuestos xenobióticos, en este estudio no mejoró la decoloración de ninguno de los tintes evaluados; inclusive, en el tratamiento de algunos tintes fue menor la decoloración que el control mostrando un claro efecto inhibitorio en la enzima. Estos resultados coinciden con lo reportado por [Hu et al., 2008](#), en donde no se logró mejorar la remoción tintes en comparación con la decoloración por la enzima sola. La Figura 6.7 muestra una imagen del resultado de todos los tratamientos.

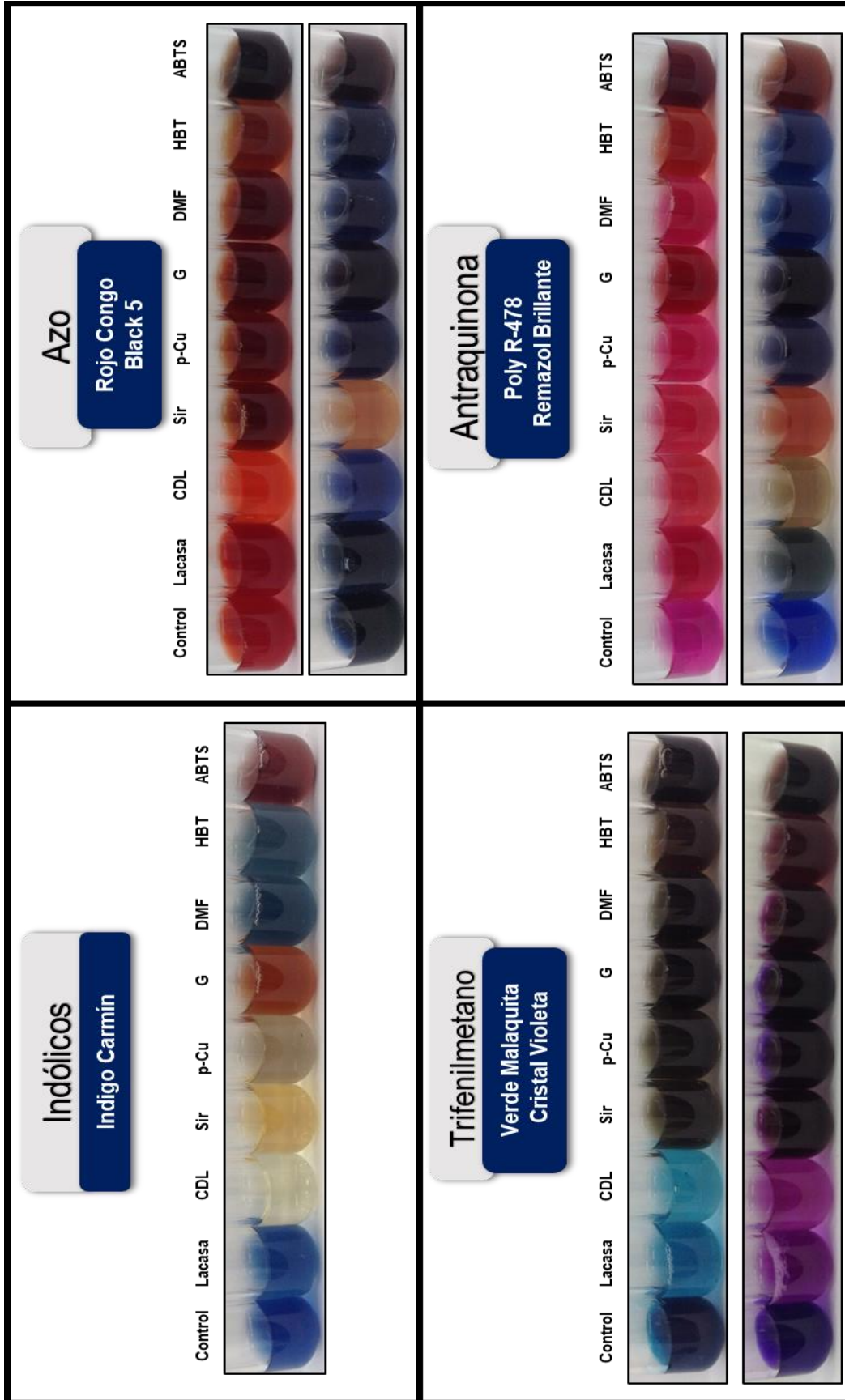


Figura 6.7. Decoloración de tintes industriales con lacasa sola, lacasa/CDL.

Capítulo 6. Resultados y discusión

La Tabla 6.3 muestra un resumen comparativo de los tratamientos con lacasa sin mediador, el SLM naturales y sintéticos grado reactivo y los CDL obtenidos en este estudio. Si bien fue observado un fuerte efecto mediador por la adición de algunos fenoles naturales grado reactivo, los resultados de este estudio muestran claramente que los extractos CDL tienen mayor poder mediador en la decoloración de tintes en varios órdenes de magnitud comparados con los mediadores grado reactivo. Se ha mencionado que durante el cultivo de los hongos en sustratos lignocelulósicos se liberan diversos fenoles derivados de la lignina como la acetosiringona, ácido cumárico, ácido vainílico, ácido ferúlico, guayacol entre otros, o algunos metabolitos secretados por el hongo. En este sentido [Pickard et al., 1999](#) y [Jeon et al., 2008](#) demostraron que la combinación de dos o más mediadores produjo un efecto sinérgico en la actividad oxidativa de la lacasa sobre compuestos recalitrantes. Por esta razón es probable que la eficiencia detectada por los CDL sea debida a un efecto sinérgico entre la enzima y los mediadores que favorece la decoloración de tintes.

En la misma Tabla 6.3 también se observan diferencias en el nivel de decoloración del SLM-CDL con los diferentes tintes. Dichas diferencias podrían atribuirse a la heterogeneidad de las estructuras de los tintes ya que estas estructuras presentan diferente distribución electrónica y variación en la densidad de carga, lo que influye en el potencial redox de los tintes [Cuillini et al., 2008](#).

Tabla 6.3. Comparación de la lacasa y los sistemas lacasa-mediador en la decoloración de tintes

Tintes	Decoloración (%)		
	Lacasa	CDL2	HBT
Rojo congo	8	50	21
Poly R-478	16	76	46
Cristal violeta	11	52	14
		CDL2	Sir
Remazol brillante	14	71	54
		CDL3	Sir
Índigo carmín	21	98	79
Black 5	5	52	38
		CDL3	HBT
Verde malaquita	17	53	30

6.6 Identificación y cuantificación de Compuestos derivados de la lignina

Con el fin de identificar los fenoles presentes en los extractos CDL se realizaron cromatografías HPLC. Se corrieron 7 estándares: el ácido sirínico, ácido vainílico, alcohol veratrílico, 4-hidroxibenzaldehido, ácido cumárico, siringaldehido y guayacol y se determinó el tiempo de retención (TR) que sirvieron de referencia para identificar y cuantificar fenoles de los extractos (los cromatogramas se presentan en el [Anexo E](#)).

Los cromatogramas CDL2 y CDL3 mostraron diferencias en la composición y concentración de los fenoles. En CDL2 se identificaron picos correspondientes a fenoles de ligninas: ácido sirínico, ácido vainílico, siringaldehido y guayacol (TR) de 18.3, 19.3, 22.74 y 25.51 respectivamente. En el extracto CDL3 estuvo presente ácido vainílico, 4-HDB, siringaldehido, ácido cumárico y guayacol. En ambos cromatogramas se detectó la presencia de otros picos que no fueron identificados.

