

APLICACIÓN DE LACASAS PRODUCIDAS POR HONGOS PARA DEGRADACIÓN DE COLORANTES MICROBIOLÓGICOS (HEMATOXILINA Y AZUL DE METILENO)

Alejandra de Jesús Acevedo Barajas (1), Dra. Rosa María. García (2), Dra. Claudia Erika Morales Hernández (3)

1 [Escuela de Nivel Medio Superior de Guanajuato, Colegio de Nivel Medio Superior, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [ale-2305@hotmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [nietor@ugto.mx]

3 [Escuela de Nivel Medio Superior de Guanajuato, Colegio de Nivel Medio Superior, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [clauerimh7@gmail.com]

Resumen

Las lacasas son fenol oxidasas producidas de modo especialmente eficiente por los hongos de la podredumbre blanca, que son del grupo basidiomicetos. El carácter extracelular e inespecífico de estas enzimas permite que degraden la lignina, un importante biopolímero que forma parte de la pared celular el cual los hongos usan como fuente de energía para su crecimiento. Las lacasas tienen múltiples usos en la industria textil, papelera, alimenticia, farmacéutica y médica. En años recientes se ha estudiado su uso en biosensores y biorremediación de pesticidas, insecticidas y tinturas, aprovechando su capacidad para degradar una amplia variedad de compuestos similares a la lignina tanto fenólicos como no fenólicos. Este trabajo se enfocó en el crecimiento de cepas de hongos de podredumbre blanca en presencia de All-Bran® y el efecto de sus enzimas en colorantes orgánicos para su futura implementación como mecanismos de biorremediación aprovechando ambas condiciones. Los resultados fueron favorables para las dos condiciones, las cepas crecieron en el medio comercial y degradaron los colorantes, siendo destacable el rápido y consistente efecto que las lacasas fúngicas tuvieron sobre el azul de metileno, colorante orgánico no fenólico.

Abstract

Laccases are phenol oxidases produced with an especial efficiency by white rot fungi, which belong to the Basidiomycetes group. The extracellular and nonspecific nature of these enzymes enables them to degrade lignin, which is an important biopolymer. It is a part of the cell wall which fungi use as an energy source for growth. Laccases are used in the textile, pharmaceutical, medical, alimentary and paper industry. In recent years, there has been research around their use in biosensors and bioremediation of pesticides, insecticides and dyes, taking advantage of laccases' ability to degrade a wide range of both phenolic and non-phenolic compounds similar to lignin. This work focused on the growth of strains of white rot fungi in presence of All-Bran® and the effect of their enzymes on organic dyes for further implementation as bioremediation mechanisms leveraging both conditions. Results were favorable for the two conditions: tested strains grew in commercial culture medium and degraded dyes. The fast and consistent effect of fungal laccases over methylene blue, non-phenolic organic dye, was remarkable.

Palabras Clave

Degradación enzimática 1; Mico-remediación 2; Ligninolítico 3; Grupo fenólico 4.

INTRODUCCIÓN

La mico-remediación es una alternativa sustentable la que se utilizan hongos para degradar sustancias contaminantes del ambiente aprovechando las enzimas que estos secretan. En ciertos hongos, éstas digieren lignina y celulosa, además de otros compuestos similares estructuralmente [1].

Lignina

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular brindando rigidez en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono. La composición o distribución de sus unidades estructurales varía dependiendo del origen y método de extracción o aislamiento, por lo tanto es químicamente heterogéneo y amorfo, además de ópticamente inactivo y altamente ramificado. Este compuesto contiene alrededor de 10-20% de grupos hidroxilo fenólicos que le confieren rigidez a la pared celular de las plantas y además las protege del ataque de organismos patógenos [2,3].

