

00551
S
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

IDENTIFICACION DE UN SISTEMA ENZIMATICO FUNGICO
PARA LA DECOLORACION DE
COLORANTES DE USO TEXTIL.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA

ELIZABETH DEL CARMEN RODRIGUEZ AMARO

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL VAZQUEZ DUHALT

CUERNAVACA, Morelos

268600

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA.**

**IDENTIFICACION DE UN SISTEMA ENZIMATICO FUNGICO
PARA LA DECOLORACION DE
COLORANTES DE USO TEXTIL.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

PRESENTA

ELIZABETH DEL CARMEN RODRIGUEZ AMARO

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL VAZQUEZ DUHALT

Este trabajo está dedicado a mis padres: Carmen Amaro y Aarón Rodríguez, a quienes con nada podré agradecer el infinito amor que a lo largo de mi vida me han brindado, y el apoyo siempre incondicional para la realización de mis proyectos.

Con todo mi amor a Rafael Díaz Méndez, por haber participado física y emocionalmente en la realización de mi trabajo, por permitirme compartir parte de su vida y por formar una parte muy importante de mi vida.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Rafael Vazquez Duhalt por su atención y conocimientos brindados, por su confianza y su sincera amistad.

Al Dr. Michael Pickard por sus aportaciones para la realización de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio por su apoyo y calidez: Marcela, Maribel, Vanessa, Verónica, Antonio, Humberto y Raunel.

A Rosa Román por su invaluable desempeño técnico y por ser una excelente amiga y compañera.

Un agradecimiento especial a Eduardo Torres por el cariño, la comprensión y el apoyo incondicional que siempre me brindó.

A los miembros del Comité Tutorial: Dra. Gloria Soberón, Dr. Agustín López y Dr. Rafael Vazquez por sus observaciones y ayuda proporcionadas para la realización de este proyecto.

A los miembros del Jurado:

Dra. Refugio Rodríguez Vazquez

Dr. Rafael Vazquez Duhalt

Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. Leobardo Serrano Carreón

por sus valiosas sugerencias en la revisión del manuscrito.

La realización de los estudios de maestría, así como el desarrollo del presente trabajo fueron posibles gracias al apoyo económico otorgado por **CONACyT (Reg. 113993)**.

INDICE GENERAL.

pag.

RESUMEN.	1
1. INTRODUCCION.	2
1.1 Colorantes sintéticos y su impacto ambiental.	2
1.2 Bidegradación.	10
1.3 Hongos ligninolíticos y xenobióticos.	11
1.3.1 Caracterización de enzimas ligninolíticas.	12
1.4 Degradación enzimática de colorantes.	18
2. OBJETIVOS.	23
3. MATERIALES Y METODOS.	24
3.1 Químicos.	24
3.2 Cepas fúngicas.	24
3.3 Medios de cultivo.	25
3.4 Cinética de crecimiento.	25
3.5 Extracción del sistema enzimático.	26
3.6 Purificación de laccasa.	27
3.6.1 Purificación de laccasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	27
3.6.2 Purificación de laccasa de <i>Trametes hispida</i> .	27
3.7 Selección de colorantes y evaluación de decoloración.	28
3.8 Métodos analíticos.	30
4. RESULTADOS.	31
4.1 Metabolización <i>in vivo</i> de los colorantes.	31
4.1.1 En medio sólido.	31
4.1.2 En medio líquido.	32
4.2 Ensayos <i>in vitro</i> .	34

4.2.1 Fluido extracelular de la fermentación líquida de <i>P. ostreatus</i> .	34
4.2.2 Actividades decolorativas vs. cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> .	36
4.3 Inducción de enzimas ligninolíticas.	38
4.4 Caracterización del extracto crudo de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	40
4.4.1 Dependencia de oxígeno.	40
4.4.2 pH óptimo de reacción.	41
4.5 Caracterización de extractos extracelulares de hongos ligninolíticos.	41
4.6 Purificación de laccasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	44
4.7 Purificación de laccasa de <i>Trametes hispida</i> .	49
4.8 Caracterización cinética de la laccasa.	53
5. DISCUSION.	55
6. CONCLUSIONES.	61
BIBLIOGRAFIA.	62

RESUMEN.

En este trabajo se realizó el estudio de la identificación de actividad decolorativa en hongos ligninolíticos para 27 colorantes de uso textil. La decoloración se llevo a cabo *in vivo* en medio sólido y en fermentación líquida con las cepas de *Pleurotus ostreatus* IE8, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 y *Caldaromyces fumago* CMI 89362, resultando *Pleurotus ostreatus* IE8 la cepa con mayor capacidad decolorativa en estos medios. Se estudiaron los extractos extracelulares de *Pleurotus ostreatus* IE8 en fermentación líquida, así como aquellos provenientes de fermentación en estado sólido utilizando trigo y avena como soportes. Se encontró actividad decolorativa en el fluido extracelular para 5 de los 27 colorantes probados. La fermentación llevada a cabo en material ligninocelulósico estimuló considerablemente la actividad decolorativa. Se comparó la capacidad de decoloración de *P. ostreatus* IE8 con quince diferentes cepas de los géneros de *Bjerkandera*, *Pleurotus*, *Phanerochaete*, *Trametes* y *Sporotichum* cultivados en avena. Aquellos que presentaron actividad decolorativa fueron, en su mayoría, obtenidos de variedades de *Pleurotus* y *Trametes*. *Pleurotus ostratus* IE8 y *Trametes hispida* 8260 tuvieron los valores mas altos de decoloración. Todas aquellas cepas que presentaron actividad decolorativa, también presentaron actividad laccasa. Se identificó a esta enzima como la responsable de la decoloración. Las mayores actividades específicas fueron obtenidas de *Pleurotus ostratus* IE8 y *Trametes hispida* 8260. La laccasa fue parcialmente purificada a partir de los extractos obtenidos en fermentación en estado sólido de estas dos cepas. La enzima parcialmente purificada de *T. hispida* presentó un mayor rango de decoloración y grado de pureza que la enzima de *P. ostreatus*. Se identificaron al menos dos isoenzimas. Con las isoenzimas obtenidas de *T. hispida* se realizaron los estudios de caracterización cinética utilizando el ABTS y el Azul Reactivo F-RL como sustratos modelo.

La capacidad biocatalítica de la laccasa abre nuevos campos de investigación enfocados a la optimización de técnicas de descontaminación no sólo para colorantes sino para un gran número de compuestos xenobióticos recalcitrantes.

1. INTRODUCCION.

1.1 Colorantes sintéticos y su impacto ambiental.

La producción de colorantes a nivel mundial se estima cercana a las 700 000 toneladas; un poco mas de la mitad está destinada a la producción de colorantes textiles y alrededor del 15 por ciento a industrias como la del papel, piel, etc. El 25 por ciento corresponde a la producción de pigmentos orgánicos (129). De los colorantes disponibles actualmente en el mercado, más del 50 por ciento son compuestos azo (53).

Alrededor del 15 por ciento del total de la producción de los colorantes es perdida en su síntesis y procesamiento, lo que equivale a una liberación al ambiente de 125 toneladas diarias (118, 3). En el caso de industrias como la textil el problema es debido al consumo incompleto en el proceso de tinción, donde existen pérdidas entre el 10 y el 20 por ciento del total del colorante utilizado (12). Estos ingresan al ambiente a través de las descargas de aguas residuales.

Los nuevos colorantes son caracterizados por su resistencia a la luz, al lavado y al ataque microbiano, haciéndolos atractivos y funcionales para la industria, pero dando lugar a compuestos cada vez mas recalcitrantes (129, 97, 68, 69). Este el caso de colorantes con sustituciones tales como azo, nitro y grupos sulfo (54, 110).

La persistencia del color en las aguas residuales representa uno de los mayores problemas ambientales, ya que la concentración del colorante en cuerpos receptores puede ser menor a la de cualquier otro compuesto tóxico permitido por la legislación, sin embargo este es visible aun en bajas concentraciones (87). Es incluso capaz de colorear suelo y vegetación circundantes a los cuerpos receptores muchas veces terrenos fértiles utilizados para la agricultura y el ganado (82).

La decoloración en el tratamiento de aguas residuales se lleva a cabo por uno o la combinación de varios métodos tales como adsorción, precipitación, degradación química, fotodegradación y biodegradación (129, 87, 110).

Para la adsorción se ha utilizado carbón activado, silica gel, bauxita, madera, derivados de celulosa y resinas de intercambio iónico. De los procesos químicos para la remoción del color, la degradación oxidativa por cloro y ozono tienen una gran importancia práctica. El tratamiento con cloro resulta adecuado con colorantes monoazo

y antraquinonas aniónicas, pero es insatisfactorio con colorantes azo dispersos y directos. El ozono es más efectivo y tiene la ventaja de no producir iones inorgánicos, sin embargo es más caro. La degradación fotoquímica en solución acuosa, la cual puede ocurrir en ríos y lagunas, se lleva a cabo de manera muy lenta sobre todo si los colorantes sintéticos están diseñados en principio para poseer una alta estabilidad a la luz (129). Estos procesos han llegado a ser, con muy pocas excepciones, poco eficientes y muy costosos.

La biodegradación para alcanzar la mineralización completa sería el método ideal para la decoloración de efluentes contaminados. Sin embargo, los colorantes de origen sintético son, en su mayoría, compuestos xenobióticos. La biota nativa de los ecosistemas acuáticos no posee enzimas diseñadas para metabolizar tales compuestos, haciéndolos recalcitrantes a la degradación natural.

Aunque muchas veces los colorantes no son tóxicos por sí mismos, si se ha comprobado la toxicidad de sus productos de degradación. En el caso de los colorantes tipo azo, por ejemplo, que por sí mismos no producen efectos mutagénicos, carcinogénicos o tóxicos, se ha reportado que aquellos solubles en agua son metabolizados por las azoreductasas de la microflora intestinal (99, 16) y aquellos colorantes no solubles en agua son reducidos por las fracciones microsómicas y citosólicas del hígado (16, 57). El primer paso catabólico en la reducción de los colorantes azo, el cual viene acompañado por la disminución del color, es la reducción del doble enlace azo para producir aminas aromáticas las cuales son carcinógenas (99, 16, 17). Estas aminas aromáticas se localizaron en la orina de los trabajadores de industrias productoras de colorantes y en animales experimentales después de ser aplicado el colorante (16, 62). Se ha comprobado que la bencidina, un derivado amino aromático, produce cáncer de vejiga en el hombre y tumores en algunos animales de experimentación (100). Raffi *et. al.* (96) aislaron cepas anaeróbicas productoras de azoreductasas a partir de heces fecales humanas. Entre ellas se encontraban especies como *Eubacterium*, *Clostridium* y *Butyrivibrio*. Además han sido reportadas un gran número de bacterias que bajo condiciones anaeróbicas llevan a cabo la reducción de los compuestos azo (22).

Clasificación de los colorantes.

De acuerdo a su naturaleza química los colorantes pueden ser divididos en

compuestos orgánicos e inorgánicos. Estos a su vez se dividen en colorantes naturales y sintéticos. Aunque muchos de ellos tuvieron su origen de fuentes naturales, actualmente son obtenidos preferiblemente por vía sintética.

Existe una clasificación técnica que divide a los colorantes en tintas y pigmentos. Los pigmentos son, rigurosamente, compuestos prácticamente insolubles en el medio en donde son aplicados y se adhieren al sustrato por compuestos adicionales. Aunque el término es aplicado comúnmente a colorantes de origen natural. Las tintas son compuestos que se aplican a diversos materiales por medio de un líquido en el que son parcial o totalmente solubles y a diferencia de los pigmentos, estas deben poseer una alta afinidad por el sustrato (129). Los pigmentos son utilizados preferencialmente en la industria alimentaria. Las tintas se utilizan en la industria textil, papelera, curtido, fotográfica y como aditivo en productos derivados del petróleo (65, 129, 118).

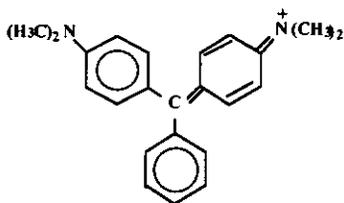
Los colorantes de uso industrial representan la familia más grande de colorantes de origen orgánico. Estos son divididos de acuerdo a su estructura química en: poliméricos, triarilmetanos, heterocíclicos, anulenos, antraquinonas y compuestos azo.

El *Colour Index* es una enciclopedia que registra todos los colorantes usados comercialmente a gran escala, y clasifica estos compuestos de acuerdo a su estructura química y a el área y método de aplicación.

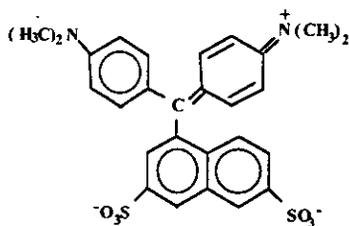
Polienos y polimetinos

Se caracterizan por tener una cadena de grupos metino ($-CH=$) en un sistema de doble enlace conjugado el cual normalmente tiene la configuración *trans*. Los átomos de carbono del metino pueden ser sustituidos por otros grupos o por átomos de hidrógeno, o puede ser parte de un sistema heterocíclico (*Fig. 1*). En los polimetinos existen un donador D y un aceptor A de electrones en los extremos terminales opuestos de la cadena (*Fig. 2a*), mientras que en los polienos pueden existir otros grupos que no tienen que ver con la excitación electrónica (*Fig. 2b*).

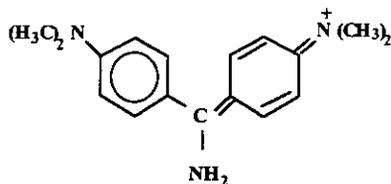
La mayor parte de los polimetinos son compuestos de origen sintético, mientras que los polienos son derivados de los carotenos encontrados en fuentes naturales pero que



A. Verde de Malaquita
(C. I. Verde básico 4)



B. Verde Naftaleno
(C. I. Verde ácido 16)

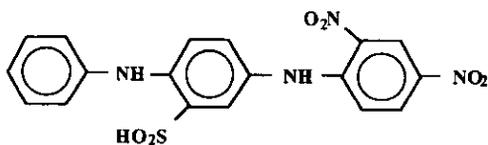


C. Auramina O (C. I. Amarillo básico 2)

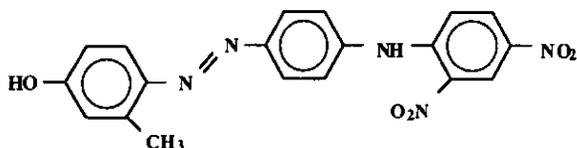
Fig. 4. Ejemplos de triarilmetanos (A), y diarilmetano (B y C).

Heterocíclicos nitrados y azufrados.

En los colorantes nitrados la característica estructural es un grupo nitro en posición *orto* a un electrón donador (originalmente hidroxilo, ahora grupo amino) (Fig. 5). Ellos son principalmente pigmentos amarillo a café; son compuestos aniónicos del grupo de colorantes dispersos.



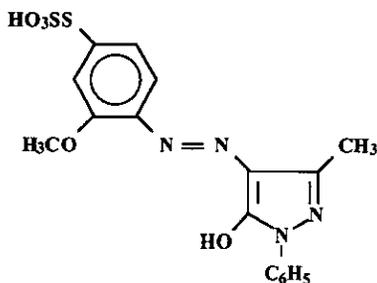
A. Amarillo Amido E (C. I. Anaranjado ácido 3)



B. Amarillo Nilomina A-3R (C. I. Amarillo ácido 199)

Fig. 5. Colorantes nitrados.

Los colorantes azufrados son aquellos que en su forma final, después de ser aplicados, son compuestos macromoleculares solubles al agua caracterizados por enlaces di- y poliazufrados ($-S_n-$) entre residuos aromáticos. En principio son obtenidos por tratar aminas aromáticas, fenoles y aminofenoles con azufre y/o polisulfito de sodio (Fig. 6).



Anaranjado Brillante Dicolita 3G (C. I. Anaranjado azufre condensado 2)

Fig. 6. Ejemplo de colorante azufrado.

Anulenos

Los polimetinos son construidos a partir de cadenas de grupos metino. Si estos grupos metino forman sistemas anulares, estos compuestos con dobles enlaces conjugados son llamados anulenos. Como en el caso de los polimetinos, los grupos metino de los anulenos pueden ser reemplazados por nitrógeno ($-N=$). Mientras que los anulenos carbocíclicos no son coloreados, los anulenos con cuatro nitrógenos aza (Fig. 7), son pigmentos naturales extremadamente importantes, como es el caso de la clorofila. Los anulenos con ocho nitrógenos aza son tintas y pigmentos sintéticos con propiedades

únicas de fijación firme en colores azul a verde. El nombre común para los colorantes octaaza anulenos es ftalocianinas (*Fig. 8*). Prácticamente todos los colorantes sintéticos tipo octaaza anulenos y los naturales tetraaza anulenos son complejos metálicos.

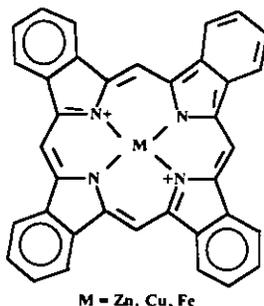


Fig. 7. Estructura general de los tetraaza anulenos.

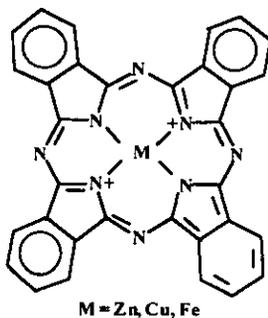
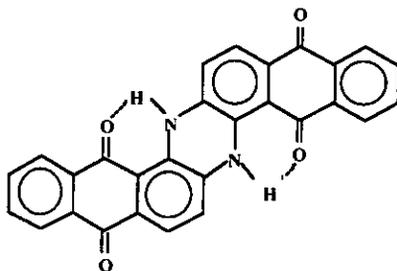


Fig. 8. Estructura general de los octaaza anulenos

Antraquinonas

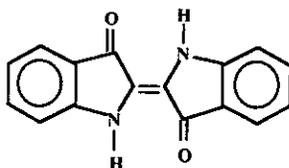
Son colorantes de origen sintético basados en antraquinona. El descubrimiento de la indantrona por Bohn en 1901 (*Fig. 9*), que es la síntesis química de dos moléculas de 2-aminoantraquinona, permitió el desarrollo de tintas llamadas “indantronas a la cuba” las cuales exhiben propiedades de alta resistencia a la luz y a la humedad en fibras celulósicas.

El término alemán indantrona proviene de un acrónimo de 'ndigo-antraquinona, pues la idea original fue sintetizar un muy conocido colorante natural llamado 'ndigo (*Fig. 10*) a partir de 2-aminoantraquinona.



Indantrona.

Fig. 9. Primer colorante “a la cuba”, basada en antraquinona.

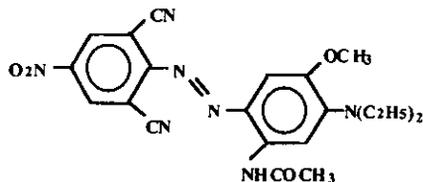


Indigo.