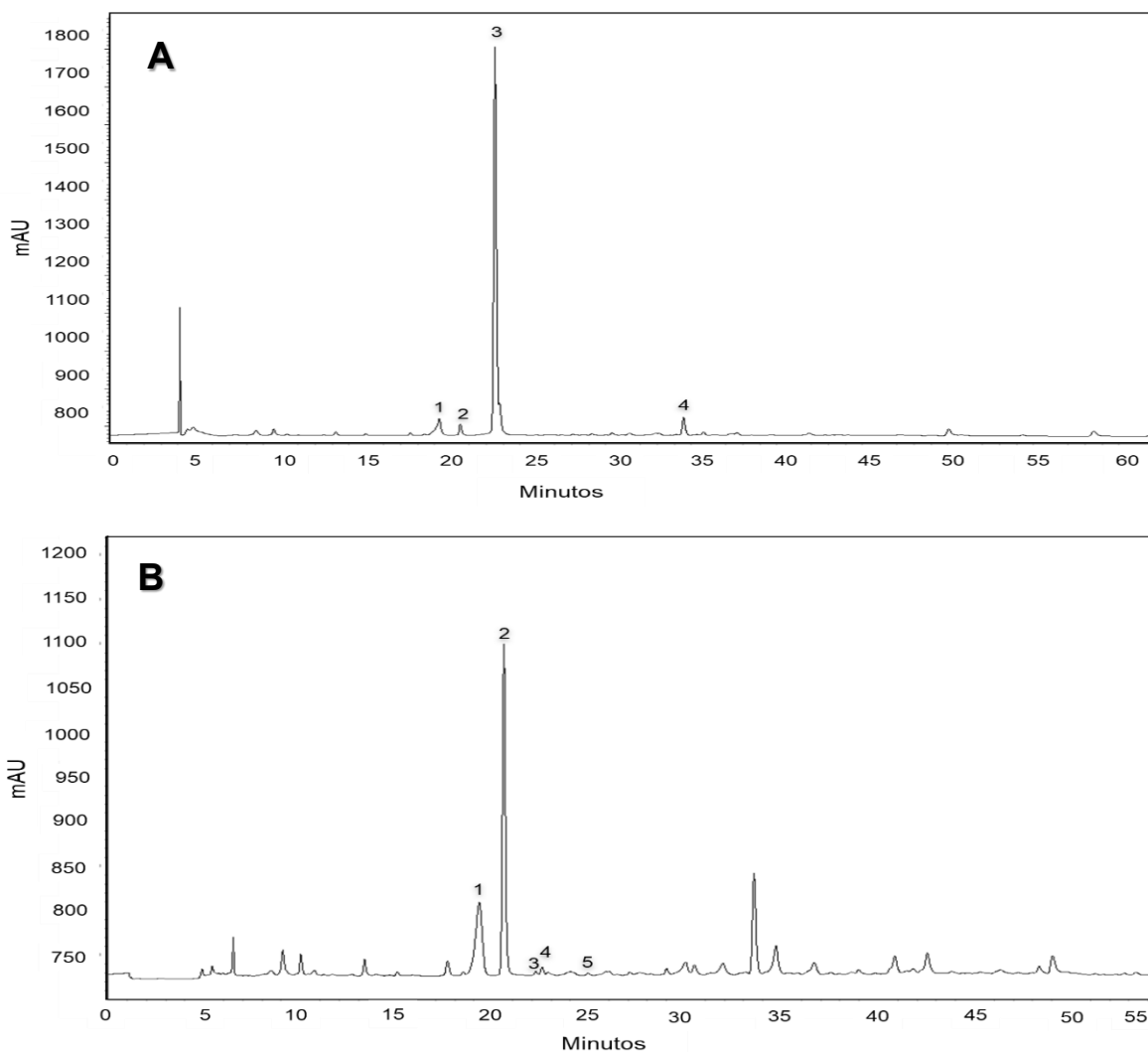
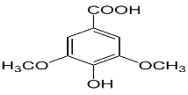
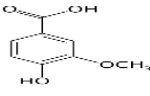
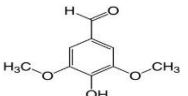
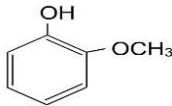
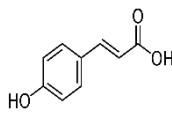
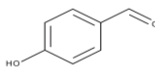


Figura 6.8. Cromatografía HPLC CDL2 (A), CDL3 (B) a 280 nm, 1: Ácido vainílico; 2: 4-hidroxibenzoico; 3: ácido p-cumarico; 4: siringaldehido; 5: guayacol.

La Tabla 6.4 muestra las diferencias en perfil y concentración de los fenoles identificados. La presencia del siringaldehido y 4HB demostraron ser mediadores naturales grado reactivo, que potenciaron la decoloración en algunos tintes.

Capítulo 6. Resultados y discusión

Tabla 6.4. Concentración de compuestos fenólicos en CDL2 y CDL3

Nombre común	Nomenclatura	Estructura	CDL2	CDL3
			mM	
ácido siríngico/ ác. gálico	4-hidroxi 3,5 dimetoxibenzoico		0.65	0.0
ácido vainílico	4-hidroxi-m-anisíco		0.43	1.48
siringaldehído	4-Hidroxy3,5-dimetoxi benzaldehyde		3.94	0.79
guayacol	Hidruro de guayacilo		0.0	0.73
ácido <i>p</i> -cumárico	4-hidroxicinámico		0.74	0.83
4-hidroxibenzaldehído	4hidroxibenzaldehído		0.0	3.75

El 4- hidroxibenzaldehído natural es conocido particularmente por su potencial acción en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Asimismo se ha sugerido un efecto sinérgico en la oxidación de 4-hidroxibenzandehído por lacasa, con la adición del metilo del siringaldehído [Bratkovskaya et al., 2006](#). Es importante señalar que aunque los otros fenoles identificados no estuvieron presentes en la misma proporción que sir y 4HB, es probable que también puedan actuar como mediadores en la decoloración ya sea de manera individual o mediante la combinación de dos o más compuestos que pueden tener un efecto sinérgico en la oxidación de la lacasa. [Camarero et al., 2007](#)

Capítulo 6. Resultados y discusión

El interés en estos mediadores fenólicos de origen natural se ha incrementado por su uso potencial en diversos estudios a medida que se pueden obtener fácilmente a partir de sustratos naturales lignocelulósicos mediante extracción orgánica [Camarero *et al.*, 2007](#). Los extractos fenólicos obtenidos en este estudio contienen mezclas de fenoles que demostraron su eficiencia como mediadores de lacasas en la decoloración de tintes de diferente estructura química.

6.7 Biotransformación del índigo carmín con el sistema L/CDL3

Los hongos de la podredumbre blanca son capaces de eliminar el color de los tintes a través de las enzimas oxidativas que producen, sin embargo se conoce poco sobre los mecanismos de la biotransformación de tintes, cuya ruta puede variar dependiendo de la fuente de la enzima lacasa, el tinte y el sistema lacasa-mediador. La ruta de degradación del índigo carmín ha sido la más estudiada debido a que el tinte está presente en altas concentraciones en los efluentes de la industria textil ([Li et al., 2015](#)) y es conocido por su acción mutagénica, cancerígena y de alta toxicidad en células microbianas, animales y humanas ([Dixit and Goyal, 2013](#), [Bhattacharjee, 2014](#))

El rompimiento del grupo cromóforo es un paso crucial en la decoloración de tintes, esta modificación genera intermediarios más susceptibles a ser biodegradados ([Holkar et al., 2016](#)). El centro del cromóforo del índigo carmín consiste en un doble enlace C=C sustituido por dos grupos NH y dos grupos aceptores CO ([Dubé et al., 2008](#)). Para identificar los productos de la decoloración, se analizaron por HPLC las soluciones antes y durante el tratamiento con lacasas y el sistema lacasa-mediador. La Figura 6.9A, muestra el cromatograma de la solución inicial antes del tratamiento, donde se identificó a 600 nm un pico con tiempo de retención (TR) de 5.22 (5 mM) que es característico del IC y es responsable del color azul. Después de 16 horas de tratamiento con la lacasa, el pico fue ligeramente reducido y también se detectó la aparición de un pico a 403 nm con TR de 13.1 min que corresponde a la isatina (2,3-dioxo-2,3-dihidroindol), lo cual sugiere que la lacasa rompió el grupo cromóforo del tinte generando un nuevo compuesto (Figura. 6.9B). A las 24 h de tratamiento se redujo el pico de isatina y no se detectó la aparición de otros picos. La transformación del IC a isatina ha sido identificada mediante análisis de HPLC y por otros métodos cromatográficos ([Dalmazio et al., 2007](#); [Cano et al., 2011](#)). En un estudio realizado por [Campos et al., 2001](#) encontraron que la degradación del IC por lacasas purificadas *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii* ocurrió mediante la ruptura de IC a dos moléculas indol sulfonatadas (isatin ácido sulfónico, IAS) que por descarboxilación producen ácido antranílico como producto final. A diferencia [Wang et al., 2017](#), reportaron la degradación de IC por lacasas hasta IAS pero éste

Capítulo 6. Resultados y discusión

no fue transformado a ácido antranílico. Este hecho ha sido atribuido a la presencia del ácido sulfónico enlazado al anillo aromático de la IAS que presenta alta estabilidad química y puede causar recalcitrancia a la molécula ([Capalash y Sharma, 1992](#)). En otro estudio, ([Kettle et al., 2004](#)) reportaron que la decoloración del IC con la enzima superóxido dismutasa y catalasa ocurre en un solo paso en donde la presencia del superóxido convierte el IC en isatina. Diversos factores pueden influir en la velocidad de la degradación enzimática del índigo carmín y la permanencia de la isatina después de horas de reacción, como los fenómenos de adsorción y la accesibilidad potencial redox de la enzima, ([Muñoz et al., 2016](#)).