Hongos ligninolíticos

Los hongos ligninolíticos pertenecen en su mayoría al grupo *Basidiomycetes* y son los microorganismos más eficientes en degradar la lignina, lo cual implica mineralizarla, es decir, transformarla hasta moléculas más simples y menos tóxicas como CO₂ y H₂O [3,4]. Este grupo de hongos se incluye en los de la podredumbre blanca de la madera, y producen enzimas como lignina-peroxidasas, manganeso-peroxidasas y lacasas. El sistema de degradación extracelular de estas enzimas es comprensible dado el alto peso molecular de la lignina (entre 600 y 1000 kDa), que le impide ser degradada intracelularmente. Este tipo de sistema permite además que los hongos toleren altas concentraciones de contaminantes, mientras que el crecimiento del hongo por extensión de hifa da la posibilidad de alcanzar contaminantes en el suelo de maneras imposibles para otros organismos. Las enzimas ligninolíticas son muy inespecíficas, así que son capaces de mineralizar un amplio rango de contaminantes orgánicos recalcitrantes o resistentes similares

parecidos en estructura a la lignina [1], cuya degradación selectiva posiblemente le consigue a los hongos acceso a la celulosa y hemicelulosa, las cuales finalmente representan su fuente de carbono y energía [3].

Lacasas

Los fenol-oxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de un amplio espectro de compuestos aromáticos utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua. Una de estas enzimas es la lacasa, que fue descubierta en el árbol japonés de la laca: *Rhus vernicifera*. Esta pertenece a las oxidasas multicobre azules y participa en enlace de monómeros, degradación de polímeros y división de anillos aromáticos. Se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos, algunas bacterias e insectos. Todas las lacasas son glicoproteínas extracelulares mayormente monoméricas, diméricas y tetraméricas; cuyos pesos moleculares varían entre 60 y 80 kDa, de los cuales entre 15 y 20% está dado por carbohidratos.

La lacasa cataliza la remoción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromático, para formar radicales libres fenoxilo y radicales amino, respectivamente; también descarboxila y ataca grupos metoxilo mediante la desmetilación o desmetoxilación. Estas reacciones pueden representar un paso importante en la transformación inicial de la lignina. La catálisis mediada por lacasa puede ser extendida a sustratos no fenólicos por la inserción de mediadores, los cuales son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que son oxidados por la lacasa.

La **lacasa fúngica** (bencendiol:oxígeno oxidorreductasa, E.C. 1.10.3.2) es una enzima extracelular producida por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos, cuyos productores más eficientes son los hongos de la podredumbre blanca. Estas enzimas son secretadas en el medio extracelular durante el metabolismo secundario y en su producción se involucra la influencia de varios factores como el tipo de cultivo (sólido o líquido), limitación de carbono, fuente de nitrógeno, agitación, temperatura y pH (ambos afectan de manera

limitada) e inductores tales como compuestos aromáticos.

Las aplicaciones de las lacasas son diversas: procesos de decoloración, degradación de pesticidas e insecticidas, síntesis orgánica, como biosensor de compuestos fenólicos, oxígeno y azida, en la industria alimenticia se emplean para la eliminación de compuestos fenólicos indeseados en la cocción, procesamiento de jugos, estabilización del vino, incremento en la duración de la cerveza y biorremediación de aguas residuales. Asimismo, la separación y degradación de lignina es requerida para la preparación del papel a nivel industrial. Otros usos incluyen combatir el hedor en sitios de eliminación de desechos, granjas de ganado y moladoras de pulpa. Por último, las lacasas se utilizan para degradar tintes sintéticos, los cuales son muy resistentes ante la luz, el agua y otros químicos debido a su estructura. Se ha demostrado que estas enzimas minimizan y en ciertos casos eliminan la toxicidad de ciertos colorantes, por lo que se han utilizado en tintes de cabello. [3,5].

Colorantes

Las lacasas pueden oxidar compuestos relacionados con la lignina tanto fenólicos como no fenólicos [1]. Se estudiaron sus efectos en un colorante de cada tipo para compararlos.

• Hematoxilina

La hematoxilina es un colorante natural que se extrae del duramen del árbol *Haematoxylum campechianum* (palo de Campeche o palo de tinte). Su número de constitución es 75290 y su nombre genérico es negro natural 1. Ioniza como ácido, su solubilidad en agua es 3% al igual que en etanol. Su color es amarillo/café, tiene una masa molecular de 302.3 g/mol y su fórmula empírica es $C_{16}H_{14}O_6$. Como se observa en la Figura 1 es un compuesto aromático que contiene grupos fenólicos, lo cual favorece su degradación por lacasas.