Fig. 10. Colorante natural.

Compuestos azo

Los colorantes azo son compuestos derivados de las sales de diazonio ($-N \equiv N^+$) que contienen dobles enlaces nitrogenados ($-N=N-$) ligados a benceno, naftaleno, anillos aromáticos heterocíclicos o grupos alifáticos (Fig. 11). De acuerdo al número de enlaces azo los colorantes se describen como compuestos mono-, di-, tri-, tetra- (etc.) azo.



Azul Resolin BBLs (C. I. Azul disperso 165)

Fig. 11. Ejemplo de un colorante azo.

1.2 Biodegradación.

Varios consorcios microbianos han sido probados, el tratamiento con lodos activados entre ellos (110), que son capaces bajo condiciones anaerobias de lograr una considerable decoloración en los efluentes (42, 83, 29). En el caso de colorantes tipo azo estos no son típicamente biodegradados bajo condiciones aeróbicas (4, 68, 69), sin embargo bajo condiciones anaeróbicas pueden ser reducidos a aminas aromáticas, las cuales son menos coloridas pero se ha comprobado que son aún mas tóxicas y carcinogénicas que el compuesto que les dió origen (67, 54, 22, 96). Nigam *et. al.* (83) aislaron un consorcio microbiano, PDW, capaz de llevar a cabo en condiciones anaeróbicas la decoloración de diversos colorantes industriales de uso textil. Nueve colorantes fueron estudiados, ocho compuestos diazo y una ftalocianina. Después de 24 horas de incubación a 26° C los colorantes fueron decolorados en un 68% excepto la ftalocianina que no presentó prácticamente ningún cambio. No se realizó ningún análisis de los productos generados por la decoloración. En base a estos resultados, Oxspring *et. al.* (86) desarrollaron un filtro anaerobio de flujo ascendente con un consorcio microbiano, PDW, inmovilizado. El filtro fue evaluado con un colorante de amplio uso industrial, Negro Remazol B (un compuesto diazo), y la metabolización del compuesto fue monitoreada por el uso de electroforesis capilar. El filtro fue operado en un proceso por lote por 96 horas. Se observó una remoción del color por arriba del 95% después de las 48 horas. Encontraron que la decoloración se había llevado a cabo presumiblemente por la remoción de grupos periféricos, sin embargo el centro cromofórico había quedado intacto. La detección de tres metabolitos mucho menos coloridos indicaba la posible generación de aminas aromáticas como productos de degradación, aunque esta hipótesis no fue confirmada.

También se ha probado un sistema secuenciado en condiciones anaerobio-aerobio para lograr así una completa oxidación de los compuestos aromáticos (29, 128). Debe aclararse que, en ocasiones, la disminución del color es debida a una modificación del grupo cromofórico del compuesto colorido, esto no significa que exista una degradación del colorante. Haug *et. al.* (42) reportaron la mineralización de un colorante tipo azo sulfonado, el Amarillo Mordante 3, llevado a cabo por el uso alternativo de un proceso anaerobio-aerobio, usando un cultivo bacteriano anaerobio facultativo degradador del

ácido 6-aminoftalen-2-sulfónico (6A2NS). Ellos proponen la generación en cantidades equimolares de 6A2NS y una amina aromática, 5-aminosalicilato (5AS), como productos del proceso anaerobio a partir de la reducción del enlace azo. Ya había sido descrita la ruta de metabolización del 6A2NS como fuente de carbono en condiciones aeróbicas de este consorcio bacteriano por Nörtemann *et. al.* (84). Por su parte Stolz (109) estudió la ruta de asimilación de 5AS como fuente única de carbono en aerobiosis por este consorcio bacteriano, sin embargo Haug *et. al.* (42) determinaron que la desaparición de 5AS bajo estas condiciones se debía principalmete a un proceso de autooxidación.

Donlon *et. al.* (27) reportaron la mineralización parcial de un colorante tipo azo, Anaranjado Mordante 1, llevado a cabo en un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) alimentado con glucosa como cosustrato. Entre los días 75 y 166 el colorante fue grandemente reducido, al menos el 90% de su concentración original. En este periodo fueron generadas de forma constante dos aminas aromáticas de menor toxicidad, 1-4-fenildiamina (1-4, PDA) y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA). Después de 189 días de operación se detectaron únicamente trazas del ácido 5-aminosalicílico en el efluente. En ensayos de biodegradabilidad en proceso por lote con muestras de lodos de este reactor se confirmó la mineralización de 5-ASA a metano. No hubo conversión de 1-4, PDA a metano en estos ensayos. Sin embargo existen reportes de la metabolización de este compuesto en aerobiosis (94), así que un proceso aeróbico posterior podría aplicarse para la completa mineralización del colorante Anaranjado Mordante 1. En base a estos resultados Razo-Flores *et. al.* (97) reportaron 'por primera vez' la mineralización de un colorante tipo azo de uso farmacéutico, azodisalicilato, compuesto por dos unidades de 5-ASA en el mismo sistema de fermentación (fermentador UASB). Era de esperarse que bajo las mismas condiciones el colorante fuera llevado hasta metano, ya que los productos primarios de la reducción del compuesto son dos moléculas de ácido 5-aminosalicílico.

Cabe señalar que la mayoría de los estudios realizados para la degradación de colorantes por sistemas anaerobios están enfocados hacia colorantes tipo azo.

1.3 Hongos ligniolíticos y la degradación de compuestos xenobióticos.

En estudios anteriores se ha determinado que ciertas especies de basidiomicetos, productores de un sistema enzimático capaz de mineralizar componentes de la madera;

lignina, celulosa y hemicelulosa (33), también tienen la capacidad de oxidar una amplia variedad de compuestos aromáticos (127, 28, 13).

Phanerochaete chrysosporium, el hongo ligninolítico más estudiado, tiene la habilidad de degradar lignina durante una etapa del metabolismo secundario denominada idiofase, la cual es disparada por el agotamiento de la fuente de nitrógeno (52). Los cultivos de *P. chrysosporium* producen, bajo condiciones de limitación de nitrógeno, dos tipos de peroxidasa extracelulares: lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa (33, 51) así como un sistema generador de peróxido de hidrógeno, glioxal oxidasa (117, 34, 48), las cuales forman la mayor parte de componentes extracelulares de su sistema degradador de ligninas (33).

Ha sido demostrado que cultivos ligninolíticos de *P. chrysosporium* son capaces de mineralizar una amplia variedad de contaminantes aromáticos (13, 15). Ha sido reportada la participación de las ligninasas en la oxidación de hidrocarburos policíclico aromáticos (39, 121, 8); fenoles clorinados (100); PCB's (125); dioxinas (15, 113); pesticidas (47, 55); explosivos (107, 35), dicloroanilinas (1) y colorantes, como se mencionará más adelante.

Otras especies de basidiomicetos ligninolíticos ampliamente estudiados como *Trametes versicolor* y diferentes especies de *Pleurotus* producen, además de la peroxidasa reportada anteriormente, un sistema de enzimas extracelulares que puede incluir a la veratryl alcohol oxidasa (65, 108, 2), la glucosa oxidasa (112) y la laccasa (98). Las dos primeras caracterizadas por su alta especificidad de sustrato y su participación en la producción continua de H₂O₂ para las reacciones de peroxidación. La laccasa es un tipo de polifenol-oxidasa glicosilada con un centro de cobre (98). La laccasa y la Mn-peroxidasa son las enzimas extracelulares mayoritarias en estas especies (41).

1.3.1 Caracterización de enzimas ligninolíticas.

La lignino peroxidasa ha sido purificada a partir de cultivos de *P. chrysosporium* en condiciones de limitación de nitrógeno (Tabla 1). Se han encontrado diez isoformas que presentan una alta analogía. Son glicoproteínas que contienen un grupo prostético de protoporfirina IX, con un peso molecular alrededor de los 41 kDa. La ligninasa H8, la isoenzima mayoritaria, ha sido ampliamente caracterizada en esta especie (116, 50).

TABLA I. Purificación de isoenzimas de la lignina peroxidasa.^a

Muestra	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Recuperación %
ECF ^b	3300	0.076	0.013	251	5.71	100
ECF concentrado (Miniatan/Amicon)	13.5	16.9	1.23	229	13.8	89
Pre-FPLC ^c (dializado/filtrado)	17	12.95	0.7	220	18.5	88
FPLC purificado						
H1	8.7	0.52	0.07	4.5	7.24	1.8
H2	17.7	2.1	0.13	36.3	16.4	14
H6	13.1	0.33	0.06	4.36	5.5	1.7
H7	4.3	0.33	0.1	1.4	3.28	0.5
H8	31.8	1.56	0.21	49.6	7.6	20
H10	25.7	0.25	0.09	6.35	2.7	2.5

a. Kirk et. al. (50)

b. ECF. Fluido extracelular.

c. FPLC. Cromatografía líquida alta presión para proteínas.

Johansson y Nyman (43) reportaron dieciséis isoformas de la lignina peroxidasa producidas por *Trametes versicolor* bajo las mismas condiciones de cultivo. La isoenzima mayoritaria, H12, fue caracterizada reportando un peso molecular de 41-43 kDa.

La Mn(II) peroxidasa también ha sido localizada y estudiada en diversas especies. Es una hemoproteína glicosilada con la protoporfirina IX como grupo prostético, reportada con un peso molecular alrededor de los 46 kDa producida por *P. chrysosporium* (117, 31). Para *T. versicolor* se han reportado cinco isoformas con un peso molecular de 44-45 kDa (43), y para *Pleurotus eryngii* dos isoenzimas con un peso molecular de 43 kDa (63).

Tabla II. Purificación de laccasa de *Pleurotus ostreatus*.^a

Paso de purificación	Proteína (mg)	Actividad (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento %
Caldo de cultivo	38	300	7.9	100
Sulfato de amonio	5	275	55	92
DEAE-Sefarosa	0.3	53	177	18
ConA-Sefarosa	0.17	36	212	12

a. Referencia 101.

Sannia *et. al.* (101) purificaron y caracterizaron la laccasa de *P. ostreatus* a partir de cultivo líquido. Fue utilizado el extracto de levadura como inductor para producción de la enzima (Tabla II). La actividad laccasa fue monitoreada por la polimerización de guayacol midiendo el incremento de absorbancia a los 465 nm. Reportaron un peso molecular de 59 kDa.

Youn *et. al.* (120) purificaron también la laccasa de *P. ostreatus* (Tabla III), en presencia de ácido felúrico como inductor. Encontraron dos actividades laccasa con un peso molecular alrededor de los 64 kDa. La actividad enzimática fue monitoreada por la oxidación de siringaldazina siguiendo el incremento de absorbancia a los 530 nm.

Tabla III. Purificación de laccasas extracelulares de *P. ostreatus*.^a

Pasos de purificación	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Recuperación (%)	Factor de purificación
Cultivo filtrado	760	0.07	100	1.0
Precipitación con sulfato de amonio	81	0.33	54	4.7
Precipitación con sulfato de potamina	40	0.37	30	5.3
DEAE Sephadex A-50	25	0.48	24	6.9
Sephacril S-200 HR	5.2	1.42	14.8	20.3
DEAE SPW				
Lac I	1.8	3.00	10.9	42.9
Lac II	0.3	1.67	1.0	23.9

a. Referencia 126.

Bourbonnais *et. al.* (10) reportaron la acción catalítica de dos laccasas aisladas de *T. versicolor* (Tabla IV). La producción se llevó a cabo en cultivo líquido en presencia de 2,5-xilidina como inductor para la producción de la enzima. Para todos los sustratos monoméricos y diméricos la actividad de la laccasa II fue similar o ligeramente menor a la laccasa I. Con sustratos de alto peso molecular como lignina de papel y el colorante Poli B-411, un polímero de diaminoantraquinona sulfonada, la velocidad de oxidación tendió a ser significativamente mas alta con la laccasa I que con la laccasa II.

Tabla IV. Velocidades relativas de varios sustratos por Lacasa I y Laccasa II.^a

Sustrato	Conc.	λ (nm)	$\Delta OD^b/\text{min} \pm SD$		Ratio Lac II/I
			Lac I	Lac II	
ABTS	1 mM	420	1.30 \pm 0.13	1.30 \pm 0.06	1.00
Guayacol	1 mM	470	0.15 \pm 0.03	0.12 \pm 0.01	0.8
Siringaldazina	0.1 mM	530	1.37 \pm 0.15	1.00 \pm 0.1	0.73
Siringaldehído	1 mM	370	0.026 \pm 0.004	0.023 \pm 0.001	0.88
Alcohol vanílico	1 mM	295	0.078 \pm 0.006	0.059 \pm 0.003	0.76
Promacina	1 mM	512	0.28 \pm 0.02	0.027 \pm 0.01	0.96
4,5-dihidroxi-2,7-naftaleno sulfonato	1 mM	400	0.047 \pm 0.003	0.040 \pm 0.001	0.87
8-anilino-1-naftaleno sulfonato	1 mM	430	0.076 \pm 0.008	0.068 \pm 0.002	0.89
4,4'-diamino-stilben-2,2'-disulfonato	0.1 mM	360	-0.062 \pm 0.004	-0.049 \pm 0.002	0.79
Induín	0.5 mg/ml	400	0.032 \pm 0.002	0.021 \pm 0.001	0.66
Lignina de papel	0.2 mg/ml	400	0.028 \pm 0.002	0.012 \pm 0.001	0.43
Poli B-411	0.1 mg/ml	600	-0.02 \pm 0.001	-0.007 \pm 0.001	0.35

a. Referencia 10.

b. ΔOD , cambio en densidad óptica

La laccasa también ha sido aislada y caracterizada de *Pleurotus eryngii* a partir de fermentación líquida, la cual se llevó a cabo en presencia de material lignocelulósico: espigas de cereal sin semilla tratadas químicamente, para solubilizarlas en el medio de cultivo (80, 81). Se encontraron dos isoenzimas de la laccasa, que fueron purificadas y comparadas sus características cinéticas en la oxidación de diferentes compuestos aromáticos (Tabla V). El resultado de este estudio mostró la influencia de los sustituyentes en los compuestos fenólicos con respecto a la K_m y la V_{max} . Excepto en la laccasa I, la mayoría de los factores que incrementan la V_{max} también incrementan la afinidad de la enzima. Por ejemplo, cuando radicales hidroxilo o metoxilo son cambiados de la posición *orto* a la posición *para* (catecol vs. QH_2 y *o*-metoxifenol vs. *p*-metoxifenol); cuando el radical *o*-metoxilo es reemplazado por el radical *o*-hidroxilo (guayacol vs. catecol) y cuando grupos metilo o metoxilo son agregados al anillo aromático (QH_2 vs. $MeQH_2$ y guayacol vs. 2,3-dimetoxifenol) la K_m y la V_{max} se incrementan.

Tabla V. Constantes cinéticas de isoenzimas de la laccasa de *P. eryngii*.^a

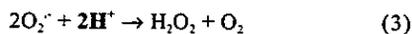
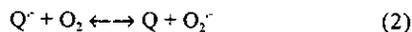
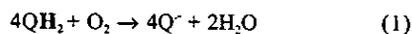
Compuesto	λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Laccasa I			Laccasa II		
			Km (mM)	Vmax (U/mg)	Vmax/Km	Km (mM)	Vmax (U/mg)	Vmax/Km
<i>p</i> -aminofenol	246	15.627	0.8	5.0	6.2	1.0	0.8	0.8
<i>p</i> -anisidina	542	1.173	3.1	20.6	6.6	3.3	17.9	5.4
<i>p</i> -metoxifenol	253	4.990	0.8	10.8	13.5	0.9	0.8	0.9
Guayacol	465	12.100	7.6	5.9	0.8	8.0	1.3	0.2
Catecol	392	1.456	2.2	32.1	14.6	4.1	15.4	3.8
QH ₂ ^b	247	21.028	4.6	21.2	4.6	2.5	2.6	1.0
MetQH ₂ ^c	250	21.112	2.1	122.2	58.2	1.6	8.4	5.2
2,6-dimetoxifenol	468	27.500	1.4	54.2	38.7	0.4	3.3	8.2

a. Muñoz *et. al.* (80).

b. Hidroquinona.

c. Metil *p*-hidroquinona.

La laccasa es una enzima no específica y el rango de sustratos a oxidar varía de una laccasa a otra, dependiendo de la especie. Lleva a cabo la oxidación monovalente de diferentes compuestos fenólicos sustituidos por la reducción simultánea de oxígeno molecular (reacción 1). El producto inicial, radical fenoxi, es típicamente inestable y puede sufrir una segunda etapa de oxidación o puede generar polímeros fenólicos con otros productos de reacción (*Fig. 12*). En el caso de las hidroquinonas (reacción 1), los radicales semiquinonas (Q^{•-}) son convertidos a quinonas (Q) por diferentes reacciones, incluyendo la oxidación monovalente de oxígeno, con la concomitante producción de O₂^{•-} (reacción 2). Algunos autores atribuyen este evento de oxidación a una catálisis enzimática (97), aunque Muñoz *et. al.* (80) sugieren que esta etapa es llevada a cabo, en parte, por un proceso de autooxidación. Estos autores comprobaron además la generación de H₂O₂ a partir de la autooxidación (3).



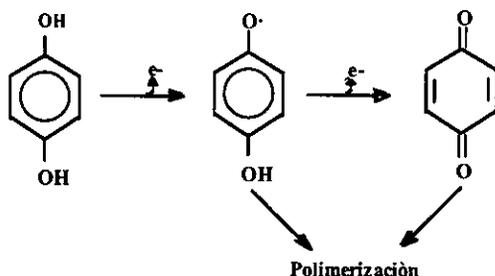
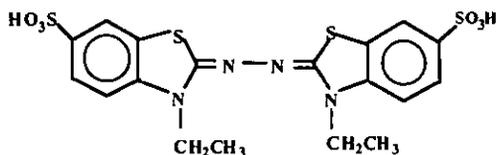


Fig. 12. Reacción típica de la laccasa, donde un difenol (hidroquinona), sufre una oxidación para formar un radical libre centrado en oxígeno. Estas especies pueden ser convertidas a quinonas en un segundo paso catalizado enzimáticamente o por autoxidación. La quinona y los productos radicales libres sufren polimerización. Referencia 106.

Se ha mostrado recientemente que, en presencia de compuestos apropiados de bajo peso molecular, llamados mediadores, la laccasa es capaz de oxidar un amplio rango de compuestos no-fenólicos, sustratos que no son típicos de la enzima. Bourbonnais y Paice (9) han mostrado que el ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)] (Fig. 13), un sustrato artificial de la laccasa, tiene la capacidad de actuar como mediador por la generación de un radical catiónico capaz de iniciar la oxidación del compuesto no fenólico en presencia de la enzima. Kawai *et. al.* (45) reportó la oxidación de benzilalcoholes metoxilados con siringaldehído como mediador. Se ha reportado también la degradación de antraceno y benzo[a]pireno (11, 18, 44) por la laccasa de *T. versicolor* en presencia de mediadores como ABTS, HBT (hidroxibenzotiazol) y fenotiazina.