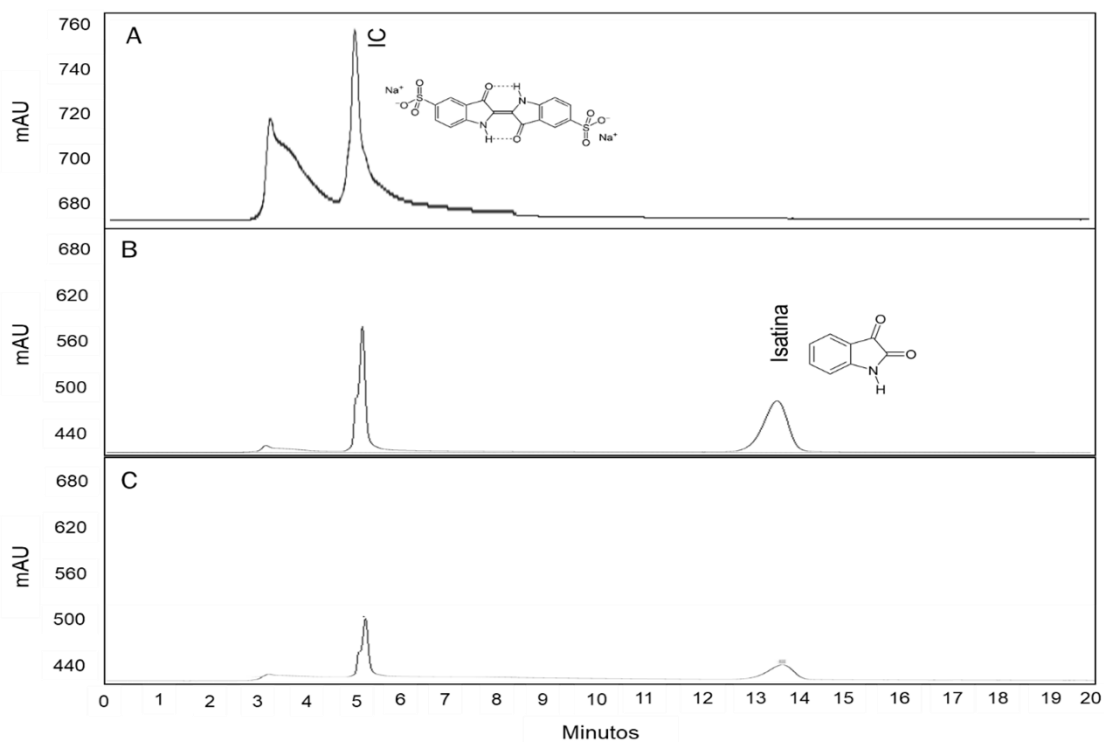


Figura 6.9. Cromatograma de la solución del IC tratada con lacasas. A tiempo 0 (A), 16 h (B), 24 h(C) a longitudes de onda de 430 (isatina) y 600 nm (IC).

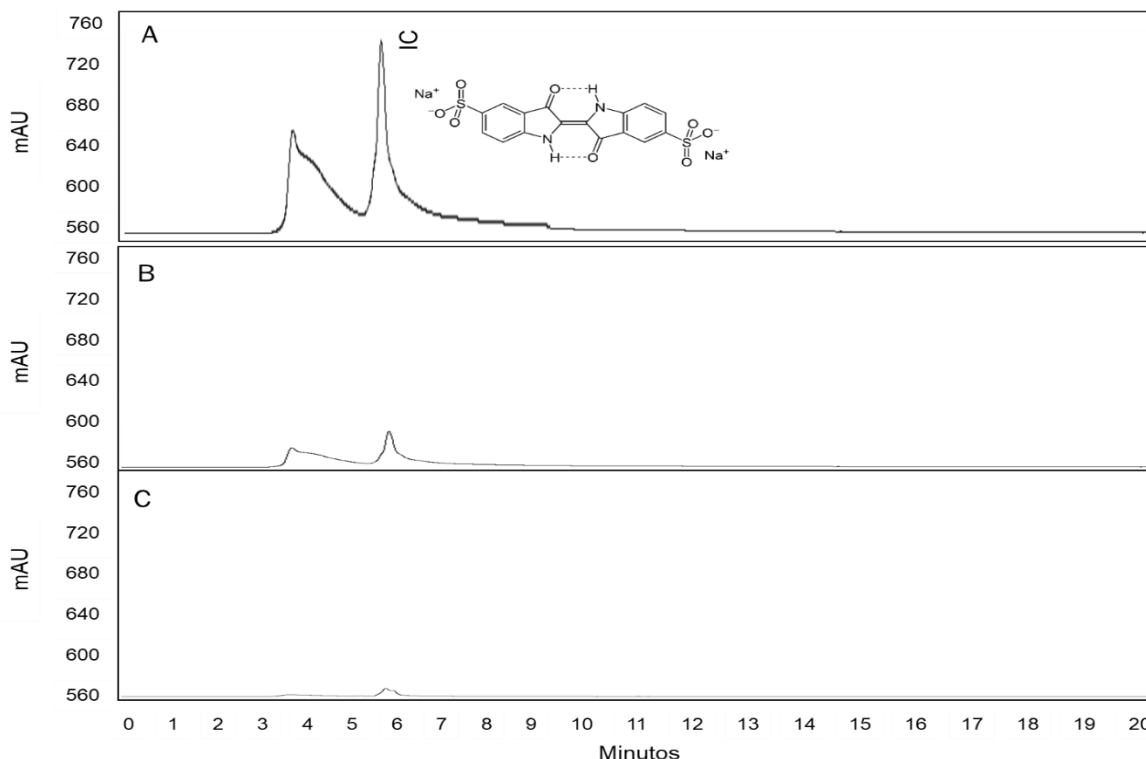


Figura 6.10. Cromatograma de la solución del IC tratada con el SLM , a tiempo 0 (A) 16 h (B), 24 h (C), a longitudes de onda de 430 (isatina) y 600 nm (IC).

El tratamiento del tinte con el sistema lacasa-mediador L/DL3 se muestra en la Figura 6.10. Se observó una notoria reducción del pico IC de 5.0 mM a 0.00956 mM a las 16 h de tratamiento, lo que representa un remoción de 98% e indica que la decoloración fue prácticamente completa. La máxima reducción del tinte se observó a las 24 h y fue de 0.00033 mM. Aun cuando se eliminó el color, no se detectó la aparición del pico isatina en los cromatogramas (Figura 6.10). Cabe mencionar que no se detectó la isatina (403 nm), ni otros intermediarios a 375 y 280 nm en los tratamientos de 2, 4 y 8 h (resultados no mostrados).

Los resultados de este estudio permitieron establecer que la vía de transformación del indigo carmín es a través de la transferencia de electrones de la lacasas de *T. hirsuta* Bm2 hasta isatina. Sin embargo no fue posible establecer la ruta con el sistema lacasa mediador. Sabemos que durante la transformación de sustratos por las lacasas se generan radicales libres inestables como intermediarios que podrían sufrir transformaciones espontáneas o nuevas transformaciones enzimáticas muy

Capítulo 6. Resultados y discusión

rápidas hasta CO₂ y H₂O ([Thurston, 1994](#); [Yaropolov et al., 1994](#)). La Figura 6.11 muestra los intermediarios que pueden formarse durante la degradación del índigo, pero que dependerán de la fuente de lacasa. Estudios como espectroscopía IF-TR y resonancia magnética nuclear (RMN) podrían permitir profundizar en estos estudios.

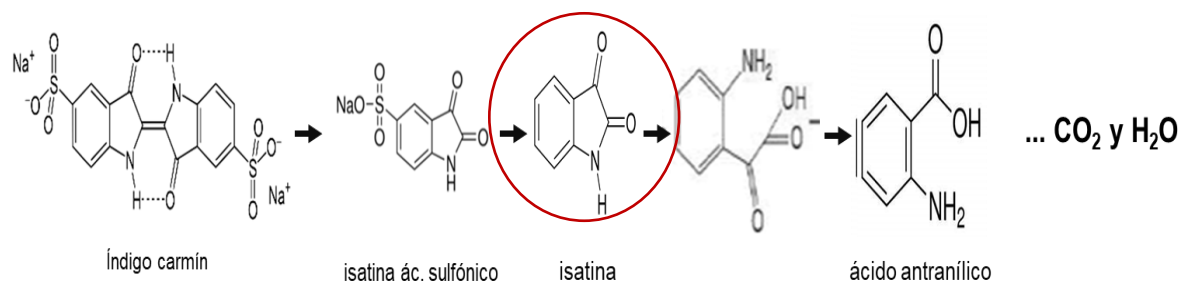


Figura 6.11. Ruta de la transformación del índigo carmín por lacasas fúngicas.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran la eficiencia del SLM en la decoloración del IC, donde no se acumulan intermediarios como la isatina que ha demostrado en células de mamífero “*in vivo*” su acción mutagénica y genotóxica ([Candido-Bacani et al., 2011](#)).

7 CONCLUSIONES

Los extractos CDL fueron más eficientes en la decoloración de tintes en comparación de los mediadores sintéticos y los mediadores naturales Grado Reactivo.

El mediador CDL2 mejoró de 4 a 6 veces la decoloración de los tintes: poly R.478, rojo congo, remazol brillante y cristal violeta y CDL3 de 3 a 10 veces el tratamiento de índigo carmín, verde malaquita y black 5, probablemente debido a un efecto sinérgico.