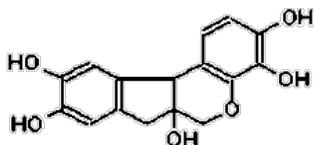


FIGURA 1: Estructura química de la hematoxilina

Es práctica común utilizar hematoxilina en tinciones clínicas. Durante la preparación de soluciones de tinción la hematoxilina se convierte en hemateína. Esto es generalmente logrado con agentes oxidantes químicos, pero a veces se lleva a cabo por el oxígeno atmosférico con el paso del tiempo. La hemateína por sí sola es raramente usada en soluciones de tinción ya que continúa oxidándose y forma productos de pobre o nula tinción.

El colorante es generalmente usado con un agente cáustico, siendo los más comunes aluminio (como alumbre de amonio o alumbre de potasio) y hierro (en forma de cloruro o alumbre férrico). Es ampliamente usado en histología médica (exposición de fibrina, estrías musculares y algunas fibras de células gliales o neuroglia) y en citología (demostración de la cromatina nuclear) [6].

• Azul de metileno

Este colorante tiene forma de cristales o polvo cristalino, presenta un color verde oscuro, con brillo bronceado. Su nombre químico es 3,7 -bis (dimetilamino)-, cloruro de fenazationio o de tetrametilitionina; su fórmula química es $C_{16}H_{18}N_3ClS$ y tiene una masa molecular de 319.85 g/mol. La Figura 2 muestra el arreglo químico de este compuesto orgánico no fenólico. Sus disoluciones en agua o en alcohol son de color azul profundo. Es fácilmente soluble en el agua y en cloroformo; también es moderadamente soluble en alcohol. Este colorante se utiliza en los laboratorios de análisis ambiental para la determinación de sustancias activas al azul de metileno (SAAM) como los detergentes, prueba rutinaria en esta clase de laboratorios. También se utiliza como materia prima para fabricar agentes antipalúdicos y es empleado para el teñido directo, para embellecer tintes amortiguados como el azul de alizarina, el índigo y la hematoxilina. Además se emplea en el estampado y tinte de la seda algodón [7].

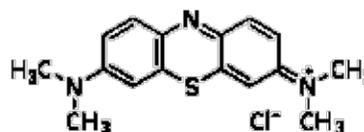


FIGURA 2: Estructura química del azul de metileno

En el presente trabajo se probó el crecimiento de hongos ligninolíticos en medios con cereal comercial All-Bran® como fuente de lignina, cuyo

uso ha sido estudiado en el pasado con resultados favorables [4,8]. Además se llevaron a cabo pruebas en torno a la producción y actividad de lacasas extracelulares, y se experimentó con el efecto de estas en dos colorantes microbiológicos; para determinar las condiciones óptimas para producción de lacasas, proporcionando información útil para el desarrollo e implementación de mecanismos de mico-remediación, aminorando el impacto ecológico de descarga indiscriminada de colorantes usados en industrias y laboratorios.

MATERIALES Y MÉTODOS

• Muestras

Se utilizaron 4 cepas oriundas de la región de Guanajuato, que se muestran en la Figura 3: H2DP recolectada en la sierra de Santa Rosa, CI proveniente del efluente de una industria de León, MD o muestra desconocida y TC recogida de un tronco caído hallado en la cuenca de la presa La Esperanza.



FIGURA 3: Cepas utilizadas
a) H2DP, b) CI, c) MD y d) TC.

• Condiciones de cultivo

Dados los resultados positivos de crecimiento demostrados en trabajos previos y posterior a una prueba con guayacol como indicador de actividad enzimática, se seleccionó la cepa aislada H2DP para ser sembrada en medio dextrosa Sabouraud y se mantuvo en incubación a 28°C. Se sembró en cajas de Petri bajo condiciones de esterilidad. Para la siembra en medios líquidos se preparó una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M con un pH=6 de la cual se agregaron 37.5 mL a cada matraz y 38 mL de agua destilada, además de All-Bran® pulverizado al 4%; a cada matraz se le agregaron 4 cuadros de aprox. 0.25 cm² del medio sólido de una de las 4 cepas exceptuando al blanco; luego se resembró la cepa con más

crecimiento (H2DP) en dos matraces diferentes (H2DP₁ y H2DP₂) y se adicionó un blanco. Con regularidad se tomaron muestras de 1 mL de los medios líquidos, se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. Y se congelaron los sobrenadantes para posterior análisis. Adicionalmente se realizó una observación de la morfología de la cepa H2DP teñida de azul de algodón en microscopio de campo claro a distintos objetivos.