2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

Fig. 13. ABTS

1.4 Degradación enzimática de colorantes.

Bumpus y Brock (14) determinaron que la lignino peroxidasa lleva a cabo la N-demetilación del Cristal Violeta. Este, junto con otros colorantes tipo trifenilmetano como la Benzenamina, Rojo Cresol, Azul de Bromofenol, Violeta Etlíca, Verde de Malaquita y Verde Brillante son biodegradados en cultivos de *P. chrysosporium* bajo condiciones de limitación de nitrógeno. Colorantes tipo azo: Naranja II, Tropaeolin O, Rojo Congo, y un colorante heterocíclico Azure B, también fueron decolorados por cultivos de *P. chrysosporium* (28). Se ensayó la decoloración de estos compuestos con preparaciones de lignino peroxidasa cruda, y todos excepto Rojo Congo fueron decolorados, indicando que el microorganismo puede usar otros sistemas enzimáticos capaces de decolorar, o dar inicio a la decoloración de estos compuestos (28).

Spadaro *et. al.* (103) comprobaron que bajo estas mismas condiciones también se puede llevar a cabo la mineralización de colorantes azo-fenólicos como 4-fenilazoanilina, 4-fenilazofenol, Amarillo disperso 3, Amarillo solvente 14 y Naranja disperso 3 con funciones nitro, hidroxilo, amino y acetoamido. Diversos colorantes tipo azo amino sustituidos incluyendo la 4-fenilazoanilina y las N-metil y N-N'-dimetil-4-fenilazoanilinas son conocidos mutágenos carcinogénicos (66).

Ollikka *et. al.* (85) compararon tres isoenzimas purificadas de la lignino peroxidasa, LiP 4.65 (H2); LiP 4.15 (H7) y LiP 3.85 (H8), contra el sistema enzimático crudo de *P. chrysosporium* en la decoloración de diez tipos diferentes de colorantes incluyendo compuestos azo, trifenilmetanos, heterocíclicos y poliméricos. La capacidad decolorativa de cada una de las isoenzimas, en presencia de alcohol veratrílico, fue comparable a la preparación enzimática cruda, y disminuyó dramáticamente cuando el alcohol no estuvo presente. Sugiriendo con esto que el alcohol veratrílico actúa como mediador de la reacción (40). En contraste, la omisión del alcohol veratrílico no tuvo prácticamente ningún efecto en la capacidad decolorativa en los ensayos con la preparación enzimática cruda. Esto debido probablemente a que los hongos son capaces de sintetizar alcohol veratrílico como producto del metabolismo secundario (61). Las tres isoenzimas presentaron además diferentes especificidades para los colorantes (85).

Chivukula *et. al.* (24) reportó la generación de hidroperóxidos a partir de la oxidación de colorantes azo sulfonados, llevada a cabo por la lignino peroxidasa. La

reacción inicia con dos oxidaciones sucesivas de un electrón del anillo fenólico del colorante azo por la forma peroxidada de LiP produciendo un ión cabanión. El ataque nucleofílico del agua hacia el carbono fenólico debilita el enlace azo, produciendo un intermediario hidroxilo inestable el cual se rompe para generar una quinona y una sulfonamido-fenildiazina. La fenildiazina es oxidada por el O₂ para generar el correspondiente radical fenildiazina, un intermediario muy inestable el cual elimina el enlace diazo en forma de nitrógeno molecular. Los radicales sulfonamido-fenilo son acarreados por el O₂ para rendir el correspondiente hidroperóxido (24). Este fue el primer reporte de la producción e identificación de sulfonamido-fenil hidroperóxido en cualquier sistema químico o biológico.

Los estreptomicetos también han mostrado capacidad para la depolimerización oxidativa de la lignina. Sus peroxidases extracelulares participan en procesos de solubilización de ligninocelulosa (7, 19, 20, 91), y en la decoloración de colorantes derivados de antrona usados como sustratos en ensayos de biodegradación de lignina (90).

Pasti-Grigsby *et. al.* (89) compararon la capacidad decolorativa en cultivos de diferentes especies de actinomicetos *Streptomyces* spp., y cultivos en condiciones de limitación de nitrógeno de *P. chrysosporium* con 22 colorantes tipo azo. Demostraron que los estreptomicetos tenían la capacidad de decolorar aquellos colorantes que también eran oxidados por la Mn(II) peroxidasa producida por *P. chrysosporium*. Encontraron una correlación entre la velocidad de decoloración de *Streptomyces chromofuscus* y la velocidad decolorativa de la preparación comercial de la peroxidasa de rabano blanco tipo II. Atribuyeron la capacidad decolorativa de *S. chromofuscus* a una hemoperoxidasa extracelular, e identificaron a 4-(4'-sulfonfenilazo)-fenoles sustituidos con grupos metilo, dimetilo, metoxi y dimetoxi como sustratos preferidos para la peroxidasa de rabano blanco, la Mn (II) peroxidasa y la peroxidasa de *S. chromofuscus*.

Chivukula y Renganathan (23) propusieron un mecanismo para la formación de benzoquinona y SPH (sulfonamido-fenilhidroperóxido) como productos de oxidación de colorantes tipo azo por la laccasa de *Pyricularia oryzae* (Fig. 14). Fueron estudiados

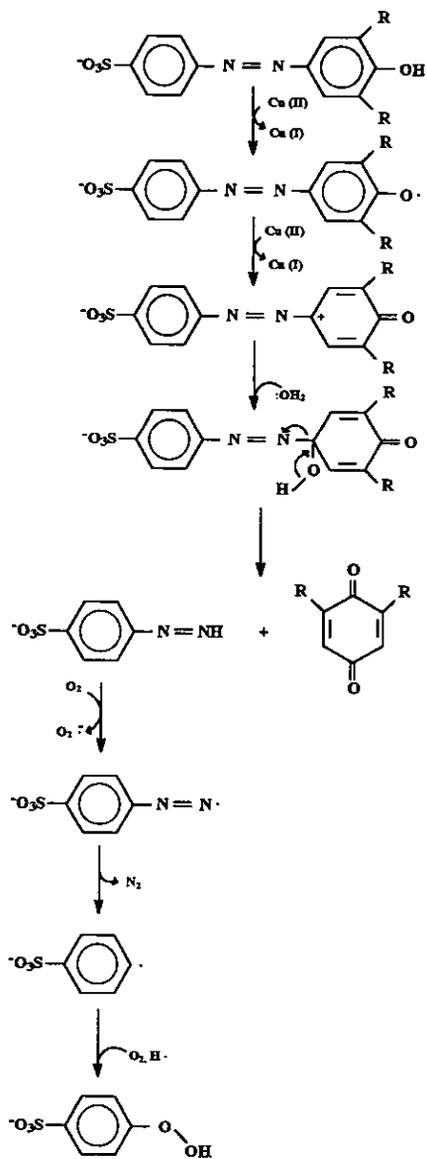


Fig. 14. Mecanismo propuesto para la degradación de colorantes azo por la laccasa de *P. oryzae*. Referencia 12.

derivados del 4-(4'-sulfonilazo)-fenol con sustituciones metil, metoxi, cloro y nitro. Únicamente los colorantes con sustituyentes donadores de electrones, grupos metoxi y metil, fueron oxidados. Aparentemente la posición de los sustituyentes en la molécula influye en la afinidad de la enzima para la reacción (23, 89).

Se ha reportado que *P. ostreatus* tiene la capacidad de decolorar *in vivo* un colorante polimérico, Poli-B411, cuando es crecido en un medio conteniendo material lignocelulósico (95).

Vyas y Molitoris (122) reportaron la producción de una peroxidasa extracelular de *P. ostreatus* capaz de decolorar el Azul Brillante Ramazol R (RBBR), azul reactivo 158. La fermentación se llevó a cabo en estado sólido, con varillas de trigo como soporte. La mayor actividad decolorativa se presentó entre los 14 y los 20 días de incubación. Encontraron además en el extracto crudo concentrado actividades como Mn-peroxidasa, peroxidasa Mn-independiente y laccasa.

Shin *et. al.* (123) obtuvieron y purificaron la peroxidasa responsable de la decoloración de RBBR, a partir de fermentación líquida de *P. ostreatus* en cultivo estático y en presencia de alcohol veratrílico como inductor. Determinaron las propiedades cinéticas de la enzima purificada con diferentes compuestos aromáticos (Tabla VI). Presenta afinidades con el mismo orden de magnitud para la mayoría de los sustratos, excepto para el cristal violeta.

Tabla VI. Especificidad de sustrato de peroxidasa decoloradora de RBBR de *Pleurotus ostreatus*.^a

Sustrato	Vmax ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Km (μM)	Actividad relativa (%)
RBBR	0.58	10.99	100
Acido sinapínico	1.65	20.56	284.5
Cristal violeta	1.43	6.04	246.6
Rojo fenol	0.49	17.41	84.5
Acido siríngico	0.32	28.28	55.2
Acido vanílico	0.28	54.40	48.3
Verde de malaquita	0.16	29.44	27.6
Metoxifenoxi propanodiol	NR ^b	NR	0.0
Alcohol veratrílico	NR	NR	0.0

a. Shin *et. al.* (111)

b. No hubo reacción.

Aunque en este trabajo los autores no identifican a la RBBR-peroxidasa como una de las conocidas ligninasas como la lignino peroxidasa, Mn-peroxidasa, peroxidasa Mn-independiente o laccasa, si presenta afinidad hacia los mismos sustratos de estas enzimas como el rojo fenol, el ácido vanílico y el ácido siríngico.

Hasta la fecha, la mayoría de las investigaciones de biodegradación o degradación enzimática de colorantes, se han centrado en el estudio de colorantes tipo azo y sus variedades. En ocasiones se ha concluido que es más factible el sintetizar colorantes con estructuras químicas que se adapten a las características de los sistemas biológicos (27) o a las propiedades de las enzimas ya conocidas (23, 89), que el explorar y localizar un sistema capaz de llevar a cabo la degradación de la mayor variedad de colorantes sintéticos ya existentes.

Las enzimas ligninolíticas han sido elegidas para el estudio de la degradación de una diversidad de compuestos aromáticos debido a su alta inespecificidad hacia el sustrato. En base a lo anterior, se han propuesto los siguientes objetivos de trabajo.

2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo general.

Identificar un sistema biocatalítico capaz de oxidar y decolorar la mayor variedad de colorantes de uso textil.

2.2 Objetivos específicos.

- Explorar la capacidad de metabolización *in vivo* de los colorantes de diferentes cepas productoras de ligninasas.
- Identificar la actividad enzimática responsable de la decoloración en los extractos celulares y/o fluidos extracelulares.
- Purificar parcialmente la enzima responsable de la decoloración.
- Determinar los parámetros cinéticos de la enzima en la modificación química de los colorantes.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Químicos.

Las sales minerales para los medios de cultivo y la preparación de los amortiguadores fueron adquiridos con J. T. Baker. La glucosa, el extracto de levadura, el extracto de malta y el agar papa-dextrosa fueron comprados a Difco laboratories. Los reactivos para los ensayos enzimáticos como alcohol veratrílico, guayacol, rojo fenol, malonato de sodio y el ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) sal de sodio fueron obtenidos de Aldrich Chemical Company. Los reactivos para la electroforesis como dodecil sulfato de sodio (SDS), glicina, tris(hidroximetil)aminometano (TRIZMA), 2-mercaptoetanol, glicerol, azul de Commassie, azul de bromofenol y materiales de cromatografía como Sephadex-G100, CM-sepharose y fenil-sepharose, fueron comprados a Sigma Chemical Company. El marcador de peso molecular para electroforesis fue comprada a Gibco BRL. La columna de intercambio aniónico de interacción débil, dietilaminetil celulosa DE52, fue obtenida de Whatman. La columna de intercambio aniónico de interacción fuerte, Econo-Pac Q, junto con el equipo de cromatografía y el reactivo para la determinación de proteína fueron obtenidos de Bio-Rad.

Los colorantes para uso textil fueron un obsequio de BASF, Mexicana y de Colorfran, S. A. Estos colorantes fueron elegidos por su demanda en el teñido de telas. Las compañías se negaron a proporcionarnos información técnica acerca de estos productos. Se desconoce la estructura química de la mayoría de ellos.

3.2 Cepas fúngicas.

Las primeras cepas utilizadas fueron *Pleurotus ostreatus* IE8, la cual fue obtenida del Instituto de Ecología, Xalapa, México; *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 obtenida de American Type Culture Collection, Rockville Pike, MD y *Caldaromyces fumago* CMI 89362, obtenida de Commonwealth Mycological Institute, Kew Gardens, London, UK.

Pleurotus ostreatus IE8 fué comparado mas adelante con *Pleurotus ostreatus* 7964, 7972, 7980, 7988, 7989, 7992; *Bjerkandera adusta* 4312, 7308, 8258; *Phanerochaete chrysosporium* 3541, 3642; *Sporotichum pulverulentum* 4521; *Trametes hispida* 8260 y

Trametes versicolor 8272 proporcionadas por la Universidad de Alberta Mold Herbarium, Edmonton, Canadá.

3.3 Medios de cultivo.

Todos los microorganismos fueron crecidos en cajas de Petri (10 cm de diámetro) con medio agarizado (16 g/l) conteniendo papa-dextrosa a una concentración de 24 g/l, en amortiguador de fosfato de sodio 60 mM pH 6.0 y a una temperatura de 28 °C. Las cajas eran conservadas a 4 °C y se realizaban resiembras cada mes y medio. Las cepas originales fueron conservadas bajo las mismas condiciones en tubos de ensaye (20 x 2 cm).

La fermentación líquida se llevó a cabo por la inoculación de cinco porciones de micelio de 5mm de diámetro, previamente crecido en medio agarizado, en matraces de 250 ml, a una temperatura promedio de 28 °C y una velocidad de agitación de 200 rpm. El medio líquido contenía, por litro, 10 g de glucosa, 2 g de extracto de levadura, 3.5 g de extracto de malta, 2 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y 1 ml de solución de metales traza. La solución de metales traza contenía, por litro, 0.14 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.29 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

La fermentación en estado sólido se llevó a cabo en 50 gr de semillas prehumedecidas de avena y trigo, en matraces de 250 ml e inoculadas con 20 ml de cultivo líquido con seis días de fermentación. Fueron incubados en la oscuridad a 30 °C.

3.4 Cinética de crecimiento.

La cinética de crecimiento se realizó únicamente para la fermentación líquida, y en ausencia del colorante, con el fin de identificar las actividades decolorativas obtenidas del extracto intracelular y el fluido extracelular a lo largo del crecimiento. De cinco matraces cultivados simultáneamente, tres fueron destinados para la cinética de crecimiento, y dos para la obtención de los extractos celulares y fluidos extracelulares.

Para determinar la concentración celular se llevó a cabo la medición de la biomasa por peso seco. Membranas de papel filtro de 4.5 cm de diámetro fueron sometidas a secado durante 72 h a una temperatura de 100 °C hasta alcanzar peso constante. En ellos se filtraron

al vacío las cosechas de la fermentación líquida. La biomasa fue sometida a secado durante 24 h a la misma temperatura y el peso fue determinado. Se determinó el pH y la concentración de glucosa en el sobrenadante antes de ser desechado.

La concentración de glucosa residual se midió por el método de determinación de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (70).

3.5 Extracción del sistema enzimático.

El sistema enzimático extracelular de la fermentación líquida fue tomada del medio de cultivo libre de células. El cultivo fue filtrado al vacío a través de papel filtro (Wathman) y posteriormente a través de membranas de nitrocelulosa (0.45 μm). El licor se concentró en una celda de ultrafiltración en atmósfera de nitrógeno a una presión de 20 psi a través de una membrana de teflón, Amicon YM10 (10 kDa). El peso molecular para enzimas extracelulares producidas por hongos ligninolíticos se ha reportado mayor a los 30 kDa (2, 43, 50, 80, 101, 111, 117). La actividad enzimática fue monitoreada en el filtrado y en el concentrado.

La extracción del sistema enzimático intracelular de la fermentación líquida se llevó a cabo por la ruptura celular del micelio, previamente filtrado al vacío y suspendido en amortiguador de fosfato de sodio 60 mM pH 6.00. La ruptura se realizó con la ayuda de un HOMOGENIZADOR BIOSPEC Mod. 985-370 a una velocidad de 30 000 rpm durante 30 sec. El homogenizado fue centrifugado a 10 000 g y el sobrenadante filtrado a través de una membrana de nitrocelulosa (0.45 μm).

No se determinó actividad enzimática intracelular en la fermentación en estado sólido. A los veinte días de fermentación, el micelio recubre por completo a la semilla a la que se adhiere como una finísima malla. Las enzimas extracelulares fueron extraídas por el lavado de la semilla con 300 ml de amortiguador de fosfato de sodio 60 mM pH 6.0. El extracto fue filtrado por una malla de algodón, para retener fragmentos grandes de micelio. El licor se centrifugó a 10 000 g, el sobrenadante fue filtrado al vacío a través de papel filtro (Wathman) y después a través de membranas de nitrocelulosa (0.45 μm). Para eliminar la mayor cantidad de proteína de ningún interés y facilitar la fluidez por la presencia de una alta concentración de exopolisacáridos, el licor se concentró en una celda de ultrafiltración a

través de una membrana de mayor diámetro de poro, Amicon YM30 (30 kDa), en atmósfera de nitrógeno a una presión de 20 psi. La actividad enzimática fue monitoreada en el filtrado y en el concentrado.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a 4 °C.

3.6 Purificación de Laccasa.

3.6.1. Purificación de Laccasa *Pleurotus ostreatus*.

Los pasos de purificación se realizaron de acuerdo a los métodos propuestos por Deustcher (25). El extracto concentrado de la fermentación en estado sólido fue precipitado a diferentes concentraciones de saturación de sulfato de amonio, 20, 40, 60, 80 y 100 %. El precipitado fue resuspendido en regulador de fosfato de sodio 60 mM pH 6.0. Establecida la mayor actividad decolorativa (actividad laccasa) entre el 40 y 80 % de saturación, las fracciones fueron dializadas contra el mismo regulador durante 12 h a 4° C. El dializado se aplicó a una columna de intercambio aniónico de interacción fuerte, Econo-Pac Q. La columna se equilibró con amortiguador de fosfato de sodio 10 mM pH 6.0 y la elución se llevó a cabo con un gradiente de 0-100% de NaCl 1M disuelto en el mismo regulador, a un flujo de 0.8 ml/min. Las fracciones conteniendo actividad laccasa fueron reunidas, concentradas y dializadas a través de una celda de ultrafiltración (Amicon YM10).

3.6.2 Purificación de Laccasa *Trametes hispida*.

A raíz de los problemas generados para la purificación de la laccasa de *P. ostreatus*, atribuida a la alta concentración de exopolisacáridos en el medio, el Dr. Michael Pickard propuso un nuevo proceso de purificación para la laccasa de *T. hispida*.