Los extractos CDL2 y CDL3 mostraron diferencias en el perfil y concentración de fenoles que han demostrado ser eficientes mediadores de lacasas.

En el análisis por HPLC reveló que la biotransformación del índigo carmín no se acumula la isatina que es un intermediario toxico en la degradación del índigo carmín lo que sugiere una mayor eficiencia en la biodegradación del tinte.

Los resultados de este estudio mostraron la eficiencia del SLM de *T. hirsuta* en la decoloración de tintes de diferente estructura química, lo que sugiere que tienen un potencial para su aplicación en el tratamiento de efluentes con mezclas complejas de tintes.

8 REFERENCIAS

- Ancona-Escalante W, Tapia-Tussell R, Pool-Yam L, Can-Cauich A, Lizama-Uc G, Solís-Pereira S. 2018. Laccase-mediator system produced by *Trametes hirsuta* Bm-2 on lignocellulosic substrate improves dye decolorization. *3 Biotech* 8, 298.
- Andrade-Ponce G, Duhalt-Vázquez R, Rodríguez-Vázquez R, Medina-Ramírez I, Lozano-Álvarez J. 2012. Scanning electronic microscopy evidence of phenol-formaldehyde resins biodegradation with ligninolytic fungi. *International Environmental Pollution* 28, 2.
- Arias M, Arenas M, Rodríguez J, Soliveri J, Ball A, Hernández M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT3335. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1053–1958.
- Arslan-Alaton I., Tureli G. y Olmez-Hanci T. 2009. Treatment of azo dye production wastewaters using Photo-Fenton-like advanced oxidation processes: Optimization by response surface methodology. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 202, 142-153.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases-occurrence properties. *FEMS Microbiology Review* 30, 215–242.
- Benfield G, Bocks M, Bromley K, Brown B. 1964. Studies in fungal and plant laccases. *Phytochemistry* 3, 79-88.
- Bhattacharjee M .2014. Studies on mitodepressive effect of indigo carmine. *International Journal Innovation Science Engineering Technology* 1, 157–160
- Bibi I, Nawaz-Bhatti H. 2011. Biodecolorization of reactive black5 by laccase-mediator system. *African Journal of Biotechnology* 29, 7464-7471.
- Bourbonnais R, Leech D, Paice M. 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochemical Biophysica* 1379, 381–390.
- Bourbonnais R, Paice M. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267, 1873-3468.

Capítulo 8. Referencias

- Bradford M. 1976. A Rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Branchi B, Galli C, Gentili P. 2005. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox. *Organic and Biomolecular Chemistry* 3, 2604-2614.
- Bratkovskaya I, Ivanec R, Kulys J. 2006. Mediator-assisted laccase-catalyzed oxidation of 4-hydroxybiphenyl. *Biochemistry (Moscow)* 71, 550-554.
- Camarero S, Ibarra D, Martínez Á, Romero J, Gutiérrez A, Del Río J. 2007. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbiology Technology* 40, 1264–1271.
- Camarero S, Ibarra D, Martínez Á. 2006. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators of decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1775-1784.
- Campos R, Kandelbauer A, Robra K, Cacaco A, Gubitz G. 2001. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology* 89, 131-139.
- Candido-Bacani P, Dos-Reis M, Serpeloni J, Calvo T, Vilegas W, Varanda E, De SyllosColus I. 2011. Mutagenicity and genotoxicity of isatin in mammalian cells *in vivo*. *Mutation Research* 719, 47–51
- Cano M, Solis M, Diaz J, Solis A, Loera O, Teutli M. 2011. Biotransformation of indigo carmine to isatin sulfonic acid by lyophilized mycelia from *Trametes versicolor*. *African Journal of Biotechnology* 10, 12224-12231.
- Cantarella G, Galli C, Gentili P. 2003. Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems catalytic or stoichiometric procedures. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 22, 135-144.
- Cañas A, Camarero S. 2010. Laccases and their natural mediators. *Biotechnology Advances* 28, 694–705.

Capítulo 8. Referencias

- Capalash N, Sharma P. 1992. Biodegradation of textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 309-312.
- Ciullini I, Tilli S, Scozzafava A, Briganti F. 2008. Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes. *Bioresource Technology* 99, 7003-7010.
- Dalmázio I, De Urzedo A, Alves T, Catharino R, Eberlin M, Nascentes C, Augusti R. 2007. Electrospray ionization mass spectrometry monitoring of indigo carmine degradation by advanced oxidative processes. *Journal of Mass Spectrometry* 42, 1273-1278.
- Dashtban M, Schraft H, Syed T, Qin W. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36-50.
- Dixit A, Goyal R. 2013. Evaluation of reproductive toxicity caused by Indigo carmine on male swiss albino mice. *Pharmacology* 1, 218–224.
- Dos-Santos A, Cervantes F, Van-Lier J. 2015. Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology* 98, 2369-2385.
- Dubé E, Shareck F, Hurtubise Y, Daneault C, Beauregard M. 2008. Heterologous cloning, expression, and characterization of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolorization of an indigo carmine dye. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 597-603.
- El-Shora H, Youssef M, Khalaf-Salwa A. 2008. Inducers and Inhibitors of laccase from *Penicillium*. *Biotechnology* 28, 345-355.
- Fabbrini C, Galli P, Gentili K. 2002. Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 18, 226-234.
- Fernández J, Quevedo B, Florido A, Pedroza A. 2011. Use of a non-conventional biological system and advanced oxidation process with TiO₂/UV to the discoloration of reactive black5. *International Biotechnology Color Journal* 1, 9–19

Capítulo 8. Referencias

- Fernández-Sánchez C, Tzanov C, Gübitz G, Cavaco-Paulo A. 2002. Voltametric monitoring of laccase-catalyzed mediated reactions. *Bioelectrochemistry* 5,149–156.
- Fischer R, Ostafe R, Twyman R .2013. Colorants: Preparation and use of Indigo. *Advances in Biochemical Biotechnology* 136, 51-64.
- Galhaup C, Haltrich D. 2002.Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied and Environmental Microbiology* 56,225–232.
- Galli C, Gentili P.2004. Chemical messengers: mediated oxidations with the enzyme laccase. *Journal of Physical Organic Chemistry* 17,973-977.
- GilPavas E, Dobrosz-Gómez I, Gómez-García M. 2017. Coagulation-flocculation sequential with fenton or photo-fenton processes as an alternative for the industrial textile wastewater treatment. *Journal of Environmental Management* 191, 189-197.
- González J, Medina S, Rodriguez A, Osma J, Alméciga-Díaz C, Sánchez O. 2013. Production of *Trametes pubescens* laccase under submerged and semi-solid culture conditions on agro-industrial wastes. *PLOS ONE* 8(9), 73721.
- Guaratini C, Valnice M.2000. Textile dyes. *Brazilian Journal of Microbiology* 23, 14800-14900.
- Gutiérrez A, Rencoret J, Ibarra D, Molina S, Camarero S, Romero J, Del Rio J, Martinez A. 2007. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin phenols as natural mediators. *Environmental Science Technology* 41, 41254–44129.
- Hao O, Kim H, Chang P. 2000. Decolorization of wastewater. *Environmental Science and Technology* 30, 449–505.
- Heap L, Green A, Brown D, van Dongen B, Turner N .2014. Role of laccase as an enzymatic pretreatment method to improve lignocellulosic saccharification. *Catalysis Science and Technology* 4, 2251-2259.
- Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna M, Liers C, Lundell T. 2010. New and classic families of secreted fungal peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 871–897.

Capítulo 8. Referencias

- Holkar C, Jadhav A, Pinjari D, Mahamuni N, Pandit A. 2016. A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. *Journal of Environmental Managements* 182, 351-366.
- Hu M, Chao P, Zhang G, Xue Z, Q. 2008. Laccase-mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36, 45–51.
- Jeon J, Murugesan K, Kim J, Kim E, Chang Y. 2008. Synergistic effect of laccase mediators on pentachlorophenol removal by *Ganoderma lucidum* laccase. *Applied Microbiology Biotechnology* 81, 783–790.
- Jin X, Yu X, Zhu G, Zheng Z, Feng F, Zhang Z. 2016. Conditions optimizing and application of laccase-catalyzed pesticide degradation. *Scientific Reports* 6, 35787.
- Johannes C, Majcherczyk A, Hüttermann A. 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied Environmental Microbiology* 66, 524–8.
- Kandelbauer A, Guebitz G. 2005. Bioremediation for the decolorization of textile dyes. *Environmental Chemistry* 26, 269-288.
- Kettle A, Bruce M, Clark B, Winterbourn C. 2004. Superoxide converts indigo carmine to 5-Isatinsulfonic acid sulfonic acid implications for the hypothesis that neutrophils produce ozone. *Journal of Biological Chemistry* 279, 18521-18525.
- Kokol V, Doliska A, Eichlerova I, Baldrian P, Nerud F. 2007. Decolorization of textile dyes by whole cultures of *Ischnoderma resinsum* and by purified laccase and Mn-peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1673-1677.
- Leonowicz S, Solecka M, Zylla R. 2001. Biodegradation, decolourisation and detoxification of textile wastewater enhanced by advanced oxidation processes. *Journal of Biotechnology* 89,175–184.
- Lew C, Yao B, Ji Y. 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in Energy Research* 12,121-135.