• Pruebas cualitativas y cuantitativas

La actividad enzimática extracelular de lacasas se analizó empleando guayacol. En los medios sólidos se aplicó una gota al 100% y otra al 10% mientras que en placa de ELISA por duplicado se colocaron 100µL de sobrenadante de las muestras en líquido, 1µL de H₂O₂ y 10 µL de guayacol; todas las muestras se mantuvieron en la incubadora a 28°C durante 24 hrs. Se cuantificó proteína por el método Micro-Lowry: utilizando los valores obtenidos de la curva de calibración con albúmina sérica de bovino (BSA). Además, se realizó la separación de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes de muestras de H2DP. Las muestras se corrieron a 100V durante 1 hora junto con marcadores de peso molecular. Finalmente los geles se tiñeron con plata [8]. Asimismo, se probó la acción de las lacasas producidas por la cepa H2DP sobre hematoxilina (He) y azul de metileno (Az) incubando 500 µL de muestra centrifugada a 1500 y 14000 rpm, a la cual se adicionaron 5 µL de colorante en tubos Kant; a los matraces con cepas con menor tiempo de crecimiento se les agregaron 100 µL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó esporulación en las muestras de H2DP en medios sólidos a las 96 horas de incubación (día 4) de manera difusa, luego de 10 días cubría casi la totalidad de la superficie de la placa. Las que tuvieron mayor crecimiento fueron resembradas por espatulado, lo que se observa en la Figura 4. El aspecto que presentaron fue algodonoso, parecido a una pelusa blanca hasta que se dio la esporulación como una capa casi homogénea de color verde oscuro; al microscopio se ven como esferas regulares que se encuentran tanto separadas como unidas entre sí.

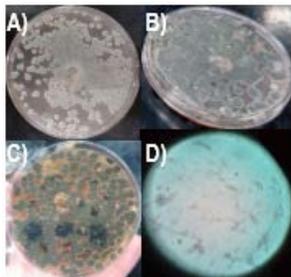


FIGURA 4: Crecimiento, desarrollo y morfología de la cepa H2DP. Tiempo de incubación: A) 8 días, B) 12 días, C) 31 días, D) ídem, vista con objetivo 100x.

En las dos muestras resembradas de H2DP en medio líquido el crecimiento empezó como una nata opaca en la superficie que fue adquiriendo un tono blanco hasta engrosar y extenderse.

La prueba cualitativa con guayacol de la actividad enzimática extracelular efectuada en sobrenadantes se observa en la Figura 5. La coloración original de las muestras era amarillo ámbar, después de la incubación las cepas con cambios fueron H2DP, MD (17 días) y H2DP₂ (10 días); el color cambió hacia el café en H2DP y a un tono rosáceo en MD.

En las muestras en medios sólidos. También hubo cambios de coloración hacia un rosa pardo, lo cual hizo evidente actividad de enzimas.

En la electroforesis los carriles de las muestras de H2DP₁ y H2DP₂ mostraron pesos moleculares prácticamente idénticos; como se advierte en la Figura 6, algunos de estos entran en el rango de los PM de las lacasas. También se observó que fueron más fuertes las bandas de las muestras con un día más de incubación en contacto con All-Bran®.

En cuanto al efecto de las cepas sobre colorantes, a pesar de no contener grupos fenólicos el azul de metileno (Az) fue degradado casi por completo en la muestra en líquido y disminuyó de manera notable en los tubos luego de incubación por 24 hrs. La hematoxilina (He) sufrió cambios apenas perceptibles en la superficie que tiñó en el matraz y en la tonalidad de los tubos, como se ve en la Figura 7.

CONCLUSIONES

El crecimiento del hongo fue favorable utilizando el cereal comercial, presentándose ciertas variaciones entre algunas muestras.



FIGURA 5: Muestras con guayacol. Incubación a 0 hrs. (izquierda) y 24 hrs. (derecha). A) Blanco, B) H2DP, C) Cl, D) MD, E) TC, F) Blanco₂, G) H2DP₁, H) H2DP₂.