El extracto concentrado de la fermentación sólida fue aplicado a una columna de intercambio aniónico de interacción débil (DE52) que permitió la eliminación de la mayoría de los pigmentos generados por el microorganismo, presumiblemente exopolisacáridos. La columna fue equilibrada con amortiguador de fosfato de sodio 10 mM pH 6.0 y eluida con un gradiente de 0-0.6 M de NaCl disuelto en el mismo amortiguador. Las fracciones conteniendo actividad laccasa fueron reunidas, concentradas y dializadas por ultrafiltración.

La preparación enzimática fue entonces aplicada a una columna de permeación en gel, Sephadex-G100, y eluida con buffer de fosfatos 60 mM pH 6.0. Las fracciones conteniendo laccasa fueron reunidas y concentradas. Esta preparación fue aplicada por segunda vez a la columna de DE52. Para la obtención de las isoenzimas, las fracciones conteniendo laccasa fueron concentradas y aplicadas a una columna de intercambio aniónico de interacción fuerte, Econo-Pac Q, equilibrada con regulador de fosfato de sodio 10 mM pH 6.0 y eluida con un gradiente de 0-1 M de NaCl disuelto en el mismo regulador, a un flujo de 0.8 ml/min. Las fracciones conteniendo actividad laccasa fueron reunidas y concentradas por ultrafiltración (Amicon YM10).

El porcentaje de recuperación fue determinado por la actividad total recuperada en cada paso de purificación con respecto a la actividad total original del extracto crudo.

El factor de purificación fue determinado por la relación entre la actividad específica correspondiente a cada paso de purificación y la actividad específica original del extracto crudo.

3.7 Selección de colorantes y evaluación de decoloración.

Para el ensayo de decoloración *in vivo*, era necesaria la presencia del colorante en condiciones estériles. Aquellos que presentaron una modificación considerable en sus espectros de absorbancia después de someterlos a esterilización por calor húmedo (15 min, 15 psi), fueron esterilizados por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa (0.22 μ m). Algunos de ellos tampoco pudieron ser esterilizados por filtración debido al dispersante que contenían y que imposibilitaba su paso a través de la membrana. Estos colorantes no fueron evaluados *in vivo*.

Se realizaron además estudios de estabilidad al pH. La mayoría de los colorantes sufren un desplazamiento del pico de máxima absorción a diferentes pH's. El desplazamiento en algunos casos es considerable (129). Los colorantes a evaluar fueron disueltos en soluciones amortiguadoras de pH 6, 7, 8 y 9. Los espectros de absorbancia, medidos entre los 350 y los 800 nm, no presentaron modificación significativa entre pH 6 y 8.

Los colorantes utilizados en la fermentación líquida fueron incubados en condiciones estériles en regulador de fosfato de sodio 60 mM pH 6.0 durante una semana a 25 °C. Al final de la incubación ninguno había sufrido modificación.

Para la evaluación de la decoloración *in vivo* en medio sólido, el colorante fue aplicado al medio agarizado a una concentración de 100 µg/ml. Se observó la aparición de un halo de decoloración alrededor del micelio al final del crecimiento.

La evaluación de decoloración *in vivo* en medio líquido, se llevó a cabo en matraz agitado de 250 ml inoculado al 10% (v/v) a partir de un cultivo de seis días de fermentación, a una temperatura de 28 °C y una velocidad de 200 rpm. El colorante fue colocado desde el primer día de la fermentación. Se realizaron curvas estandar de D.O. vs. concentración de colorante (µg/ml). La concentración en el medio de cultivo fue ajustada de tal forma que no sobrepasara una unidad de absorbancia. El porcentaje de decoloración fue determinado por la disminución de la absorbancia en el sobrenadante, a la longitud de onda de máxima absorción. La velocidad de desaparición fue determinado por la diferencia de concentraciones en el sobrenadante a los ocho días de fermentación. Los espectros de absorbancia entre los 350 y 800 nm fueron analizados a lo largo de la fermentación. Se utilizó como blanco el sobrenadante libre de células, el cual tiene un tono café-amarillo.

Los ensayos de decoloración *in vitro* se realizaron poniendo al colorante en contacto con los extractos celulares. Las concentraciones fueron las mismas utilizadas para la evaluación *in vivo*. La reacción se llevó a cabo durante 1 minuto en una celda de cuarzo a una temperatura de 25 °C. La velocidad de decoloración fue determinada por el cambio de absorbancia por unidad de tiempo ($\Delta A \text{ min}^{-1}$) a la longitud de onda de máxima absorción de cada colorante. Se analizaron además los espectros de absorbancia entre los 350 y 800 nm antes y después de la reacción.

3.8 Métodos analíticos.

La actividad laccasa fue determinada por el incremento de absorbancia a 436 nm con 0.5 mM de ABTS como sustrato en buffer de acetato de sodio 100 mM pH 4.5 ($\epsilon_{436} = 29.30 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (80). La actividad veratril alcohol oxidasa fue determinada por la oxidación de alcohol veratrilico (alcohol 3, 4-dimetoxibecílico) a veratraldehído en buffer de fosfato de sodio 100 mM, pH 6.0 ($\epsilon_{310} = 9.30 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad manganeso peroxidasa (MnP) fue ensayada por la oxidación de MnSO_4 1mM en una solución de malonato de sodio 50 mM pH 4.5, y en presencia de H_2O_2 0.1 mM. Los iones mangánicos, Mn^{3+} , forman un complejo con el malonato el cual absorbe a los 270 nm ($\epsilon_{270} = 11.59 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (123). La actividad lignino peroxidasa fue determinada por la oxidación de alcohol veratrilico 4 mM veratraldehído en buffer de succinatos 20 mM pH 4.0, en presencia de H_2O_2 0.4 mM (117). Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 μmol de sustrato por minuto.

La concentración de proteína fue determinada por el ensayo para proteína de Bio-Rad, método de Bradford modificado.

La electroforesis SDS-poliacrilamida al 10%, se llevó a cabo por el método de Laemmli (56), usando lisozima (14.3 kDa), β -lactoalbumina (18.4 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), albumina de suero bovino (68 kDa), fosforilasa B (97.4 kDa) y miosina (cadena-H) (200 kDa) como marcador de peso molecular. La electroforesis no-denaturante se realizó por el método modificado de Laemmli (6).

Las constantes cinéticas de la laccasa fueron determinadas con ABTS y azul reactivo 158 (Azul Brillante Remazol R, RBBR) como sustratos. La actividad decolorativa de la laccasa se determinó por la diferencia de absorbancias a los 592 nm ($\epsilon_{592} = 6.17 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La reacción fue detenida después de un minuto con acetonitrilo al 75% (v/v). Las constantes cinéticas fueron determinadas por el método de dobles recíprocos de Linweaver-Burk.

4. RESULTADOS.

4.1 Metabolización *in vivo* de los colorantes.

4.1.1 En medio sólido.

Se analizó la actividad metabólica de tres hongos sobre una colección de colorantes de uso textil. Cada hongo fue cultivado en medio agarizado en presencia del colorante y se determinó su capacidad decolorativa por la presencia de un halo de decoloración alrededor del micelio.

En la tabla VII se muestran los resultados de los ensayos realizados en medio sólido con los 26 colorantes industriales y las cepas de *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Caldaromyces fumago*. Los colorantes se presentan con el nombre comercial de la empresa.

Caldaromyces fumago no presentó actividad decolorativa alguna. Después de quince días de incubación, *Phanerochaete chrysosporium* presentó un halo de decoloración en presencia de cinco colorantes. *Pleurotus ostreatus* mostró la mejor capacidad decolorativa después de doce días de incubación, con diez de los colorantes probados. En ambos casos el halo se presentó un par de días después de que el microorganismo había cubierto completamente la placa de agar.

La decoloración pudo haberse generado por enzimas producidas en etapa avanzada de crecimiento consumiendo al colorante como una fuente alternativa de carbono, por la producción de enzimas extracelulares o por una caída de pH en el medio de cultivo, aunque la mayoría de los colorantes presentaron una gran estabilidad a rangos amplios de pH. Las cajas preparadas con colorante sin la presencia del microorganismo no sufrieron decoloración alguna.

Tabla VII. Decoloración en medio sólido.

Colorante	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Caldaromyces fumago</i>
BASF			
Azul brillante Acidol M-5G	+	nd	nd
Azul Disperso R	+	+	nd
Azul Indanthren BC	+	+	nd
Azul Marino Disperso LGG ^T	-	-	-
Azul Reactivo F-RL	+	nd	nd
Azul Reactivo E-3R	+	nd	nd
Amarillo Disperso 3GE	+	nd	nd
Amarillo Indanthren 5GE	+	nd	nd
Amarillo Reactivo E-2R	nd	nd	nd
Amarillo Reactivo FGRL	nd	nd	nd
Café amarillo Palanil RM	nd	nd	nd
Negro Acido M-RG	+	+	nd
Negro al Azúfre CD	+	+	nd
Negro Directo BF ^T	-	-	-
Rojo Disperso BF ^T	-	-	-
Rojo Indanthren FBB	+	nd	nd
Rojo Palamil LG	nd	nd	nd
Rojo Reactivo F-2RL	nd	nd	nd
Rojo Reactivo E7B	nd	nd	nd
COLORFRAN, S. A.			
Amarillo Orisol 4JLZ	nd	nd	nd
Azul Orisol B. H.	+	+	nd
Escarlata Orisol 4BS	nd	nd	nd
Naranja Orisol S.	nd	nd	nd
Negro Orisol 2. V. ^T	-	-	-
Turquesa Orisol J. L.	+	nd	nd
Verde Orisol B. ^T	-	-	-

+ Decoloración positiva.

nd. Decoloración no detectada.

T. Colorantes termolábiles no probados *in vivo*.

4.1.2 En fermentación líquida.

Elegida como la mejor cepa decoloradora, *Pleurotus ostreatus* fue llevada a fermentaciones líquidas en donde se determinó la velocidad de desaparición promedio a los ocho días de fermentación para cada colorante. El resultado es mostrado en la tabla VIII. Se observó la desaparición casi total del color para la mayoría de los colorantes al cabo de ocho días, y es recuperado el color café-amarillo original del medio de cultivo. Se monitoreó constantemente el pH del medio. Hubo un incremento de 6.00 a 6.80 en el pH hacia el final de la fermentación. *Pleurotus ostreatus* tiende a incrementar el pH de 5.5 a 8.0 cuando es cultivado en agua destilada (37).

Fueron decolorados los mismos colorantes que en medio sólido.

Tabla VIII. Decoloración en fermentación líquida *P. ostreatus*.

Colorante	λ (nm)	Concentración inicial (μ g/ml)	Velocidad de desaparición promedio (μ g ml ⁻¹ día ⁻¹)	% decoloración
BASF				
Azul Brillante Acido M-5G	614	10	1.25	100
Azul Disperso R	600	20	2.50	82
Azul Indanthren BC	608	10	1.16	82
Azul Reactivo E-3R	628	10	1.11	81
Azul Reactivo F-RL	614	10	1.06	89
Amarillo Disperso 3GE	437	40	5	100
Amarillo Indanthren 5GE	479	40	1.70	26
Negro Acido M-RG	572	20	1.90	81
Negro al Azúfre	625	20	2.50	100
Rojo Indanthren FBB	525	40	4.70	71
COLORFRAN, S.A.				
Azul Orisol B. H.	560	20	2.50	100
Turquesa Orisol J. L.	614	10	1.00	80

El primer día de fermentación el micelio se tiñe por completo y la disminución de la absorbancia en el sobrenadante corresponde a un 50% respecto a la concentración inicial. La mayor parte quedó absorbida en el micelio, aunque seguramente también existió degradación del colorante. La tinción en el hongo desaparece por completo en el transcurso de la fermentación junto con el remanente que se encuentra en el sobrenadante.

Para el caso de los compuestos decolorados al 100%, los espectros mostraron una atenuación total del pico de máxima absorción, hasta alcanzar una línea recta. En el caso de los colorantes Amarillo Indanthren 5GE y el Rojo Indanthren FBB, la fermentación se llevó hasta los quince días. El color en el sobrenadante disminuyó hasta un 80% en ambos casos, sin embargo el centro del micelio siempre permaneció teñido. La metabolización de estos colorantes se presenta mas lenta debido a que estamos tratando con una diversidad de estructuras químicas y las rutas de metabolización así como los sistemas enzimáticos de degradación para cada una de ellas pudiera ser diferente.

4.2 Ensayos *in vitro*.

4.2.1 Fluido extracelular de la fermentación líquida de *P. ostreatus*.

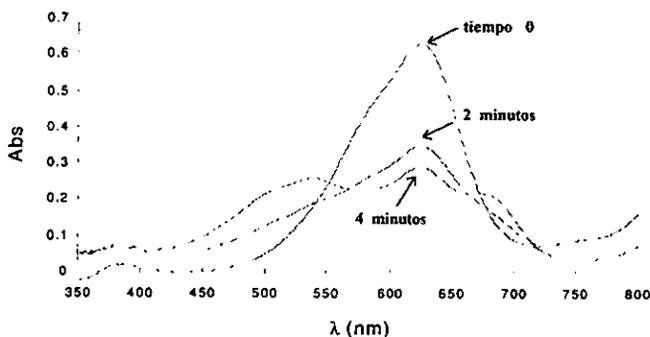
Se especulaba que la mayor actividad decolorativa se encontraba en el sobrenadante ya que la mayoría de las enzimas ligninolíticas son extracelulares, aunque en cierta etapa del crecimiento solamente se encuentran asociadas al micelio.

Los colorantes decolorados *in vivo* fueron ensayados *in vitro* con el fluido extracelular concentrado de la fermentación líquida, en ausencia y en presencia de peróxido de hidrógeno. Únicamente el rojo y los amarillos no presentaron decoloración ni modificación en sus espectros de absorbancia. Los otros colorantes mostraron mejor decoloración en ausencia de H₂O₂, excepto el Azul Reactivo F-RL mejor conocido como Azul Brillante Ramazol R (RBBR) que, al contrario de los demás, presentó una mayor velocidad de decoloración en presencia de peróxido. Ya se ha reportado que éste colorante es oxidado por una peroxidasa extracelular producida por *Pleurotus ostreatus* (122).

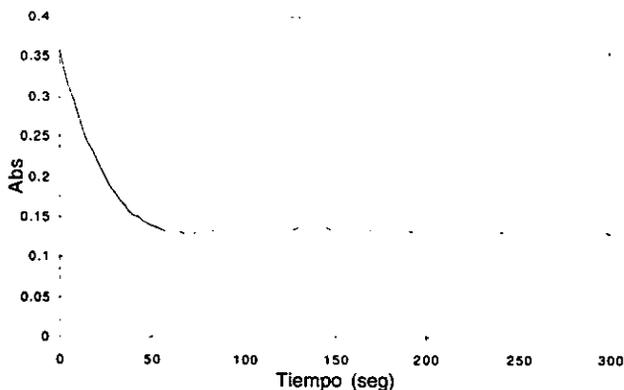
Las velocidades máximas de decoloración se determinaron en los primeros segundos de reacción, las cuales resultaron en general muy bajas. El Azul Disperso R, Azul Indanthren BC, Negro al azúfre y Azul Orisol, alcanzaron menos del 10% de decoloración en los primeros segundos de reacción. Después de ser incubados 24 h con la enzima, no sufre prácticamente ningún cambio de absorbancia. Los espectros mostraron una mínima atenuación del pico de máxima absorción. Para los colorantes Turquesa Orisol, Azul Brillante AcidoI M-5G y Negro ácido, las velocidades iniciales fueron un poco más altas, pero alrededor del 90% del color desapareció hasta las 24 h de incubación con la enzima. En los espectros se observó una considerable disminución de los picos de máxima absorción, pero sin tender a una línea recta, como se presenta en la decoloración *in vivo*.

El Azul Reactivo E-3R fue el que presentó una modificación enzimática mucho más rápida, razón por la cual se ha utilizado para ejemplificar las reacciones de decoloración. En la gráfica I se muestra la modificación en su espectro de absorbancia. Es evidente que el compuesto está sufriendo una modificación química. El producto de reacción es un compuesto de tono púrpura visiblemente menos colorido. Aunque el espectro de absorción sea capaz de detectar un incremento de absorbancia en otras longitudes de onda, no implica

que este aumento sea visible. Lo que se está determinando es que realmente existe una modificación química y que el producto de la modificación es visiblemente menos colorido. En la gráfica II se puede apreciar la desaparición del colorante y la generación del producto que se presenta constante después de cinco minutos de reacción.



Gráfica I. Espectro de decoloración *in vitro* del colorante Azul Reactivo E-3R al tiempo cero y después de agregar el fluido extracelular concentrado de la fermentación líquida, en ausencia de peróxido de hidrógeno.



Gráfica II. Cambio de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción del colorante Azul Reactivo E-3R incubado durante cinco minutos con el fluido extracelular concentrado de la fermentación líquida.

Para comprobar que la modificación se llevó a cabo por actividad enzimática y no por efectos físicos como precipitación o inestabilidad al pH, en la tabla IX se presentan los resultados de los ensayos con diferentes cantidades de extracto y utilizando como control una muestra del extracto desnaturalizado sometido a ebullición. La velocidad de decoloración se incrementa de forma proporcional a la cantidad de extracto aplicada. El control no tuvo actividad decolorativa alguna. Con esto se comprobó que la decoloración es realizada, por lo menos en parte, por actividad enzimática independiente de peróxido de hidrógeno.

Tabla IX. Actividad decolorativa Azul Reactivo E-3R en el sobrenadante fermentación líquida.

Extracto crudo (μl)	Actividad en volumen de reacción ($\Delta A \text{ min}^{-1}$)	Actividad volumétrica ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$)
25	0.065	1.293
50	0.125	1.253
100	0.263	1.316
control*	0.000	0.00

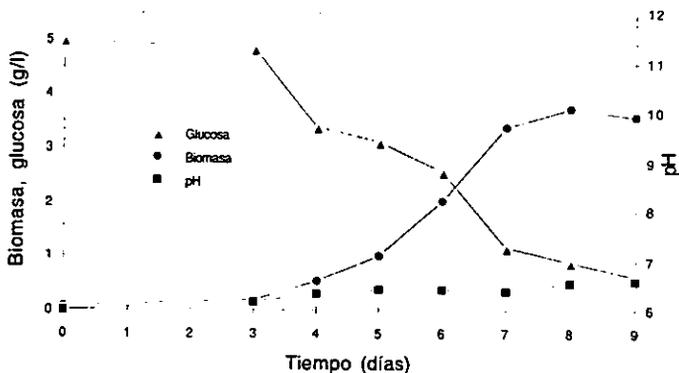
* Extracto hervido.

Al cabo de un determinado número de resiembras, se observó una dramática disminución de la actividad decolorativa en el sobrenadante. La actividad desapareció para todos los colorantes, excepto para el Azul Reactivo E-3R.