Capítulo 8. Referencias

- Li H, Xu B, Tang L, Zhang J, Mao Z. 2015. Reductive decolorization of indigo carmine with *Bacillus sp* MZ10. *International biodeterioration and Biodegradation* 103, 3037.
- Li K, Xu F, Eriksson K. 2001. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2654–2660.
- Loera O, Pérez M, Barbosa I, Ricardo J, Villaseñor F. 2006. Laccases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology* 3, 323-340.
- Madhavi V, Lele S. 2009. Laccase: Properties and applications. *Bioresource* 4, 23-25.
- Majcherczyk A, Novotny C, Kuees U. 2008. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresource Technology* 99,463-471.
- Majeau J, Brar S, Tyagu D. 2009. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants, *Bioresource Technology* 101, 2331-2350.
- Martorana A, Sorace L, Boer H, Vázquez-Duhalt R, Basosi R, Baratto M. 2013. A spectroscopic characterization of a phenolic natural mediator in the laccase biocatalytic reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 97, 203–208.
- Montoya S, Sánchez Ó, Levin L. 2014. Evaluation of endoglucanase, exoglucanase, laccase, and lignin peroxidase activities on Ten White-Rot Fungi. *Biotechnology in the Agricultural and Agroindustrial Sector* 12, 2 115-124.
- Moreira M, Palma C, Mielgo G, Feijoo J, Lema M. 2017. *In Vitro* degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by Manganese Peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering* 75, 3.
- Morozova O, Shumakovich G, Gorbacheva M, Shleev S, Yaropolov A. 2007. Blue Laccases. *Biochemistry* 72 (11), 1136-1150.
- Moya-Lobo R. 2011. Caracterización de la lacasa de *Streptomyces Cyaneus* Cect 3335 y aproximación al estudio de su potencial oxidativo y función biológica. Tesis de Doctorado. Universidad de Alcalá, Departamento de Microbiología y Parasitología, 184 p.

- Muñoz E, Insuasti J, Trujillo S, Del Río C, Soto C, Puente M. 2016. Technology for denim finishing using laccase enzymes. *Journal of Polymer and Textile Engineering* 3, 2348-0181.
- Najafi H y Movahed H. 2009. Improvement of COD and TOC reactive dyes in textile wastewater by coagulation chemical material. *African Journal of Biotechnology* 8, 3053-3059.
- Nigam P, Banat I, Singh D, Marchant R. 1996. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process Biochemistry* 31, 435–42.
- Palonen H.2004. Role of Lignin in the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose. *Technical Research Centre of Finland* 520, 1455-0849.
- Pardo I, Camarero S .2015. Exploring the oxidation of lignin derived phenols by a library of laccase mutants. *Molecules* 20, 15929–15943.
- Peyratout C, Severens J, Holm S .1994. EPR studies of ligand binding to the type 2/type3 cluster in tree laccase. *Biochemistry and in Biophysics* 314, 405-411.
- Pickard M, Román R, Tinoco R, Vázquez-Duhalt R. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism m by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3805-3809.
- Piña S.2007. Decoloración biológica del colorante azul directo 2 en un filtro anaerobio/aerobio. Tesis Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, 98 p.
- Piontek K, Antorini M, Choinowski T.2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry* 277(40), 37663.
- Piscitelli A, Giardina P, Lettera V, Pezzella C, Sannia G, Faraco V. 2011 Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics* 12, 104–112.
- Prasad N, Vindal V, Narayana S, Kunal S.2011. In silico analysis of *Pycnoporus cinnabarinus* laccase active site with toxic industrial dyes. *Journal of Molecular Modeling*, 1–7.

Capítulo 8. Referencias

- Quintero C. 2006. Pesticides Degradation by White Rot Fungi. National Faculty of Agronomy 64, 5867-5882.
- Robinson T, Chandran B, Nigam P. 2001. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. Enzyme and Microbial Technology 29,575–579.
- Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresource Technology 3,247-255.
- Rosado T, Bernardo P, Koci K, Coello A, Robalo M, Martinez L. 2012. Methyl syringe: an efficient phenolic mediator for bacterial and fungal laccases. Bioresource Technology 12, 371–378.
- Sathiya S, Aravindan A, Noorul H. 2007. Effect of friction welding parameters on mechanical and metallurgical properties of ferritic stainless steel. The International Journal of Advanced Manufacturing Technology 31, 1076-1082.
- Singleton V, Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and VI culture 16, 144-158.
- Solomon E, Chen P, Metz M, Lee S, Palmer A. 2001. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. Angewandte Chemie International 40, 4570-4590.
- Srebotnik E, Hammel K. 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. Journal of Biotechnology 81(2-3), 179-88.
- Tapia-Tussell R, Pérez-Brito D, Rojas-Herrera R, Cortes-Velázquez A, Rivera Muñoz G, Solís-Pereira S. 2011. New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. African Journal of Biotechnology 10 (50), 10134-10142.
- Thurston F. 1994. The structure and function of fungal. Laccases. Microbiology 140, 19–26.
- Wang J, Lu L, Feng F. 2017. Improving the indigo carmine decolorization ability of a *Bacillus amyloliquefaciens* laccase by site-directed mutagenesis. Catalysts 7, 275.

Capítulo 8. Referencias

- Xu F, Kulys J, Duke K, Li K, Krikstopaitis K, Deussen H, Abbate E, Galinyte V, Schneider P. 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied Environmental Microbiology* 66, 2052-6.
- Xu P, Zhang X, Heaney S, Yoon A, Michelson G, Maas R .1999. Regulation of pax6 expression of conserved between mice and flies. *Development Microbiology* 126 (2), 383-395.
- Yaropolov A, Skorobogatko O, Vartanov S., Varfolomeyev S. 1994. Laccase properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 49, 257–280.
- Yetilmezsoy K, Ilhan F, Sapci-Zengin Z, Sakar S, Gonullu M.2009. Decolorization and COD reduction of UASB pretreated poultry manure wastewater by electrocoagulation process: a post-treatment study. *Journal of Hazardous Materials* 162, 120-132.
- Zapata-Castillo P, Villalonga-Santana M, Islas-Flores I, Rivera-Muñoz G, Ancona-Escalante W, Solís-Pereira S. 2015. Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolorization of indigo carmine. *Letters in Applied Microbiology* 61, 252-258.
- Zapata-Castillo P, Villalonga-Santana M, Tamayo-Cortés J, Rivera-Muñoz G, Solís-Pereira S. 2012. Purification and characterization of laccase from *Trametes hirsuta* Bm-2 and its contribution to dye and effluent decolorization. *African Journal of Biotechnology* 11(15), 3603–3611.
- Zeng S, Qin X, Xia L. 2017. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. *Biochemical Engineering Journal* 119, 92-100.

ANEXOS**A. Índice de abreviaturas**

ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)

ACC: Ácido p-cumárico

ACV: Ácido vainílico

AG: Ácido gálico

AV: Ácido violúrico

BT: Benzotriazol

B5: Black 5

CDL2: Compuesto derivado de la lingnia 2

CDL3: Compuesto derivado de la lingnia 3

CV: Cristal violeta

CG: Cromatografía de gases

Cm: centímetros

cm²: Centímetro cuadrado

Da: Dalton

DMF: 2,6 Dimetoxifenol

DQO: Demanda química de oxígeno

DBO: Demanda bioquímica de oxígeno

E₁₆₈: Extracto enzimático crudo de 168 horas

EF₀: Extracto fenólico de 0 horas

EF₂₄: Extracto fenólico de 24 horas

EF₄₈: Extracto fenólico de 48 horas

EF₇₂: Extracto fenólico crudo de 72 horas

E.C: Comisión de enzimas

G: Gramo

G: Guayacol

H: p-hidroxifenilo

HBT: 1-hidroxibenzotriazol

HBTr: 1-hidroxibenzotriazol reducido

HNNS: Ácido-2-nitroso-1-naftol-4-sulfónico

HPLC: cromatografía de líquidos de alto rendimiento

I.C: Índigo carmín

KDa: Kilodantons

L: Litro

LiP: Lignina peroxidasa

SLM: Sistema Lacasa/Mediador

Nm: Nanómetro

NMR: Resonancia magnética nuclear

mM: Milimolar

MnP: Manganeso peroxidasa

ml: Mililitro

mAU: Mili unidades de absorción

µl: Microlitro

NHA: N-hidroxiacetanilida

NPI: N-hidroxiftalimida

P: Peso

pH: Potencial de Hidrogeno

PR: Poly R-478

R.M: Remazol brillante

Rpm: Revoluciones por minuto

R.C: Rojo congo

S: Siringilo

SIR: Siringaldehido

TEMPO: 2,2', 6,6'tetrametilpiperidina-N-oxil

Ton: Toneladas

TR: Tiempo de retención

U: Unidades

UV: Ultra violeta

V.M: Verde malaquita

V: Volumen

VIO: Ácido violúrico

VP: Peroxidasa versátil

YMPG: Glucosa, peptona, extracto de malta y extracto de levadura

°C: Grado centígrado

B. Glosario

ABTS: compuesto químico utilizado para observar las cinéticas de reacción de determinadas enzimas.