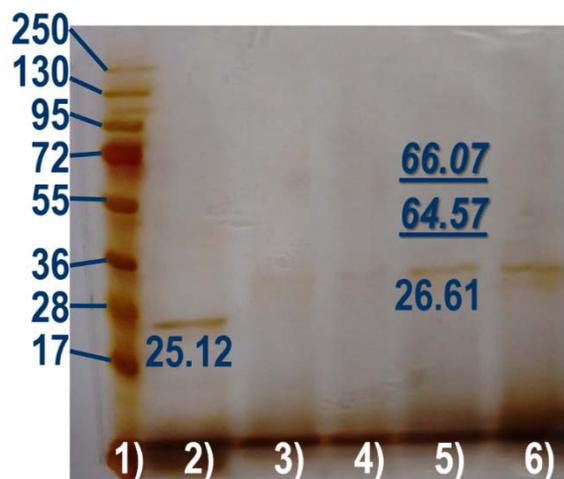


FIGURA 6: Gel de electroforesis. 1) Marcadores de peso molecular, 2) H2DP 1/jul, 3) H2DP₁-1/jul, 4) H2DP₂-1/jul, 5) H2DP₁-2/jul, 6) H2DP₂-2/jul. PM destacados se indican en kDa.

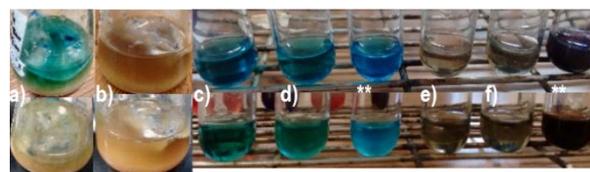


FIGURA 7: Incubación a 0 hrs (arriba) y 24 hrs (abajo). a) H2DP₁ Az, b) H2DP₂ (He); c) H2DP₁-1/jul, d) H2DP₂-1/jul, **H2DP en garbanzo (Az); e) H2DP₁-2/jul, f) H2DP₂-2/jul, ** (He).

La actividad enzimática se evidenció en las muestras tanto de medios sólidos como líquidos. Varios de los pesos moleculares de las proteínas que produjeron las cepas entran en el rango de los reportados para lacasas.

Se observó una degradación bastante notoria en el colorante no fenólico y más sutil en el fenólico, dejando el campo abierto para usarse en micoremediación.

REFERENCIAS

[1] Hansen, J. (2012). Mycoremediation. 1-2, 4-5. Recuperado de <http://rydberg.biology.colostate.edu/phytoremediation/2012/Mycoremediation%20by%20James%20Hansen.pdf>

[2] Chávez-Sifontes, M. & Domine, M.E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. Avances en Ciencias e Ingeniería - ISSN: 0718-8706 Av. cien. ing.: 4(4), pp. 16-17. Recuperado de http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/2013/Vol4/Nro4/3-ACI1184-13-full.pdf

[3] Dávila, G. & Vázquez-Duhalt, R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje Bioquímico, Vol XXX. (ISSN-0188-137X), pp. 30-32, 39-40. Recuperado de http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq06v30p29_55_Rafael_Vazquez.pdf

[4] Torres Navarro, V. H. (2014). Utilización de las lacasas secretadas por hongos para la degradación de colorantes. (Tesis de licenciatura inédita). Departamento de Biología. Universidad de Guanajuato.

[5] Shraddha, J., Shekher, R., Sehgal S., Kamthania, M. & Kumar, A. (2011) Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. Enzyme Research. Volumen (2011), pp. 1-6.

[6] Llewellyn, B. D. (2013). Hematoxylin Formulae. StainsFile, pp. 4. Recuperado de <http://stainsfile.info/StainsFile/downloads/hxformulas.pdf>

[7] Bautista Suárez, L. (2011). Degradación de colorantes (azul de metileno) por métodos electroquímicos. (Tesis de licenciatura inédita). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana.

[8] Sánchez Paz, J. (2012). Estudio de lacasas provenientes de hongos degradadores de madera para eliminación de contaminantes de lixiviado del relleno sanitario de León, Gto. (Tesis de licenciatura inédita). Departamento de Biología. Universidad de Guanajuato.