Con el fin de identificar el origen y la etapa de generación de la máxima actividad decolorativa, se realizó el monitoreo de la actividad presente en los extractos intracelulares y el fluido extracelular del microorganismo a lo largo del crecimiento bajo condiciones óptimas. Estas condiciones fueron establecidas previamente para la producción de biomasa (37).

4.2.2 Actividades decolorativas vs. crecimiento de *P. ostreatus*.

En la gráfica III se muestran los resultados de la cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* IE8. Se alcanza la etapa estacionaria a los ocho días de fermentación. con un pH de 6.8.

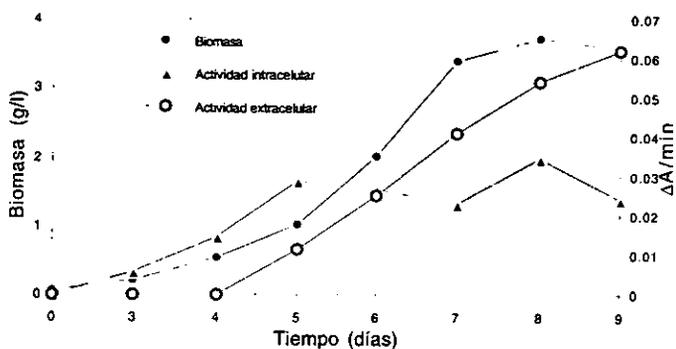


Gráfica III. Cinética de crecimiento de *P. ostreatus* en solución amortiguadora pH 6.0 en matraces de 250 ml, a 28°C y una agitación de 200 rpm.

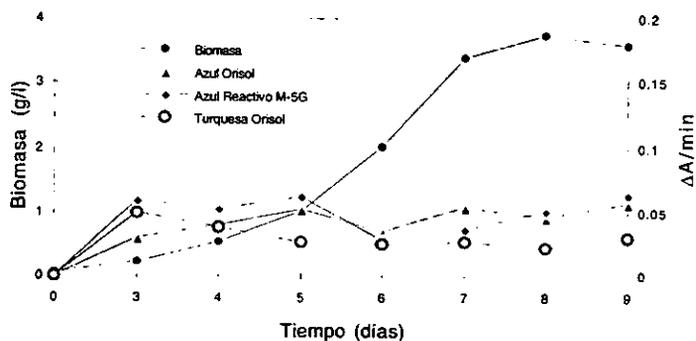
En la gráfica IV se compara el crecimiento con la actividad decolorativa, obtenida del extracto intracelular y del fluido extracelular, para el colorante Azul Reactivo E-3R. La actividad intracelular es la única presente durante los primeros días. Sin embargo, cuando se va manifestando actividad extracelular, la actividad intracelular permanece relativamente constante.

No se detectó la menor actividad extracelular con otro colorante, además del Azul Reactivo E-3R.

En la gráfica V se presentan las actividades intracelulares logradas con otros tres colorantes. No se encontró relación con el crecimiento, la tendencia es constante y la velocidad de decoloración es muy baja.



Gráfica IV. Crecimiento de *P. ostreatus* vs. actividad decolorativa para el Azul Reactivo E-3R obtenida de los extractos celulares de la fermentación líquida.



Gráfica V. Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* vs. actividad decolorativa de los extractos intracelulares.

4.3 Inducción de enzimas ligninolíticas.

Se especuló que la actividad decolorativa podría ser manifestada por la presencia de algún agente estresante. Se probó la fermentación en medio líquido en presencia de alcohol

(2%), tolueno (4%), catecol (0.1 mM) y del mismo colorante, Azul Reactivo E-3R. El catecol fue completamente oxidado después de ocho días de fermentación. El producto, un polímero café-rojizo, oscureció por completo el medio de cultivo. Efecto debido seguramente a la acción de las peroxidasas u oxidasas extracelulares generadas por el hongo. El colorante desapareció antes de los ocho días, pero el sobrenadante concentrado al final de la fermentación no presentó ninguna actividad decolorativa. Lo mismo sucedió con el alcohol y el tolueno.

Se decidió utilizar la cepa original de *P. ostreatus* IE8 en la misma fermentación líquida, y en fermentación en estado sólido en presencia de material lignocelulósico para inducir la producción de enzimas ligninolíticas.

En la tabla X se presenta el resultado de la actividad obtenida con cinco colorantes en diferentes medios. Con las fermentaciones en estado sólido se obtuvieron actividades específicas y totales diez veces más altas que la fermentación en medio líquido. La avena y el trigo tuvieron actividades totales semejantes, pero con la avena se consiguió una actividad específica más alta. En la tabla XI se muestran los resultados de las actividades ligninolíticas identificadas en los mismos medios de cultivo. La actividad presente en los tres diferentes medios fue la actividad laccasa.

Tabla X. Determinación de actividades decolorativas de *P. ostreatus* en diferentes medios de cultivo.

Colorantes	Trigo (20 días)		Avena (20 días)		Líquido (8 días)	
	Actividades		Actividades		Actividades	
	Total ($\Delta A \text{ min}^{-1}$)	Específica ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)	Total ($\Delta A \text{ min}^{-1}$)	Específica ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)	Total ($\Delta A \text{ min}^{-1}$)	Específica ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$)
Azul Reactivo E-3R	2244	96.46	2418	148.80	102	11.43
Azul Reactivo M-5G	654	28.11	684	41.98	32	3.53
Azul Orisol	206	9.80	222	13.55	26	2.07
Turquesa Orisol	535	23.73	576	35.82	25	3.01
Negro ácido	78	3.35	126	7.64	94	4.07

Tabla XI. Identificación de actividades enzimáticas de *P. ostreatus* en diferentes medios de cultivo.

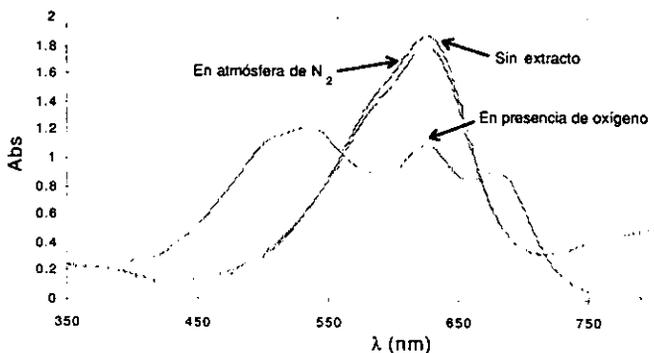
Ensayo enzimático	Trigo (20 días)		Avena (20 días)		Líquido (8 días)	
	Total (U)	Específica (U/mg)	Total (U)	Específica (U/mg)	Total (U)	Específica (U/mg)
Laccasa	154	6.62	186	11.32	26	0.95
Mn-peroxidasa	27.80	0.52	17.80	1.08	nd	nd
VAO	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ligninasa	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd. No detectado.

4.4 Caracterización del extracto crudo de *Pleurotus ostreatus*.

4.4.1 Dependencia de oxígeno.

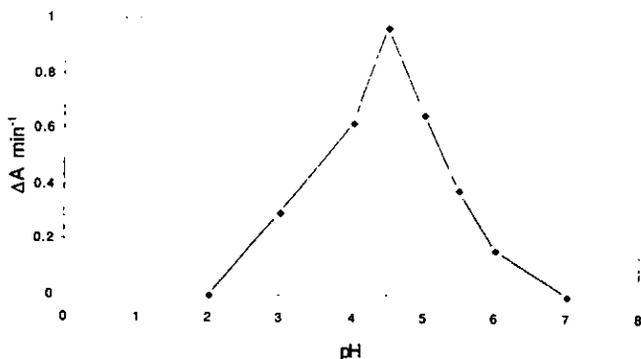
Para determinar si la capacidad decolorativa independiente de peróxido de hidrógeno pudiese ser llevada a cabo por una oxigenasa, como la laccasa, con los extractos de avena y el colorante Azul Reactivo E-3R se realizaron ensayos de decoloración en atmósfera de nitrógeno, y en presencia de oxígeno por la inyección de aire. Cuando la reacción se lleva a cabo en atmósfera de nitrógeno, el colorante sufre una mínima modificación. Sin embargo cuando el medio de reacción es saturado con aire, la decoloración se lleva hasta un 50 % de su absorbancia original.



Gráfica VI. Modificación del colorante Azul Reactivo E-3R con extracto crudo de *P. ostreatus* en atmósfera de nitrógeno y en presencia de oxígeno.

4.4.2 pH óptimo de reacción.

En la gráfica VII se muestra el resultado de los ensayos de decoloración realizados a diferentes pH's con el colorante Azul Reactivo E-3R y los extractos de avena. El pH correspondiente a la mayor velocidad decolorativa, pH 4.5, corresponde al óptimo de reacción para la laccasa con diferentes sustratos como el ABTS (80).



Gráfica VII. pH óptimo de decoloración con el extracto crudo de *P. ostreatus* y el colorante Azul Reactivo E-3R.

4.5 Caracterización enzimática de extractos extracelulares de hongos ligninolíticos.

Para comparar la capacidad decolorativa de *Pleurotus ostratus* IE8 cultivado por fermentación en estado sólido, quince cepas más de diferentes variedades y especies fueron cultivadas bajo las mismas condiciones.

En la tabla XII se muestra la actividad decolorativa generada por unidad de volumen de las quince cepas. Las especies que presentaron actividad decolorativa con todos los colorantes probados fueron *Pleurotus* y *Trametes*. *Bejerkandera adusta* 7308 mostró actividad sólo con tres colorantes. En todos los casos de decoloración, el Azul Reactivo E-3R fue el que presentó la decoloración mas alta, indicando con esto que la misma enzima podría estar presente en estas especies. Cabe señalar que los géneros de *Pleurotus*, *Trametes* y *Bejerkandera* son muy cercanos en el árbol filogenético. *Phanerochaete chrysosporium* y *Sporotichum pulverulentum*, especies también muy cercanas, no presentaron actividad alguna.

Pleurotus ostratus IE8 y *Trametes hispida* 8260 tuvieron los valores mas altos de decoloración para todos los colorantes probados.

Tabla XII. Mínimas y máximas actividades decolorativas encontradas en cultivos de fermentación sólida en avena integral a los 20 días de fermentación.

Actividades volumétricas ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$)						
Organismo	UAMH	Azul reactivo E-3R	Azul brillante acd. M-5G	Azul orisol	Turquesa orisol	Negro ácido
<i>B. adusta</i>	4312	nd	nd	nd	nd	nd
<i>B. adusta</i>	8258	nd	nd	nd	nd	nd
<i>B. adusta</i>	7308	1-1.8	0.5-0.6	nd	0.2-0.75	nd
<i>P. ostreatus</i>	IE8	1.06-9.5	1.16-2.5	0.65-0.9	1.2-2.3	0.13-0.50
<i>P. ostreatus</i>	7964	1-2	0.4-0.6	nd	0.6-1	nd
<i>P. ostreatus</i>	7980	8	1-1.4	0-0.4	2-3	0-0.1
<i>P. ostreatus</i>	7972	1-3	0.15-0.5	0-0.2	0.4-0.5	0-0.15
<i>P. ostreatus</i>	7988	4-10	1.5-3.6	0.2-0.6	1.6-6	0-0.4
<i>P. ostreatus</i>	7989	4-7	1.1-2	0.2-0.3	1-2.6	0-0.45
<i>P. pulmonarius</i>	7992	1.6-2	0.06-0.6	0-0.25	0-0.8	0-0.03
<i>P. chrysosp</i>	3541	nd	nd	nd	nd	nd
<i>P. chrysosp</i>	3642	nd	nd	nd	nd	nd
<i>P. chrysosp</i>	ATCC	nd	nd	nd	nd	nd
<i>S. pulverul</i>	4521	nd	nd	nd	nd	nd
<i>T. hispida</i>	8260	14-15	2.6-13	0.24-0.8	0.2-3	0.4-0.7
<i>T. versicolor</i>	8272	2.2-3.5	0.4-1	0.4-0.8	0.5-0.9	0-0.8

UAMH. Universidad de Alberta Mold Herbarium.
nd. No detectado.

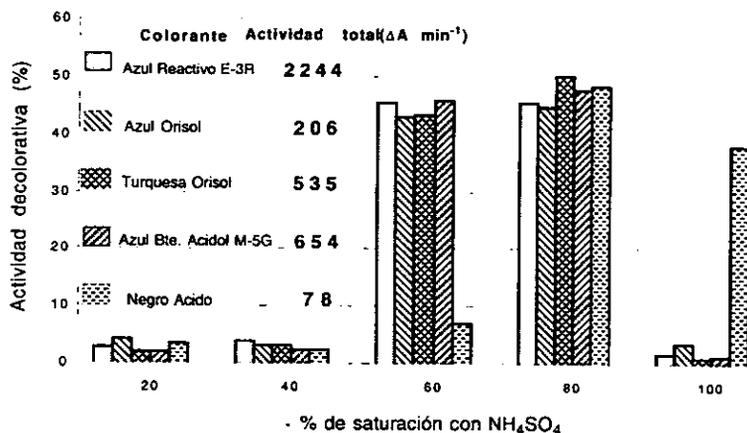
En la tabla XIII estan los resultados de las actividades ligninolíticas generadas por unidad de volumen en los extractos fúngicos. Es notable que todas aquellas cepas que presentaron actividad decolorativa, también presentan actividad laccasa. Aunque *Bjerkandera adusta* 8258 la cual tiene una apreciable concentración de enzima, no presenta actividad decolorativa. Las mayores actividades volumétricas de laccasa fueron obtenidas de *Pleurotus ostratus* IE8 y *Trametes hispida* 8260. Las especies que presentaron actividad Mn-peroxidasa, tuvieron valores relativamente cercanos exepcto *Bjerkandera adusta* 8258, la cual presentó la mayor actividad volumétrica. La veratril alcohol oxidasa estuvo presente unicamente en tres especies, y la lignino peroxidasa en ninguna de ellas.

FALTA PAGINA

No. 43

4.6 Purificación de laccasas de *Pleurotus ostreatus*.

Como un primer paso de purificación, se tomaron los extractos de fermentación en estado sólido en avena de *Pleurotus ostreatus* IE8 y se realizó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. En la tabla XIV se muestra el resultado de la actividad decolorativa encontrada en las diferentes fracciones precipitadas. La mayor parte de la actividad permaneció entre el 60 y 80% de saturación de sulfato de amonio. Para el Negro ácido la actividad se distribuyó entre el 80 y 100% de las fracciones precipitadas. En la gráfica IX se muestra la distribución de las actividades de los diferentes colorantes.



Gráfica IX. Distribución de actividad decolorativa remanente en fracciones precipitadas con NH_4SO_4 .

Las enzimas extracelulares generadas por los hongos ligninolíticos son, en su mayoría, enzimas glicosiladas. Son más hidrofílicas y tienen una mayor capacidad de solubilización por lo que es más difícil el desplazamiento por el sulfato de amonio y por ello precipitan en un rango amplio de saturación. En ensayos posteriores este comportamiento fue constante. En la tabla XV se presentan los promedios de seis ensayos independientes en los que el comportamiento de los colorantes fue constante. Cuatro de ellos presentan entre el 70 y 90%

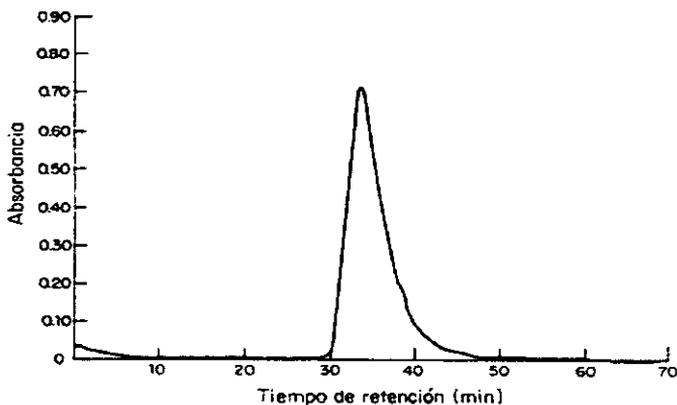
de la actividad total remanente en la fracción precipitada entre 40-80% de saturación con sulfato de amonio. Para el colorante Negro ácido la actividad queda distribuida proporcionalmente entre el 40 y 100% de saturación. De acuerdo a los primeros ensayos (gráfica VII), suponemos que la actividad para el Negro ácido permanece por arriba del 60%, y que por lo tanto se trata de una enzima diferente. También se observa que la actividad laccasa tiene un porcentaje de actividad remanente por arriba del 70% en la fracción precipitada entre 40-80% de saturación. En el proceso de precipitación se observa además una pérdida alrededor del 50% de la actividad total decolorativa y actividad total laccasa.

Tabla XV. Actividad remanente (%) en fracciones precipitadas del extracto en fermentación sólida.

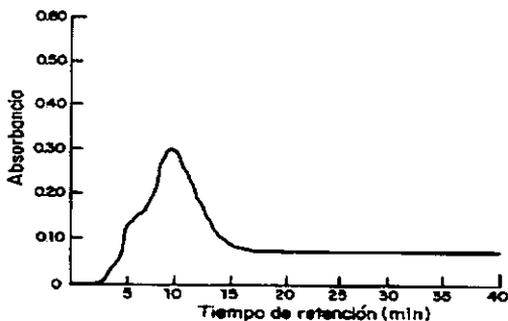
Colorante	Actividad Total ($\Delta A \text{ min}^{-1}$)	Actividad Total Remanente ($\Delta A \text{ min}^{-1}$)	Saturación NH_4SO_4		
			< 40%	40 - 80 %	> 80%
Azul reactivo E-3R	2559	1591	5	74	21
Azul bte. acidol M-5G	534	251	2	91	7
Turquesa orisol	572	261	1	91	9
Azul orisol	378	103	1	87	12
Negro ácido	259	178	-	42	58
Laccasa	434 U	231 U	5	78	17

La fracción precipitada que presentó la mayor actividad decolorativa fue aplicada en diferentes columnas de cromatografía. En las gráficas X-XII se muestra el resultado de la aplicación a tres diferentes columnas. En la columna de Sephadex G-100 hubo un tiempo de retención de aproximado de media hora en la que se eluyó en un solo pico practicamente toda la muestra inyectada. Este efecto es atribuible a la consistencia viscosa del precipitado debida a la alta concentración de exopolisacáridos producidos por el hongo. Este método se consideró inadecuado. La columna de interacción hidrofóbica, fenil-sepharosa, no tuvo mayor efecto de separación. Lo mismo sucedió con la columna de intercambio catiónico, CM-sepharosa, en donde la actividad se distribuyó proporcionalmente a lo largo de un pico considerablemente ancho. En la gráfica XIII se muestra el mejor resultado de separación que se obtuvo en una columna de intercambio aniónico de interacción fuerte Econo Q (Bio Rad). Se identificaron dos diferentes actividades laccasa. El primer pico eluido con actividad laccasa, denominada laccasa I, aparece en los primeros cinco minutos de inyección de la

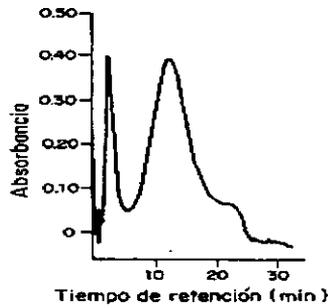
muestra, antes de iniciar el gradiente con NaCl. No tuvo ninguna retención en la columna. El segundo pico con actividad laccasa, llamada laccasa II, eluyó al final del gradiente de NaCl, a la concentración mas alta de sal. Es considerablemente más electronegativa que la primera enzima eluida.