Aniones: Un anión es un átomo con carga eléctrica negativa, es decir un ión negativo. En los aniones simples, esta carga negativa está dada por la afinidad del átomo neutro por los electrones.

Azo: grupo funcional del tipo $R-N=N-R'$, en donde R y R' son grupos que contienen átomos de carbono, y los átomos de nitrógeno están unidos por un enlace doble. Los compuestos que contienen el enlace $-N=N-$ se denominan compuestos azoicos.

Biorremediación: es el proceso que utiliza microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar a un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural.

Cromóforo: grupos funcionales de la molécula responsables de la absorción. Principalmente son: dobles y triples enlaces carbono-carbono, sistemas aromáticos, grupo carbonilo, $(C=N)$, diazo $(N=N)$.

Deslignificación: Eliminación total o parcial de la lignina de la madera u otra materia vegetal por tratamientos químicos o enzimáticos para la fabricación de pastas de celulosa químicas

DNA: un ácido desoxirribonucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria

Efluentes: descarga de aguas o vertidos empleados en los procesos industriales, urbanos, o agrícolas.

Fenoles: son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional.

Mineralización: La mineralización de materia orgánica es el proceso por el cual la materia orgánica se degrada a través de los microorganismos del suelo y se transforma en CO_2 , H_2O y los compuestos minerales básicos.

Anexos

pH: Coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.

Punto isoeléctrico: es el pH en el que un aminoácido o proteína se disocia por igual en su grupo amino o carboxilo.

RNA: ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster.

Xenobióticos: Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados y difíciles de degradar.

Mediador: Moléculas de bajo peso molecular que favorecen la acción de las lacasas en la oxidación de sustratos

C. Preparación de medios**C1. Medio YMPG**

Tabla C1. Composición del medio YMPG (1 L)

Glucosa	10 g
Extracto de malta	10 g
Peptona	2 g
Extracto de levadura	2 g
KH₂PO₄	2 g
MgSO₄*7H₂O	1 g
Tiamina HCl	1 mg

El pH se ajustó a 4.5 con solución de HCl concentrada. Los medios se esterilizaron a 121°C por 15 min.

C2. ABTS 5 mM (10 ml)

Preparación:

1. Se pesa 0.0274 g de ABTS y se diluye en un 1 ml de agua destilada en un vaso de precipitado.
2. Se afora a 10 ml con matraz aforado y se mantiene en envase ámbar.

C3. Solución Folin-Ciocalteu 1:9

Preparación:

1. Se toma 1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu y se transfiere a un matraz aforado.
2. Se afora a 10 ml y se coloca en un frasco ámbar.

C4. Na₂CO₃ al 7.5%

Para preparar esta solución se necesita:

- 1.875 g de Na₂CO₃
- 25 ml de agua destilada

Procedimiento:

1. Se coloca en un vaso de precipitado el Na₂CO₃ hasta diluir.
2. Ya diluido se afora hasta 25 ml y se coloca en frasco.

D. Sistemas de reacción para cuantificar lacasas y fenoles

D1. Actividad de lacasa

Tabla D1. Mezcla de reacción para medir la actividad de lacasa

Mezcla de reacción	Concentración	Volumen (μ l)
Amortiguador de acetatos	1 M	100
Agua destilada		770
Extracto		30
ABTS	5 mM	100

Se incubó 5 min a 40 °C (sin ABTS), después se añadió 100 μ l de la solución ABTS 5 mM y se dejó incubar por 20 min a 40 °C. Se leyó absorbancia a 420 nm.

D2. Cuantificar fenoles

Tabla D2. Mezcla de reacción para cuantificar fenoles

Mezcla de reacción	Volumen (μ l)
Agua destilada	1460
Extracto	60
Folin-Ciocalteu	100
Na ₂ CO ₃	300

En un tubo de ensayo se añadió 1460 μ l de agua destilada y 100 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reaccionar 5 min. Luego se agregó 300 μ l de solución de carbonato de sodio al 7.5 % y se dejó reposar a 30 min a 40°C en la oscuridad. Se leyó la absorbancia a 765 nm.

D3. Curva estándar de fenoles

A partir de una solución stock de ácido gálico 1 mg/ml se adicionaron en tubos de ensayo los siguientes volúmenes de reacción por duplicado.

Tabla D3. Volúmenes de reacción de ácido gálico

mg/ml	Solución stock (µl)	Agua destilada (µl)
0	0	1000
0.05	50	950
0.10	100	900
0.15	150	850
0.20	200	800
0.25	250	750
0.30	300	700
0.35	350	650
0.40	400	600
0.45	450	550
0.50	500	500

Se agregó 1.5 ml de agua destilada y 100 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu y se esperaron 5 min, luego se le agregó 300 µl de solución de carbonato de sodio al 7.5 % y se dejó reposar a 30 min a 40°C en la oscuridad.

Se calibró el espectrofotómetro con un blanco (sin ácido gálico) a 765nm y se leyó la absorbancia para cada ensayo. A partir de las absorbancias promedio se construye una curva de calibración.

E. Cromatogramas HPLC

E1. Cromatogramas de compuestos fenólicos

La identificación de fenoles se realizó usando la técnica de HPLC en gradiente en una cromatografía de fase reversa. En la Figura 1, se muestra el cromatograma de los estándares fenólicos y sus tiempos de retención: ácido siríngico (18.93 min), ácido vainílico (19.20 min), alcohol veratrílico (20.33 min), 4-hidroxibenzaldehido (21.52 min), ácido p-cumárico (22.40 min), siringaldehido (22.68 min), guayacol (25.27 min)*

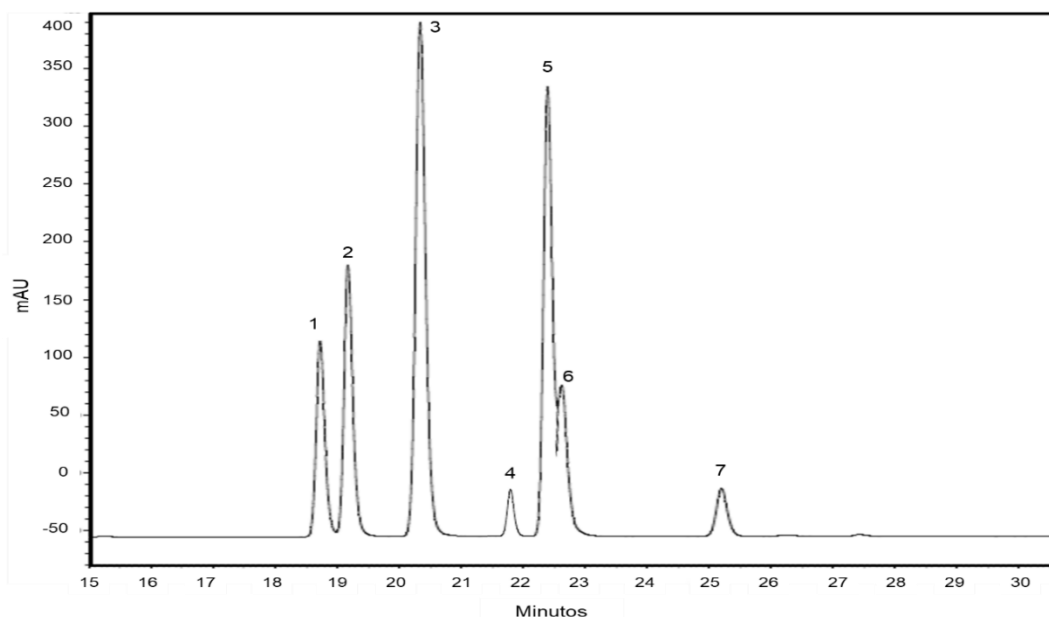


Figura E1. Cromatografía HPLC de estándares a 280 nm, 1.Ácido siríngico, 2. Ácido vainílico, 3. Alcohol veratrílico, 4. 4-hidroxibenzaldehido, 5. Ácido p-cumárico, 6. Siringaldehido, 7.guayacol.

A partir de las áreas de los picos de elución de cada compuesto se promedió y construyó una curva de calibración.

E2. Curva de Calibración de fenoles

Se realizó una curva de calibración para cada uno de los compuestos estándar, para lo cual se utilizaron 3 diferentes concentraciones (10, 20 100 mM) por triplicado. La cuantificación de estándares se llevó a cabo por HPLC-1220 Infinity.

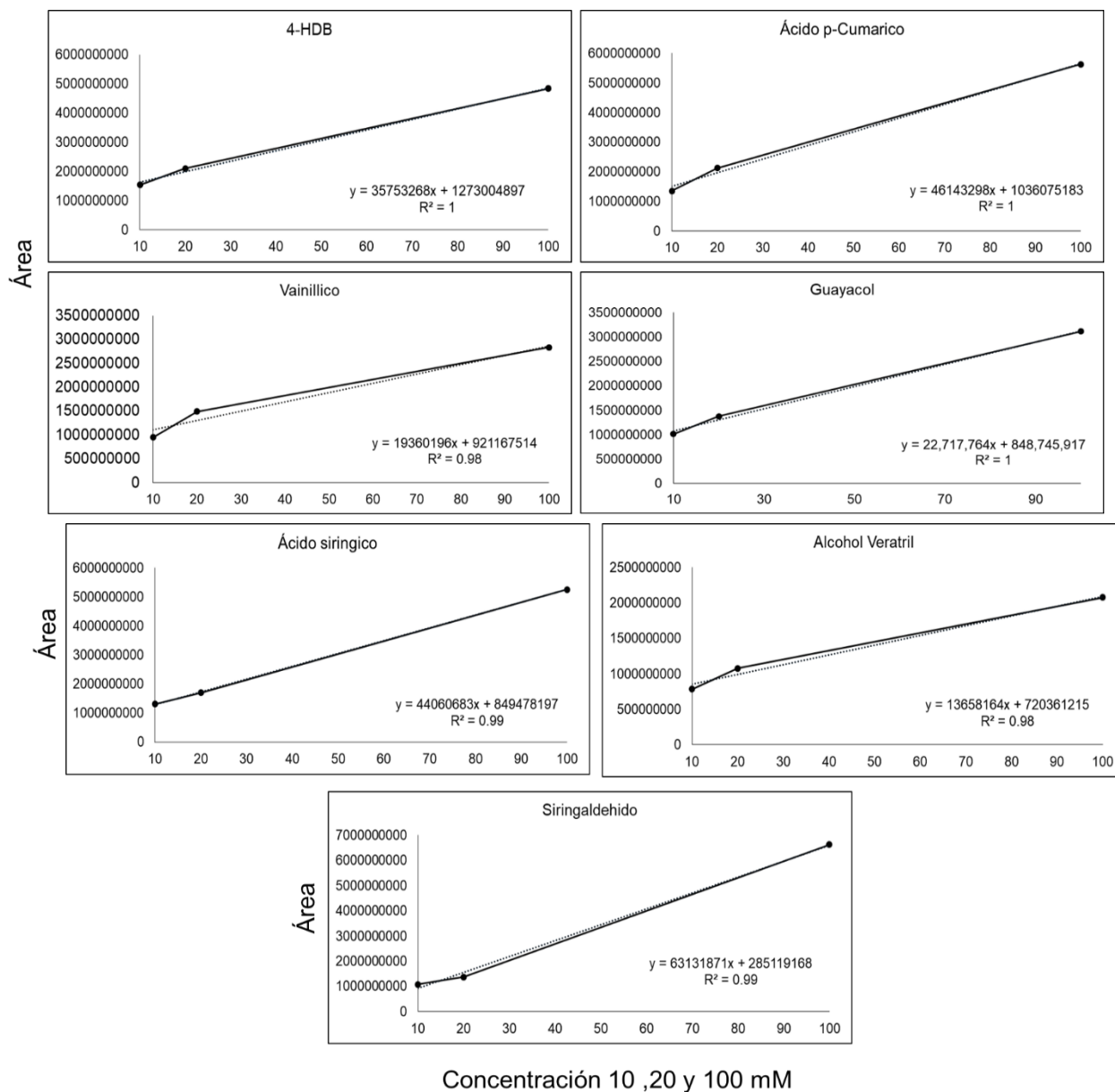


Figura E2. Curvas de calibración de 4-HDB, ácido p-cumárico, ácido vainillico y guayacol, ácido siríngico, alcohol veratrílico y siringaldehido.

F. Cromatogramas de la cromatografía de gases masas

El contenido y composición de los compuestos derivados de la lignina CDL2 y CDL3, se analizó por cromatografía de gases masa.

Cada muestra se aisló por separado mediante extracción con 2 sistemas de solventes. El primero fue una mezcla Acetona-Cloroformo 1:1 (v/v) y el segundo fue Acetato de etilo.

El sistema acetona-cloroformo: Procedimiento: 2 mL de la muestras se extrajeron con la mezcla de solventes en proporción 1:1 (2 veces). Los solventes orgánicos se evaporaron y el extracto se pesó. El extracto de CDL-2 pesó 6.8 mg. El extracto de CDL-3 pesó 7.1 mg. Las muestras se diluyeron con 1 ml de cloroformo y se inyectaron en el cromatógrafo.

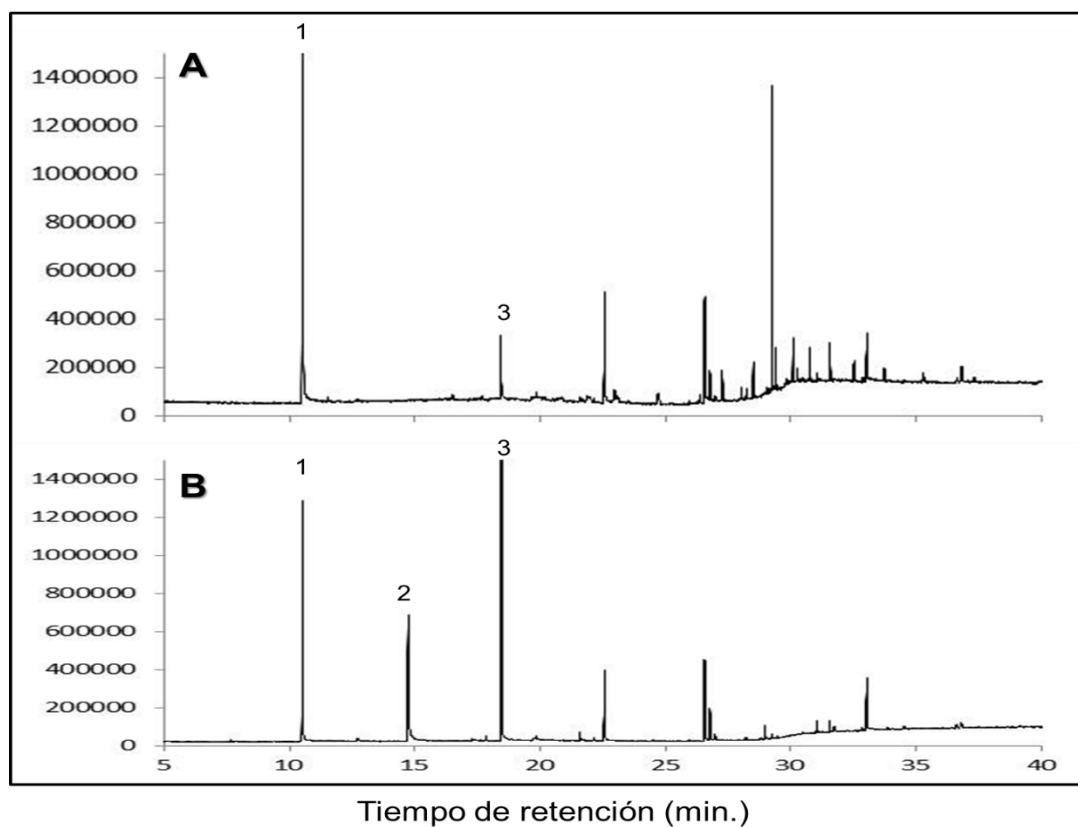


Figura F1. Cromatografía por gases masa, **1.**Guayacol, **2.**4-Hidroxibenzaldehido, **3.** Siringaldehido.

Anexos

Se analizaron por GC / MS usando un HP Sistema G1800A GCD con una columna DB-5 (30 m x 0.25 mm de diámetro interno, y 0.25 µm de espesor de película), que fue programado de 50 °C a 100 °C a 30 °C / min y de 100 °C a 300 °C a 5 °C / min. La temperatura final se mantuvo durante 20 min. Los compuestos fueron identificados por fragmentación y al comparar sus espectros con los disponibles en la biblioteca Wiley y NIST.