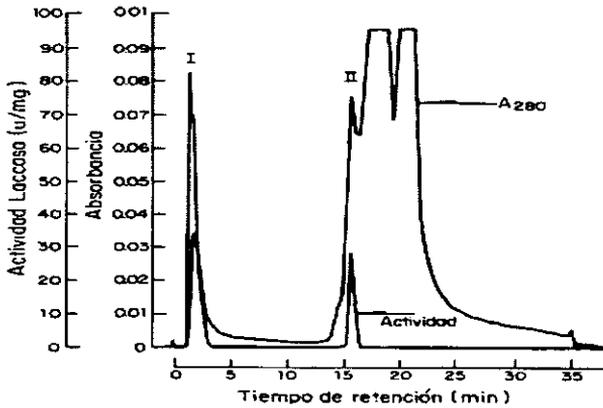
Gráfica X. Cromatografía de permeación en gel. Sephadex G-100.



Gráfica XI. Cromatografía de interacción hidrofóbica. Fenil-sepharosa.



Gráfica XII. Cromatografía de intercambio catiónico. CM-sepharosa.



Gráfica XII. Cromatografía de intercambio aniónico de interacción fuerte. Econo Pac Q™ (Bio Rad). Lac I y LacII vs. actividad específica.

En la figura 15 se muestran los pasos de purificación de la laccasa a través de una electroforesis denaturante. De acuerdo al peso molecular reportado para la laccasa de *Pleurotus* (80, 81, 126) que se encuentra entre los 61 y 65 kDa, la laccasa parcialmente purificada es, presumiblemente, la banda que se encuentra señalada.

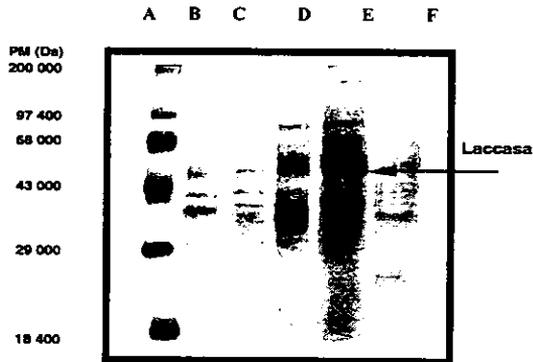


Figura 15. Electroforesis denaturante (SDS-PAGE 10%).

- A. Marcadores de peso molecular.
- B. 1er. pico eluido con actividad laccasa. Econo Pac Q™.
- C. 2o. pico eluido con actividad laccasa. Econo Pac Q™.
- D. Fracción precipitada. 40-80% NH_4SO_4 .
- E. Extracto crudo concentrado.
- F. Extracto crudo.

En la tabla XVI se presentan los resultados de las etapas de purificación. La cantidad total de proteína obtenida al final del ensayo para la laccasa II es tres veces mas alta que la laccasa I, sin embargo, ambas tienen actividades específicas semejantes. Se recuperó menos del 1% de la actividad de la laccasa I y un poco mas del 2% de la laccasa II. Aparentemente el paso através de la columna de intercambio aniónico representa una etapa muy agresiva para la enzima. El factor de purificación tampoco es significativo. Menos de diez veces la cantidad de enzima original.

Tabla XVI. Purificación de Laccasa *P. ostreatus*.

Procedimiento	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Recuperación (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	500	1.5 ± 0.52	0.037 ± 0.06	758 ± 265	4.5 ± 2.12	100	1
Ultrafiltración (amicon 30 YM)	50	9.4 ± 3.9	1.03 ± 0.27	500 ± 188	9 ± 1.4	66	2
Precipitación (NH ₄ SO ₄)	10	27 ± 2.17	1.84 ± 0.45	231 ± 21	15.5 ± 4.9	30	3.4
Cromatografía (Econo -Pac Q)							
Lac I	1	6 ± 0.54	0.179 ± 0.016	6 ± 0.54	34 ± 3.0	0.79	7.5
Lac II	1.5	12 ± 1.20	0.447 ± 0.034	18 ± 0.77	28 ± 2.1	2.30	6.2

4.7 Purificación de laccasa de *Trametes hispida*.

Los primeros pasos de purificación de la laccasa de *T. hispida* fueron llevados a cabo por el Dr. Michael Pickard. En la figura 16 se muestra el resultado de la purificación de la laccasa a través de una electroforesis denaturante. Es evidente la cantidad tan significativa de laccasa producida por *T. hispida* con respecto a las demás enzimas extracelulares. De ahí el éxito de purificación. A partir de este experimento se determinó el peso molecular de la laccasa alrededor de los 68 kDa.

En la tabla XVII se muestra el resultado de los pasos de la purificación. Como en el caso de *P. ostreatus*, el último paso representó una pérdida considerable de la actividad total de la enzima. El factor de purificación en los primeras etapas tampoco representó una cifra significativa debido a la alta concentración de laccasa con respecto a las demás proteínas extracelulares. Sin embargo, se obtuvo cantidad suficiente y una buena actividad para realizar la caracterización cinética de ambas enzimas.

En la gráfica XIV se presenta el último paso de purificación. También se encontraron dos picos con actividad laccasa, con tiempos de elución semejantes a los presentados por *P. ostratus*.

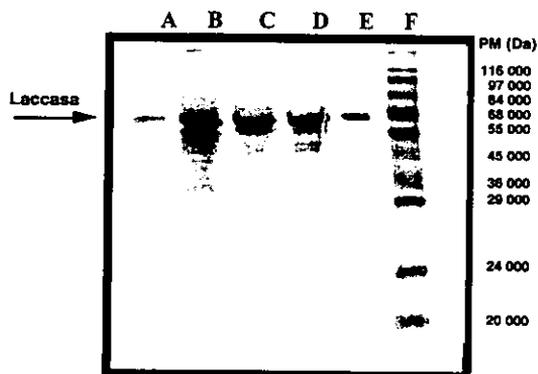


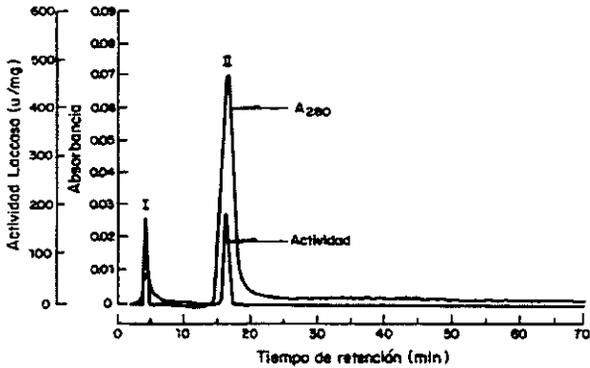
Figura 16. Pasos de purificación de la laccasa de *T. hispida* (SDS-PAGE 10%)

- A. Extracto crudo.
- B. Extracto crudo concentrado.
- C. 1a. cromatografía en DEAE-celulosa.
- D. Permeación en Sephadex G-100.
- E. 2a. cromatografía en DEAE-celulosa.
- F. Marcadores de peso molecular.

Tabla XVII. Purificación de laccasa de *T. hispida*.

Procedimiento	Volumen ml	Actividad Vol. U/ml	Proteína mg/ml	Actividad Total U	Proteína total mg	Recuperación %	Factor de purificación	Actividad Esp. U/mg
Extracto crudo	1800	2.85	0.177	5145	318	100	1.00	16.2
Ultrafiltración (amión 10 PM)	264	16.8	1.135	4446	300	86	0.91	14.8
DE-52 1a.	7.3	580	31.9	4235	233	82	1.12	18.2
Sephadex G-100	3.5	1187	26.6	4154	93	811	2.75	44.6
DE-52 2a.	9.6	211.6	4.8 (1.2)*	2031	46.1 (11.5)*	39.5	2.72	44.1
Econo- Pac Q								
Lac I	1	18	0.10	18	0.10	0.35	10.37	168
Lac II	1.5	41	0.24	61	0.36	1.19	10.50	170

*. Análisis de proteína A₂₈₀.



Gráfica XIV. Cromatografía de intercambio aniónico de interacción fuerte. Econo Pac (Bio Rad). Lac I y Lac II vs. actividad específica.

En la figura 17 se muestra el último paso de purificación a través de un gel de electroforesis no denaturante. Sucede que la laccasa II es considerablemente más abundante que la laccasa I, y la laccasa I podría estar perdiendo o ganando cargas superficiales después de pasar a través de la columna de intercambio aniónico ya que la velocidad de migración varía después de esta etapa.

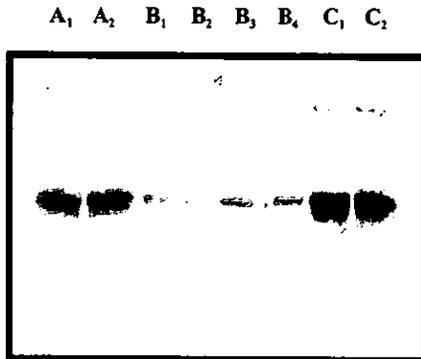
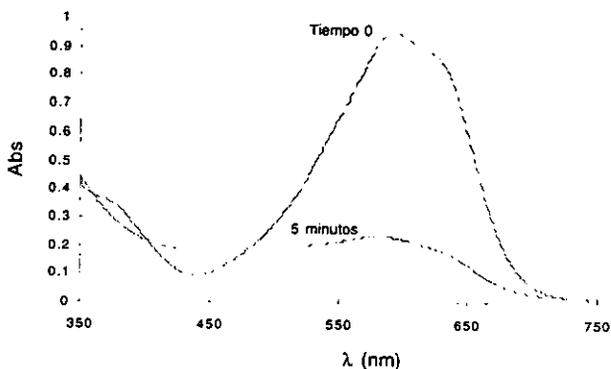


Figura 17. Último paso de purificación de la laccasa de *T. hispida* (ND-PAGE 10%).

- A. Pico de elución 2, actividad laccasa II. Cromatografía en Econo Pac-Q™.
- B. Pico de elución 1, actividad laccasa I. Cromatografía en Econo Pac-Q™.
- C. Laccasa parcialmente purificada. DEAE-celulosa anterior a Econo Pac-Q™.

La laccasa de *Trametes hispida* presentó actividad decolorativa con once colorantes incluyendo los cinco que decoloró originalmente el extracto crudo de *Pleurotus ostreatus*. El Azul Reactivo F-RL (BASF), mejor conocido como Azul Brillante Remazol R presentó una decoloración absoluta como se muestra en la gráfica XV. Este colorante es derivado de una antraquinona (Fig.18), y fue utilizado como modelo para la caracterización de la enzima.



Gráfica XV. Decoloración del Azul Brillante Remazol R (RBBR) por la laccasa de *T. hispida*.

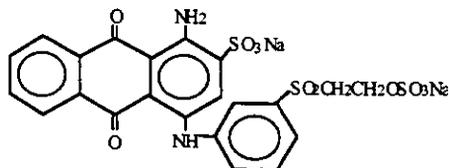
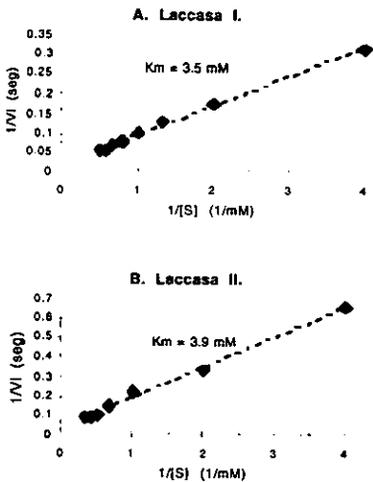


Fig. 15. Azul Reactivo F-RL (BASF); C. I. Azul reactivo 19; Azul Brillante Remazol R.

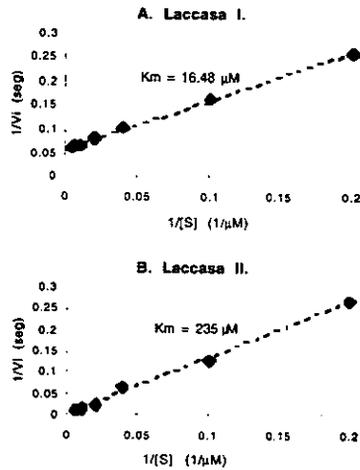
4.8 Caracterización cinética de la laccasa.

En las gráficas XVI-A y XVI-B se presenta el resultado de la linealización, por el método de Lineweaver-Burk, de la cinética de la laccasa I y II con el colorante RBBR. Ambas siguen el modelo de Michaelis-Menten y presentan afinidades semejantes. En las gráficas XVII-A y XVII-B se presenta el resultado de la linealización de la cinética de oxidación del ABTS para ambas isoenzimas. También siguen un comportamiento michaeliano, sin embargo presentan afinidades totalmente diferentes. En la tabla XVIII se encuentran los resultados de las constantes cinéticas.

La laccasa II presenta una k_{cat} para la oxidación del ABTS diez veces mas alta que la laccasa I. Sin embargo el valor de afinidad, K_m , para esta isoenzima también es significativamente mas alto, resultando mínima la diferencia entre los valores de eficiencia catalítica para ambas enzimas. Para la decoloración de RBBR, la laccasa I y II presentan afinidades practicamente iguales, aunque la laccasa II es relativamente mas eficiente. En general, el ABTS resulta mejor sustrato para la enzima que el colorante.



Gráfica XVI. Método de Lineweaver-Burk en la decoloración de RBBR por laccasa de *T. hispida*.



Gráfica XVII. Método de Lineweaver-Burk en la oxidación de ABTS por laccasa de *T. hispida*.

Tabla XVIII. Constantes cinéticas de la laccasa de *T. hispida*.

CONSTANTES	LACCASA I		LACCASA II	
	ABTS	RBBR	ABTS	RBBR
Act. Esp. (U/mg)	168		170	
K _m (μM)	16.48	3500	235	3900
V _{máx} (μM seg ⁻¹)	0.255	0.727	6.375	0.900
k _{cat} (seg ⁻¹)	16.26	46.30	178.57	25.25
k _{cat} /K _m (seg ⁻¹ μM ⁻¹)	0.986	13.39	0.759	6.42

5. DISCUSION.

Pleurotus ostreatus IE8 fue elegido como el mejor candidato al estudio de decoloración debido a su amplia capacidad decolorativa en cultivo sólido con respecto a las demás cepas fúngicas probadas, como se muestra en la tabla VI. Los mismos colorantes decolorados en cultivo agarizado fueron decolorados en fermentación líquida, como aparece en la tabla VII. Esto hace suponer que las enzimas responsables de llevar a cabo la decoloración *in vivo* son producidas en dos diferentes condiciones de cultivo. La velocidad de desaparición del color durante la fermentación líquida para algunos de los colorantes es notablemente diferente con respecto a otros. Este comportamiento es comprensible si tomamos en cuenta que se esta experimentando con una diversidad de estructuras químicas y la ruta de metabolización para cada uno de ellos pudiera ser diferente. Hasta ahora han sido propuestos, de manera muy semejante, los mecanismos de oxidación de colorantes sulfo azo-fenólicos por la lignino peroxidasa de *P. chrysosporium* (24) y por la laccasa de *P. oryzae* (23), cuyos productos finales de degradación son una quinona y un sulfofenilhidroperóxido. El mecanismo de reducción de compuestos azo por el citocromo P-450 parcialmente purificado de hígado de rata también ha sido propuesto (57).

Con *Phanerochaete chrysosporium* se logró un menor espectro de decoloración. Sin embargo, a pesar de no haber sido cultivado tradicionalmente bajo condiciones de limitación de nitrógeno (14, 21, 92, 103) lo cual inicia la fase de producción de las conocidas ligninasas capaces de oxidar compuestos azo (33, 51), si presentó una decoloración total en cultivo agarizado con 5 de los 27 colorantes probados (tabla VI). Las tres cepas fueron cultivadas en medio de conservación rico en fuente de carbono y de nitrógeno. Se esperaba una mejor respuesta de *Caldaromyces fumago* debido a que, a pesar de no ser un hongo de pudrición blanca, produce peroxidasas extracelulares como la cloroperoxidasa, una enzima muy versátil capaz de llevar a cabo catálisis de alogenación, deshidratación, demetilación y reacciones de inserción de oxígeno, además de reconocer una amplia variedad de compuestos aromáticos (36, 46, 59, 115).

El sobrenadante concentrado de la fermentación líquida de *P. ostreatus* mostró un excelente resultado al ser puesto en contacto con el colorante. Como se muestra en la gráfica I, es evidente que el compuesto está sufriendo una modificación química. Aunque el pico correspondiente a la longitud de onda de máxima absorción presumiblemente el grupo cromóforo (129) no presenta ningún desplazamiento, es posible que el colorante sea atacado en los grupos periféricos, ya que el producto de reacción es un compuesto colorido de mucha menor absorbancia que permanece sin modificación alguna como se muestra en la gráfica II. Para la producción de nuevos colorantes sintéticos es común que se realicen modificaciones químicas a los grupos funcionales periféricos del grupo cromóforo para generar colorantes de nuevos tonos y/o con diferentes propiedades físico químicas (129).

Se demostró que el efecto de decoloración era debido a actividad enzimática, sometiendo la preparación cruda a ebullición y como se esperaba esta preparación no presentó actividad decolorativa. Además, el incremento de la velocidad de decoloración fue proporcional al incremento de la preparación cruda en el ensayo (tabla IX). Ambos experimentos nos muestran comportamiento típicamente enzimático.

La actividad decolorativa se vio dramáticamente reducida hasta desaparecer casi por completo. Se observó que al cabo de un determinado número de resiembras *P. ostreatus* perdía actividad biocatalítica. La única actividad conservada fue la decoloración del Azul Reactivo E-3R. A raíz de esto se decidió estudiar el comportamiento cinético de este microorganismo asociado a su actividad decolorativa y probar diferentes factores de inducción enzimática.

Pleurotus ostreatus IE8 fue cultivado en fermentación líquida bajo condiciones mínimas óptimas previamente establecidas (37). Para descartar que la decoloración o la inactivación de la actividad decolorativa pudiese ser efecto de los cambios en el pH, se decidió sustituir el agua destilada por una solución amortiguadora 60 mM de fosfato de sodio pH 6.0. Cuando la fermentación se lleva a cabo sin control de pH *P. ostreatus* tiende a alcalinizar considerablemente el medio de cultivo (37). Se alcanzó la fase estacionaria después de siete días de fermentación con solo un incremento de 0.8 unidades en el pH. El comportamiento

cinético de *P. ostreatus* no tuvo modificación alguna con lo regulación de pH con respecto al cultivo en agua destilada.