Pico	Tiempo de retención (min)	Compuesto	Área del pico (% del total del área)
1	10.5	Guayacol	53.9 en CDL2 y 17.4 en CDL3
2	14.7	4-hidroxi benzaldehído	14.3 en CDL3
3	18.4	Siringaldehido	3 en CDL2 y 34.3 en CDL3

G. Cromatogramas de la biotransformación del índigo carmín

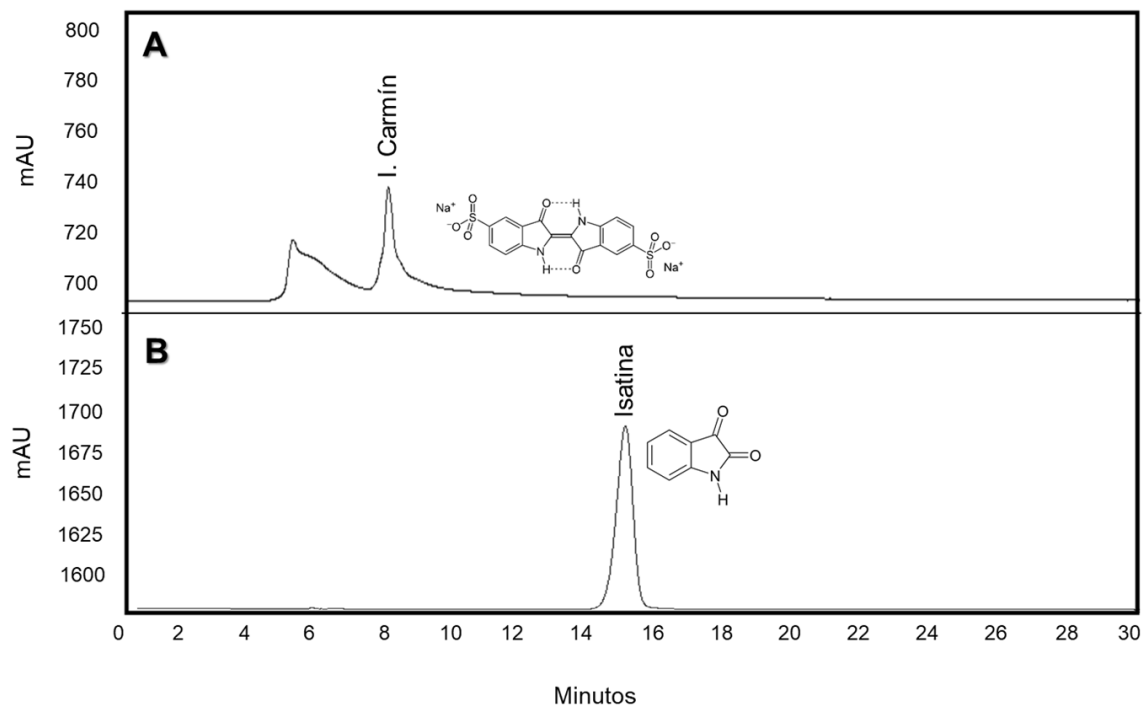


Figura G1. Cromatograma por HPLC de los estándares de Indigo Carmín (A) e Isatina (B) Medido a 403- 600 nm.

G1. Curva de calibración de Isatina

Se realizó la curva de calibración, para lo cual se inyectaron 6 concentraciones de la mezcla de Isatina (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 5.0 mM), cada una por triplicado. La cuantificación de estándares se llevó a cabo por HPLC-1220 Infinity.

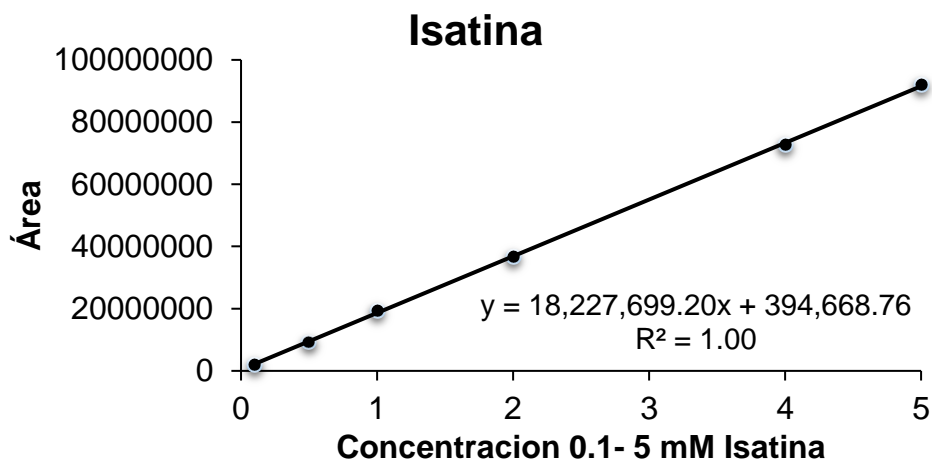


Figura G2. Curva de calibración Isatina.

Para el caso de la curva del índigo carmín se procedió a realizar la curva de calibración, para lo cual se inyectaron 6 concentraciones de la mezcla de Isatina (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 5.0 mM), cada una por triplicado. La cuantificación de estándares se llevó a cabo por HPLC-1220 Infinity.

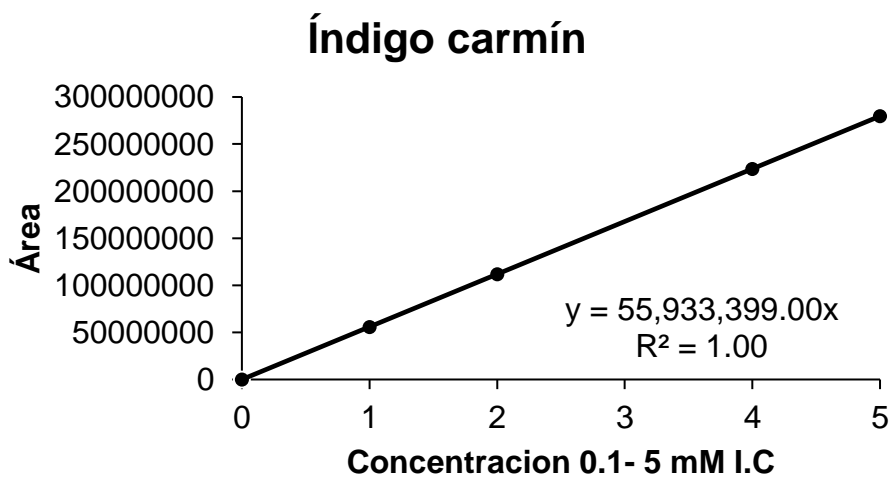


Figura G3. Curva de calibración índigo carmín.

H. Compuestos y reactivos

Tabla 9.5. Compuestos y reactivos utilizados

Tintes	No. C.A.S	Casa Comercial
Cristal violeta	548-62-9	Sigma Aldrich
Índigo carmín	860-22-0	Sigma Aldrich
Poly R-478	68550-77-6	Sigma Aldrich
Reactivo black 5	17095-24-8	Sigma Aldrich
Remazol brillante	2580-78-1	Sigma Aldrich
Rojo congo	573-58-0	Sigma Aldrich
Verde malaquita	2437-29-8	Sigma Aldrich
Mediadores Grado Reactivo	No. C.A.S	Casa Comercial
2,2'-Azino-bis-(3-etil-benzotiazolin -6-sulfonato) (ABTS)	30931-67-0	Sigma Aldrich
4- Hidroxibenzaldehido	123-08-0	Sigma Aldrich
Ácido p-Cumárico	501-98-4	Sigma Aldrich
Ácido siríngico	530-57-4	Sigma Aldrich
Ácido vainillico	121-34-6	Sigma Aldrich
Alcohol Veratril	93-03-8	Sigma Aldrich
Guayacol	818339	Merck Millipore
Siringaldehído	134-96-3	Sigma Aldrich
1-Hidroxibenzotriazol (HBT)	123333-53-9	Sigma Aldrich
2,6-Dimetoxifenol (DMP)	91-10-1	Sigma Aldrich
Reactivos	No. C.A.S	Casa Comercial
Acetato de Sodio	127-09-3	J.T.Baker
Acetonitrilo grado HPLC	75-05-8	J.T.Baker
Ácido acético	64-19-7	J.T.Baker
Ácido clorhídrico	7647-01-0	J.T.Baker
Acido fórmico	64-18-6	J.T.Baker
Ácido fosfórico	7664-38-2	High Purity
Ácido gálico	149-91-7	Sigma Aldrich

Anexos

Agua grado HPLC	7732-18-5	J.T.Baker
BSA (Bovine Serum Albumin)	90604-29-8	Merck
Carbonato de sodio	497-19-8	J.T.Baker
Coomassie brillant blue G250	42655	Merck
Etanol	64-17-5	Sigma Aldrich
Fosfato de potasio dibasico	04/11/7758	J.T.Baker
Fosfato de potasio monobásico	7778-77-0	J.T.Baker
Isatina	91-56-5	Sigma Aldrich
Metanol grado HPLC	67-56-1	J.T.Baker
Reactivo de Folin	UN 3264	Merck
Sulfato de magnesio Heptahidratado	10034-99-8	J.T.Baker

Componentes de medios de cultivo	No. C.A.S	Casa Comercial
Agar bacteriológico	JMX901100	Millipore
Dextrosa	01/10/5996	J.T.Baker
Extracto de levadura	903	MCD LAB
Extracto de malta	LP0039	OXOID
Peptona bacteriológica	922	MCD LAB
Tiamina	67-03-8	Sigma