Para el Azul Reactivo E-3R, mostró una producción de actividad extracelular decolorativa asociada al crecimiento y no se encontró ninguna relación con la actividad decolorativa intracelular la cual fue significativamente menor a la actividad extracelular (gráfica IV). Para los colorantes Turquesa Orisol, Azul Orisol y Azul Reactivo M-5G solo hubo una baja actividad intracelular comparada a las anteriores (gráfica V). Con estos resultados se especuló que la actividad decolorativa pudiese ser de origen intracelular, realizada probablemente por un citocromo P-450 (124), o que era necesaria la presencia de un agente estresante para inducir la actividad, como en el caso de la actividad laccasa que es producida en presencia de 2,5 xilidina o de alcohol veratrílico (10, 123). En este caso se probaron el catecol, el tolueno, el etanol y el colorante Azul Reactivo E-3R. Con ninguno se pudo lograr la inducción de actividad decolorativa.

En estudios anteriores se ha reportado que diferentes especies de *Pleurotus* cultivadas en presencia de material ligninocelulósico son capaces de producir enzimas con actividad oxidativa (80, 81, 95, 122). De esta forma se llevo a cabo la fermentación en estado sólido de *Pleurotus ostratus* en trigo y avena como soportes (80, 81, 122). En las tablas X y XI se aprecia que las actividades decolorativa y ligninolítica fueron cerca de diez veces mas altas en fermentación en estado sólido que en fermentación líquida. Vyas y Molitoris (122) reportaron la producción de una peroxidasa extracelular de *P. ostreatus* cultivado en fermentación en estado sólido capaz de llevar a cabo la decoloración del Azul Brillante Remazol R (RBBR). La mayor actividad decolorativa fue reportada entre los 14 y los 20 días de fermentación. El cultivo en avena de *Pleurotus ostratus* IE8 fue monitoreado entre los 17 y los 20 días de fermentación, la actividad decolorativa no presentó mayor variación durante estos días. Cabe señalar que la mayor actividad decolorativa coincide con la mayor actividad laccasa, la única presente en los tres medios de cultivo (tabla XI).

La laccasa es una conocida metaloproteína que lleva a cabo la oxidación monovalente de diferentes compuestos fenólicos sustituidos por la simultánea reducción de oxígeno molecular (98, 80, 114). En la gráfica VI se muestra la dependencia de oxígeno en la

modificación química del Azul Reactivo E-3R. El pH correspondiente a la mayor velocidad decolorativa, mostrado en la gráfica VII, corresponde al óptimo de reacción para la laccasa en la oxidación del ABTS (10, 80).

Al ser comparada la habilidad de *Pleurotus ostratus* IE8 con otras quince cepas se aprecia que, a pesar de tratarse de la misma especie, las seis variedades de *P. ostratus* tuvieron un comportamiento de decoloración muy diferente (tabla XII), aunque la presencia de laccasa y Mn-peroxidasa fueron constantes en todas ellas (tabla XIII). Es decir, si suponemos que la actividad decolorativa se lleva a cabo por la laccasa, o en algunos casos por la Mn-peroxidasa, esperaríamos que todas aquellas especies que presentan ambas actividades presenten actividad decolorativa con la mayoría de los colorantes probados. Esto es cierto para las variedades de *P. chrysosporium* las cuales no presentaron ninguna actividad ligninolítica y tampoco actividad decolorativa. Sin embargo en algunas variedades de *P. ostreatus* las cuales presentan actividades laccasa-Mn-peroxidasa, no se detectó actividad o ésta fue muy baja, con el Negro ácido y el Azul orisol. Este fue también el caso de *B. adusta* 7308. La cepa de *B. adusta* 8258 la cual presentó actividad laccasa y la mas alta actividad Mn-peroxidasa, no presentó actividad decolorativa con ninguno de los colorantes. En el caso de *T. hispida* 8260 se ve una relación directa entre la producción de laccasa y actividad decolorativa. Es el caso también de *C. versicolor* 8272. No se le atribuye la capacidad decolorativa a la Mn-peroxidasa debido a que los ensayos de decoloración realizados con los extractos crudos no necesitan la presencia de peróxido de hidrógeno para llevar a cabo la reacción. En la gráfica VIII se muestra la tendencia que existe entre la laccasa y la actividad decolorativa Azul Reactivo E-3R de las quince cepas. De la laccasa sabemos que es una enzima no específica, y que el rango de sustratos a oxidar varía de una laccasa a otra dependiendo de la especie (9, 101, 114). A esto se atribuye el peculiar comportamiento en la actividad decolorativa de las diferentes especies fúngicas que presentan actividad laccasa.

Como primer paso en la purificación de la actividad decolorativa de *Pleurotus ostratus* IE8, se realizó una precipitación fraccionada con NH_4SO_4 (25). La mayor actividad decolorativa quedó distribuida entre el 60 y 80% de saturación de sulfato de amonio, es decir, por arriba del 40% y por abajo del 80% (tabla XIV). La laccasa es una enzima glicosilada

(98, 114), por ser una proteína hidrofílica tiene un alto grado de solubilización y hace más difícil su desplazamiento con sulfato de amonio, por ello precipita en un rango amplio de saturación (gráfica VII). La mayor actividad laccasa quedó distribuida entre el 40-80% de saturación al igual que la actividad decolorativa. El Negro ácido es el único cuya decoloración parece ser efecto de alguna otra enzima (tabla XV).

La fracción precipitada fue aplicada a diferentes columnas de cromatografía. La concentración tan alta de exopolisacáridos producidos por *P. ostreatus* bajo estas condiciones de cultivo fue el principal problema en el proceso de purificación. Ya se ha reportado el problema que representa la purificación de proteínas por la presencia de exopolisacáridos en el medio, como el caso de la cloroperoxidasa producida por *Caldaromyces fumago* (36, 93). Únicamente con la columna de intercambio aniónico de interacción fuerte se lograron buenos resultados (gráfica XIII). En ella se encontraron dos actividades laccasa, Lac I y Lac II. Ya se han identificado dos actividades laccasa en *Pleurotus ostreatus* (122), *Pleurotus eryngii* (80, 81) y *Trametes versicolor* (10). En el diagrama I, donde se muestran los diferentes pasos de purificación en una electroforesis denaturante, el primer pico de elución con actividad laccasa aparece con tres bandas de proteína; el segundo pico eluido con actividad aparece con cuatro bandas. De acuerdo al peso molecular para la laccasa de *Pleurotus ostreatus* reportado por Youn *et. al.* (126), la banda indicada en el diagrama es presumiblemente la laccasa producida por *P. ostreatus* IE8.

El paso a través de la columna de intercambio aniónico representó una etapa muy agresiva para la enzima. Se logró recuperar menos del 1% para Lac I y un poco más del 2% para Lac II (tabla XVI). Youn *et. al.* (126) realizó la recuperación de las laccasas de *P. ostreatus* en condiciones más suaves, utilizando una cromatografía de intercambio aniónico de interacción débil. Reportó el 10.9 % de recuperación para Lac I y 1% para Lac II (tabla III). En el caso de *Trametes hispida*, la pérdida de actividad de la enzima y el porcentaje de recuperación después de la cromatografía de intercambio aniónico fueron semejantes a la de *P. ostreatus*. Se lograron actividades específicas de 168 U/mg y 170 U/mg para la Lac I y Lac II respectivamente, y cantidad de proteína suficiente para realizar la caracterización cinética (tabla XVII). Una cromatografía de intercambio aniónico de interacción débil no fue

suficiente para separar las dos isoenzimas. Como se muestra en la gráfica XIV, la cantidad de Lac II obtenida fue significativamente mas alta que Lac I, aunque con actividades específicas practicamente iguales. En el caso de *Trametes versicolor*, la especie mas cercana a *T. hispida* que ha sido estudiada, también se ha identificado una cantidad de Lac II dos veces mas alta que de Lac I, aunque Lac II presentó una actividad específica seis veces mas alta (10).

La cantidad de laccasa producida por *T. hispida* es significativamente mas alta que el resto de las enzimas excretadas bajo estas condiciones de cultivo, mostrado claramente en el diagrama II. Los pesos moleculares para las dos isoenzimas, determinado por electroforesis, son practicamente iguales, 68 kDa. Cuando ambas enzimas son aplicadas a un gel de electroforesis no denaturante, presentan velocidades de migración semejantes. Sin embargo, cuando aun no son separadas en sus isoformas es decir, justo antes de ser aplicadas a la columna de intercambio aniónico, Lac I presenta una movilidad diferente (diagrama III). Aparentemente hay una pérdida de cargas superficiales lo cual provoca que la velocidad de migración de Lac I sea diferente. Probablemente esto influya de alguna manera en la pérdida de actividad.

La laccasa parcialmente purificada de *T. hispida* 8260 fue capaz de decolorar once colorantes con respecto a los cinco decolorados por la laccasa de *P. ostreatus* IE8. El Azul Reactivo F-RL, fue completamente modificado y decolorado por la laccasa de *T. hispida* (gráfica XV) y no por la de *P. ostreatus*. Este colorante derivado de una antraquinona y conocido comunmente por Azul Brillante Remazol R (RBBR), fue tomado como modelo junto con el ABTS para la caracterización de las isoenzimas de *T. hispida*, mostrado en la tabla XVIII. Ambas presentan comportamiento michaeliano con los dos sustratos. Lac II presenta una k_{cat} y una afinidad, K_m , diez veces mas altas que las presentadas por Lac I para la oxidación del ABTS. Aunque esta proporcionalidad implica una mínima diferencia entre sus eficiencias catalíticas, k_{cat}/K_m , el diferente comportamiento cinético de cada enzima fue muy marcado en el momento de realizar los ensayos (gráfica XVI-XVII). Ambas enzimas presentan afinidades practicamente iguales para la modificación del colorante aunque la laccasa II tiene una menor k_{cat} y resulta, por lo tanto, mas eficiente. Sin embargo, el ABTS resultó mucho mejor sustrato para la enzima que el colorante.

6. CONCLUSIONES.

- *Pleurotus ostreatus* IE8 es capaz de llevar a cabo la decoloración de doce colorantes de uso textil en fermentación líquida.
- El fluido extracelular de *P. ostreatus* IE8 cultivado en fermentación líquida y en estado sólido es capaz de llevar a cabo la modificación de al menos 5 de 27 colorantes de uso textil.
- La utilización de material lignocelulósico estimula la generación de enzimas ligninolíticas, entre ellas la laccasa, responsable de llevar a cabo la decoloración.
- Los fluidos extracelulares de todas las variedades de *Pleurotus* y *Trametes* capaces de producir laccasa en fermentación sólida, tienen también la capacidad de llevar a cabo la modificación de los colorantes textiles, pero cada especie con una afinidad diferente para cada colorante.
- La laccasa parcialmente purificada de *Trametes hispida* 8260 presentó un mayor rango de decoloración y grado de pureza que la laccasa de *Pleurotus ostreatus* IE8.
- Se identificaron al menos dos actividades laccasa en los extractos parcialmente purificados de ambas especies.
- Las isoenzimas caracterizadas de *T. hispida* presentaron características catalíticas con los dos sustratos utilizados, el ABTS (un sustrato artificial estándar) y el colorante RBBR, presentando en general una mayor afinidad y eficiencia catalítica por el ABTS.

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Arjmand, M. and Sandermann, H. 1985. Mineralization of chloroaniline/lignin conjugates and of free chloroanilines by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J. Agr. Food Chem. 33, 1053-1060.
- 2) Ander, P. and Marzullo, L. 1997. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. J. Biotech. 53, 115-131.
- 3) Anliker, R. 1977. Color chemistry and the environment. Ecotoxicology and Environmental Saf. 1, 211-237.
- 4) Anliker, R. 1979. Ecotoxicology of dyestuffs - a joint effort by industry. Ecotoxicol. Environ. Saf. 3, 59-74.
- 5) Archibald, F. S. 1992. A new assay for lignin-type peroxidase employing the dye Azure B. Appl. Environ. Microbiol. 58, 3605-3613.
- 6) Ausbel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 2. 10. Analysis of protein. Sección II. Edited by John Wiley and sons, Inc.
- 7) Ball, A. S.; Godden, B.; Helvenstein, P.; Penninckx, M. J.; McCarthy, A. J. 1990. Lignin-carbohydrate solubilization from straw by actinomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3017-3022.
- 8) Bogan, B. W. and Lamar, R. T. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete leavis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1597-1603.
- 9) Bourbonnas, R. and Paice, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. FEBS Lett. 267, 99-102.
- 10) Bourbonnas, R.; Paice, M. G.; Reid, I. D.; Lanthier, P.; Yanguchi, M. 1995. Lignin oxidation by laccase from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in Kraft lignin depolymerization. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1876-1880.
- 11) Bourbonnas, R.; Paice, M. G.; Freiermuth, B.; Bodie, E.; Borneman, S. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with Kraft pulp and lignin model compounds. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4627-4632.
- 12) Brown, D.H. ; Hitz, H.R. and Schafer, L. 1981. The assesment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic wastewater bacteria. Experience with a screening test. Chemosphere 10, 245-261.
- 13) Bumpus, J. A. and Aust, S. D. 1987. Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Involvement of the lignin-degrading system. Bioessays 6, 166-170.
- 14) Bumpus, J.A. and Brock, B. J. 1988. Biodegradation of Crystal Violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. 54, 1143-1150.

- 15) Bumpus, J. A.; Tien, M.; Wright, D.; Aust, S. D. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* **228**, 1434-1435.
- 16) Cerniglia, C. E.; Freeman, J. P.; Franklin, W.; Pack, L. D. 1982. Metabolism of benzidine and benzidine-congener based dyes by human, monkey and rat intestinal bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1224-1229.
- 17) Combes, R. D. and Haveland-Smith, R. B. 1982. A review of genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutant. Res.* **98**, 101.
- 18) Collins, P. J.; Kotterman, M. J. J.; Field, J. A. 1996. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene, by laccase from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4563-4567.
- 19) Crawford, D. L. 1986. The role of actinomycete in the decomposition of lignocellulose. *FEMS Symp.* **34**, 715-728.
- 20) Crawford, D. L. and Crawford, R. L. 1976. Microbial degradation of lignocellulose: the lignin component. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1741-1747.
- 21) Cripps, C.; Bumpus, J. A.; Aust, S. D. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1114-1118.
- 22) Chung, King-Thom and Stevens, Edward, Jr. 1992. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 175-190.
- 23) Chyvukula, M. and Renganathan, V. 1995. Phenolic azo dye oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4374-4377.
- 24) Chivukula, M.; Spadaro, J. T.; Renganathan, V. 1995. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulphenyl hydroperoxides. *Biochem.* **34**, 7765-7772.
- 25) Deustcher, M. P. 1990. Methods in enzymology. Vol. 182. Guide to Protein Purification. Section VI. p. 285-296. Edited by Murray P. Deustcher. Academic Press, New York.
- 26) Dey, S.; Matti, T. K.; Bhattacharya, B. C. 1994. Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Pleurotus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4216-4218.
- 27) Donlon, B.; Razo-Flores, E.; Luijten, M.; Swarts, H.; Lettinga, G.; Field, J. 1997. Detoxification and partial mineralization of azo dye mordant orange 1 in a continuous upflow anaerobic sludge-blanket reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 83-90.
- 28) Field J. A.; de Jong E.; Feijoo-Costa G.; Bont, J. A. M. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends in Biotechnol.* **44-49**.
- 29) Field, J. A.; Stams, A. J. M.; Kato, M.; Schraa, G. 1995. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek* **67**, 47-77.
- 30) Glenn, J. K. and Gold, M. H. 1983. Decolourisation of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1741-1747.

- 31) Glenn, J. K. and Gold, M. H. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. **242**, 329-341.
- 32) Gold, L. H.; Glenn, J. K.; Alic, M. 1988. Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. Methods in Enzymology **161**, 74-78.
- 33) Gold, M. H.; Wariishi, H.; Valli, K. 1989. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *P. chrysosporium*. ACS Symp. Ser. **389**, 127-140.
- 34) Gold, M. H.; Kuwahara, M.; Chiu, A. A.; Glenn, J. K. 1984. Purification and characterization of an extracellular hydrogen peroxide requiring diarylpropane oxygenase from white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. **234**, 353-362.
- 35) Gorontzy, T.; Drzyga, O.; Kahl, M. W.; Bruns-Nagel D.; Breitung, J.; von Loew, E.; Blotevogel, K. H. 1994. Microbial degradation of explosives and related compounds. Crit. Rev. Microbiol. **20**: 265-284.
- 36) Griffin, B. W. 1991. Chloroperoxidase: a review. In *Peroxidases in Chemistry and Biology*. Edited by Everse J., Everse K. E. and Grisham M. B., Vol. II, pp. 85-137. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- 37) Guillén, N. G. 1988. Optimización de la producción de biomasa de *Pleurotus ostreatus* para inóculo de medios sólidos. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Chiapas. Chiapas, México.
- 38) Hammel, K. E. 1989. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. Enzyme. Microbiol. Technol. **11**, 776-777.
- 39) Hammel, K. E.; Kalyanaraman, B.; Kirk, T. K. 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. J. Biol. Chem. **261**, 16948-16952.
- 40) Harvey, P. J.; Schoemaker, H. E.; Palmer, J. M. 1986. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. **195**, 242-246.
- 41) Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi production and role in lignin degradation. FEMS Microbiol. Rev. **13**, 125-135.
- 42) Haug, W.; Schmidt, A.; Nortermann, B.; Hempel, D. C.; Stolz, A. and Knackmuss, H. J. 1991. Mineralization of sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. Appl. Environ. Microbiol. **57**, 3144-3149.
- 43) Johansson, T. and Nyman, P. O. 1993. Isozymes of lignin peroxidase and Mn(II) peroxidase from white rot fungus basidiomycete *Trametes versicolor*. Arch. Biochem. Biophys. **300**, 49-56.
- 44) Jonhssnes, C.; Majcherzyk, A.; Huttermann, A. 1996. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different compounds. Appl. Microbiol. Biochemol. **46**, 313-317.
- 45) Kawai, S.; Umezawa, T.; Higuchi, T. 1989. Oxidation of methoxylated benzyl alcohols by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde. Wood Res. **76**, 10-16.
- 46) Kedderis, G. L.; Koop, D. R.; Hollenberg, P. F. 1986. ¹⁸O studies of the peroxidase-catalyzed oxidation of *N*-methylcarbazole. J. Biol. Chem. **261**, 15910-15914.

- 47) Kennedy, D. W.; Aust, S. D.; Bumpus, J. A. 1990. Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-17667). Appl. Environ. Microbiol. 56, 2347-2353.
- 48) Kersten, P. J. and Cullen, D. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7411-7413
- 49) Kirby, N.; Mc. Mullan, G.; Marchant, R. 1995. Decolourisation of an artificial textile effluent basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. Lett. 17, 761-764.
- 50) Kirk, T. C.; Croan, S. C.; Tien, M.; Murtagh, K. E.; Farrel, R. 1985. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium* : effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. Enzyme Microbiol. Technol. 8, 27.
- 51) Kirk, T. K. and Farrell, R. L. 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. Annu. Rev. Microbiol. 41, 465-505.
- 52) Kirk, T. K.; Schulz, E.; Connors, W. J.; Lorenzand, L. F.; Zeikus, J. G. 1978. Influence of cultures parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117, 277-285.
- 53) Kulkarni, S.V.; Blackwell, C. D.; Blackard, A. L.; Stackhouse, C. W.; Alexander, M. W. 1985. Textile dyes and dyeing equipment; classification, properties and environmental aspects; U.S. Environmental Protection Agency: Research Triangle Park, NC; EPA-600/2-85/010.
- 54) Kulla, H. G.; Klausener, F.; Meyer, U.; Ludeke, B.; Leisinger, T. 1983. Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the azo dyes Orange I and Orange II. Arch. Microbiol. 135, 1-7.
- 55) Kullman, S. W. and Matsumara, F. 1996. Metabolic pathway *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of cyclodiene pesticide Endosulfan. Appl. Environ. Microbiol. 62, 593-600.
- 56) Laemmli, U. K. 1970. Change of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- 57) Lev, W. G. and Raaza, H. 1988. Mechanism of azoreduction of dimethylaminoazobenzene by rat liver NADPH-cytochrome P-450 reductase and partially purified cytochrome P-450: oxygen and carbon monoxide sensitivity and simulation by FAD and FMN. Drug Metab. Dispos. 16, 441-448.
- 58) Lewandowski, G. A.; Armenante, P. M.; Pak, D. 1990. Reactor desing for hazardous waste treatment using a white rot fungus. Wat. Res. 24, 75-82.
- 59) Libby, R. D.; Thomas, J. A.; Kaiser, L. W.; Hager, L. P. 1982. Chloroperoxidase halogenation reaction. J. Biol. Chem. 257, 5030-5037.
- 60) Longstaff, E. 1983. An assesment and categorization of the animal carcinogenicity data on selected dyestuffs and a extrapolation of those data on the relative carcinogenic risk to man. Dye pigments 4, 243-304.
- 61) Lundquist, K. and Kirk, T. K. 1978. Di novo syntesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete. Phytochemistry 17, 1676.

- 62) Manning, B. W.; Cerniglia, C. E.; Federle, T. W. 1985. Metabolism of benzidine-based azo dye Direct Black 38 by human intestinal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 10-15.
- 63) Martinez, M. J.; Ruiz-Dueñas, J.; Guillén, F.; Martínez, A. T. 1996. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *J. Biochem.* **287**, 424-452.
- 64) Marzullo, L.; Cannio, R.; Giardian, P.; Santini, M. T.; Sannia, G. 1995. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J. Biol. Chem.* **270**, 3823-3827.
- 65) Maynard, C. W., Jr. 1983. Dye application, manufacture of dye intermediates and dyes, p. 809-861. In: J. A. Kent (ed.), *Riegel's Handbook of Industrial Chemistry*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- 66) Mc Cann, J. and Ames, B. N. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test. Assay of 300 chemicals: discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- 67) Meyer, U. 1981. Biodegradation of synthetic organic colorants. *FEMS, Symp.* **12**, 371-385.
- 68) Michaels, G.B. and Lewis D.L. 1985. Sorption and toxicity of azo and triphenylmethane dyes to aquatic microbial populations. *Environ. Toxicol. Chem.* **4**, 45-50.
- 69) Michaels, G. B. and Lewis, D. L. 1986. Microbial transformation rates of azo and triphenylmethane dyes. *Environ. Toxicol. Chem.* **5**, 161-166.
- 70) Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428.
- 80) Muñoz, C.; Guillén, F.; Martínez, A. T.; Martínez M. J. 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2166-2174.
- 81) Muñoz, C.; Guillén, F.; Martínez, A. T.; Martínez, M.J. 1997. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Microbiol.* **43**, 1-5.
- 82) Nelson, C. R. and Hites, R. A. 1980. Aromatic amines in and near the Buffalo River. *Environ. Sci. Technol.* **14**, 1147-1149.
- 83) Nigam, P.; Mc. Mullan, G.; Banath, I. M.; Marchant, R. 1996. Decolourisation of effluent from the textile industry by a microbial consortium. *Biotechnol. Lett.* **18**, 117-120.
- 84) Nörtemann, B.; Baumgarten, J.; Rast, H. G.; Knackmuss, H. J. 1986. Bacterial communities degrading amino- and hydroxynaphthalene-2-sulfonates. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1195-1202.
- 85) Ollikka, P.; Alhoniemi, K.; Leppänen, V. M.; Glumoff, T.; Suominen, Y. 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dye by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4010-4016.
- 86) Oxspring, D. A.; McMullan, G.; Smyth, W. F.; Marchant, R. 1996. Decolourisation and metabolism of the reactive dye, Remazol Black B, by an immobilized microbial consortium. *Biotech. Lett.* **18**, 527-530.

- 87) Pagga, U. and Brown, D. 1986. The degradation of dyestuffs. Part II. Behavior of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere* 15, 479-491.
- 88) Pasti-Grygsby, M.B. and Crawford, D.L. 1991. Relationship between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dyes and to degrade ligninocellulose. *Can. J. Microbiol.* 37, 902-907.
- 89) Pasti-Grigsby, M. B.; Paszczynski, A.; Goszcyński, S.; Crawford, D. L.; Crawford, R. L. 1992. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3605-3613.
- 90) Pasti, M. B. and Crawford, D. L. 1991. Relationships between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dye and to degrade lignocellulose. *Can. J. Microbiol.* 37, 902-907.
- 91) Pasti, M. B.; Pometto III, A. L., Nuti, M. P.; Crawford, D. L. 1990. Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2213-2218.
- 92) Paszczynski, A. and Crawford, R. L. 1991. Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 178, 1056-1063.
- 93) Pickard, A. M.; Kadima, T. A.; Carmichael, R. D. 1991. Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. *J. Ind. Microbiol.* 7, 235-242.
- 94) Pitter, P. 1976. Determination of biological degradability of organic substances. *Water Res.* 10, 231-235.
- 95) Platt, M. W.; Hadar, Y.; Chet, H. 1985. The decolorization of polymeric dye Poly-blue (polyvinylamine sulfonate-anthraquinone) by lignin degrading fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 394-396.
- 96) Raffi, F.; Franklin W.; Cerniglia. 1994. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2146-2151.
- 97) Razo-Flores, E.; Luijten, M.; Donlon, B. A.; Lettinga, G.; Field, J. A. 1997. Complete biodegradation of the azo dye azodisalicylate under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2098-2103.
- 98) Renhammar, B. and Malstrom, B. G. 1981. "Blue" copper-containing oxidases. In *Copper proteins. Metal ions in biology.* 3, 109-149. Edited by T. G. Spiro. John Wiley, New York, N.Y.
- 99) Roxon, J. J.; Ryan, a. J.; Wright, S. E. 1967. Reduction of water-soluble azo dyes by intestinal bacteria. *Food Cosmet. Toxicol.* 5, 367-369.
- 100) Ruckenstein, E. and Wang, X. B. 1994. Production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on porous poly(styrene-divinylbenzene) carrier and its application to the degrading of 2-chlorophenol. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 79-86.
- 101) Sannia, G.; Giardina, P.; Luna, L.; Rossi, M. ; Buonocore, V. 1986. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biot. Lett.* 8, 797-800.
- 102) Sasek, V.; Volfova, O.; Erbanova, P.; Vyas, B. R. M.; Matucha, M. 1993. Degradation of PCBs by white rot fungi, methyltrophic and hydrocarbon utilizing yeasts and bacteria. *Biotechnol. Lett.* 15, 521-526.

- 103) Spadaro, J. T.; Gold M.H. and Reneganathan V. 1992. Degradation of the azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **58**, 2397-2401.
- 105) Spadaro, J. T. and Renganathan, V. 1994. Peroxidase-catalized oxidation of azo dyes: mechanism of Disperse Yellow 3 degradation. Arch. Biochem. Biophys. **312**, 301-307.
- 107) Spicker, J.; Crawford, R. L.; Crawford, R. L. 1992. Influence of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) concentration on the degradation of TNT in explosive contaminated solid by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **58**, 3199-3202.
- 108) Stherland, G. R. J.; Khindaria, A.; Aust, S. D. 1996. The effect of veratryl alcohol on manganese oxidation by lignin peroxidases. Arch. Biochem. Biophys. **327**, 20-26.
- 109) Stoltz, A. 1989. Ph. D. thesis. University of Stuttgart, Stuttgart, Germany.
- 110) Shaul, G. M.; Holdsworth, T. J.; Dempsey, C. R.; Dostal, K. A. 1991. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. Chemosphere **22**, 107-119.
- 111) Shin, K. S.; Oh, I. K.; Kim, C. J. 1997. Production and purification of Remazol Brilliant Blue R decolorization peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. **63**, 1744-1748.
- 112) Shin, K. S.; Youn, H. D.; Kang, S. O.; Hah, Y. C. 1993. Purification and characterization of D-glucose oxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Eur. J. Biochem. **215**, 747-752.
- 113) Takada, S.; Nakamura, M.; Matsueda, T.; Kondo, R.; Sakai, K. 1996. Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. Appl. Environ. Microbiol. **2**, 4323-4328.
- 114) Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiol. **140**, 19-26.
- 115) Thomas, J. A.; Morris, D. R.; Hager, L. P. 1970. Chloroperoxidase. Classical peroxidatic, catalytic, and halogenating forms of the enzyme. J. Biol. Chem. **245**, 3129-3134.
- 116) Tien, M. and Kirk, T. C. 1983. Lignin-degrading enzyme from hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Science **221**, 661.
- 117) Tien, M. and Kirk, T. C. 1983. Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **81**, 2280-2284.
- 118) Vaidya, A. A., and K. V. Datye. 1982. Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibers. Colourage **14**, 3-10.
- 119) Valli, K.; Brock, B. J.; Joshi, D.; Gold, M. H. 1992. Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **58**, 221-228.
- 120) Valli, K. and Gold, M. H. 1991. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. **173**, 345-352.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 121) Vazquez-Duhalt, R.; Westlake, D. W. S.; Fedorak, P.M. 1994. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvent. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 459-466.
- 122) Vyas, B. R. and Molitoris, H. P. 1995. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol brilliant blue R. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3919-3927.
- 123) Wariishi, H.; Valli, K.; Gold, M. H. 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **267**, 23688-23695.
- 124) Wiseman, Alan. 1980. Xenobiotic-metabolising cytochromes P-450 from microorganisms. *Trends Biochem. Sci.* **Abril**, 102-103.
- 125) Yadav, J. S.; Quensen, J. F.; Tiedje, J.M.; Reddy, C. A. 1995. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2560-2565.
- 126) Youn, H. D.; Kim, K.J.; Maeng, J. S.; Han, Y. H.; Jeong, I. B.; Jeong, G.; Kang, S. O.; Hah, Y. C. 1995. Single electron transfer by extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiol.* **141**, 393-398.
- 127) Young, L. and Yu, J. 1991. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Wat. Res.* **3**, 1187-1193.
- 128) Zitomer, D. H. and Speece, R. E. 1993. Sequential environments for enhanced biotransformation of aqueous contaminants. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 227-244.
- 129) Zollinger, H. 1987. Color chemistry-syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments, p.1-7; VCH Publishers, New York.

Ed. Tables 1 & 3 before mention to avoid References.

CURRENT MICROBIOLOGY Vol. 000 (1998), pp. 1-3

**Current
Microbiology**

An International Journal

© Springer-Verlag New York Inc. 1998

Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi

Elizabeth Rodríguez, Michael A. Pickard, Rafael Vazquez-Duhalt

Instituto de Biotecnología UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62250 México

Received: 26 May 1998 / Accepted: 7 August 1998

Abstract. White-rot fungi were studied for the decolorization of 23 industrial dyes. Laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase, and aryl alcohol oxidase activities were determined in crude extracts from solid-state cultures of 16 different fungal strains grown on whole oats. All *Pleurotus ostreatus* strains exhibited high laccase and manganese peroxidase activity, but highest laccase volumetric activity was found in *Trametes hispida*. Solid-state culture on whole oats showed higher laccase and manganese peroxidase activities compared with growth in a complex liquid medium. Only laccase activity correlated with the decolorization activity of the crude extracts. Two laccase isoenzymes from *Trametes hispida* were purified, and their decolorization activity was characterized.

Industrial dyes can be released into the environment from two major sources: as effluents from synthesis plants and from dye-using industries, such as textile factories. It is estimated that between 10 and 15% of the total dye used in the dyeing process may be found in wastewater [6]. Several of these dyes are very stable to light, temperature, and microbial attack, making them recalcitrant compounds [28]. About 50% of the industrial colorants produced in the world are azo dyes [21]. These can be transformed to carcinogenic compounds under anaerobic conditions [11].

Ligninolytic fungi have been reported to degrade xenobiotic compounds [14]. The enzymatic systems that involve the enzymes of lignin degradation are able to transform polycyclic aromatic hydrocarbons [3, 18, 24], chlorinated phenols [24, 32], PCB [33, 42], dioxins [8, 38], pesticides [19, 22], explosives [17, 37], dichloroaniline [2, 25], and dyes [15, 20, 31, 34].

The white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is able to decolorize several industrial dyes [20] and polymeric dyes [15]. *P. chrysosporium* cultures, extracellular fluid, and purified lignin peroxidase were able to degrade crystal violet and six other triphenylmethane dyes by sequential N-demethylations [7]. Azo dyes Orange II, Tropaeolin O, and Congo Red, and the heterocyclic dye Azure B were decolorized by cultures of *P. chrysosporium* [12]. However, crude lignin peroxidase decolorized all the dyes except Congo Red, indicating

that other enzymes must be involved in the degradation of this azo dye [12]. The role of purified lignin peroxidase in the decolorization of several azo dyes has been clearly demonstrated [30]. The different isoenzymes of lignin peroxidase produced by *P. chrysosporium* are able to decolorize several dyes with different chemical structures, including azo, triphenylmethane, heterocyclic, and polymeric dyes [27]. This decolorization was enhanced by the presence of veratryl alcohol. Manganese peroxidase from *P. chrysosporium* was also able to decolorize several azo dyes in vitro, and with both enzymes the decolorization rate was dependent on the chemical structure of the dye [29]. Dyes such as Poly R [16] and Azure B [1] have been proposed as a standard assay for determination of lignin peroxidase activity. In *P. chrysosporium* cultures, dye decolorization is not a one-step oxidation process, as several dyes are extensively mineralized [36].

Other ligninolytic fungi have shown the capacity for dye decolorization. *Pleurotus ostreatus* decolorized a polymeric dye, Poly-B411, but only when the fungus was previously cultured in lignin-containing media [31]. A 73-kDa peroxidase from *P. ostreatus* has been shown to be involved in Remazol Brilliant Blue decolorization [34]. Congo Red is readily decolorized by cultures of *Pleurotus ostreiformis* [13], and laccases from *Trametes versicolor* can use Remazol Brilliant Blue as a mediator in the oxidation of model lignin compounds [4].

The mechanism of azo dye oxidation by peroxidases

such as lignin peroxidase probably involves the oxidation of the phenolic group to produce a radical at the carbon bearing the azo linkage. Then water attacks this phenolic carbon to cleave the molecule producing phenyldiazene. The phenyldiazene can be oxidized by a one-electron reaction generating N_2 [10, 35]. For laccase oxidation of phenolic azo dyes, a similar mechanism has been proposed [9].

Approximately 10,000 different dyes and pigments are produced annually worldwide and used extensively in the dye and printing industries. It is estimated that about 10% are lost in industrial effluents [44]. Industry uses synthetic dyes with a great variety of chemical structures; thus, a biocatalyst for decolorization should be able to degrade dyes of diverse structures. In this work, 16 strains of ligninolytic fungi were examined for the decolorization of 23 industrial dyes, and an attempt was made to correlate dye decolorization with enzyme production. Two forms of laccase from *Trametes hispida*, shown to be involved in the decolorization reaction, were purified and their kinetic properties were determined.

Materials and Methods

Fungal strains. *Bjerkandera adusta* 4312, 7308, 8258; *Pleurotus ostreatus* 7964, 7972, 7980, 7988, 7989, 7992; *Phanerochaete chrysosporium* 3541, 3642; *Sporotrichum pulverulentum* 4521; *Trametes hispida* 8260 and *Trametes versicolor* 8272 were obtained from University of Alberta Mold Herbarium, Edmonton, Canada. *Pleurotus ostreatus* IEB was obtained from the Ecology Institute, Xalapa, Mexico and *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 was from the American Type Culture Collection, Rockville Pike, MD. All fungi were maintained on potato dextrose agar plates (Difco).

Chemicals. Veratryl alcohol, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), and sodium malonate were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI). Orisol dyes were obtained from Colorfran S.A. (Mexico) and the other industrial dyes were obtained from BASF (Germany). Mineral salts were obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ), and glucose, yeast extract, and malt extract were purchased from Difco Laboratories (Detroit, MI).

Enzyme production. Inocula were prepared as follows: five 5-mm disks of fungal mycelium, excised from agar plates, were inoculated in each 125-ml flask containing 50 ml of glucose-malt extract-yeast extract medium. The culture medium contained, per liter, 10 g of glucose, 2 g of yeast extract, 3.5 g of malt extract, 2 g KH_2PO_4 , 0.5 g $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, and 1 ml of trace metals solution. The trace metals solution contained, per liter, 0.14 mg of $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.29 mg of $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.50 mg of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. After 6 days of incubation in shaken flasks at 28°C, the fungal growth in liquid glucose-malt medium reached 2.02 (± 0.20) g/L of dry biomass, and 20 ml of this culture was used to inoculate 50 g of wet whole cereal grain at 30°C. After 20 days of mycelial growth in solid state fermentation, extracellular enzymes were extracted by washing three times with 100 ml of 60 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0. The combined extracts were filtered and assayed for enzyme activities.

Enzyme assays. Laccase activity was determined spectrophotometrically as the absorbance increase at 436 nm of 0.5 mM ABTS in 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.5 ($\epsilon_{436} = 29.30 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [26]. Aryl

Table 1. Dye decolorization by fungal cultures on agar medium and *in vitro* by extracellular crude extracts from fungal cultures grown on oat grain

Dye	Metabolic decolorization		Enzymatic decolorization	
	<i>P. chrysosporium</i> (ATCC-24725)	<i>P. ostreatus</i> (IE8)	<i>P. ostreatus</i> (IE8)	<i>T. hispida</i> (8260)
BASF				
Acid black 194	+	+	+	+
Acid blue 185	-	+	+	+
Direct black 22	NA*	NA	-	+
Disperse blue 56	+	+	-	+
Disperse blue 79	NA	NA	-	+
Disperse orange 30	-	-	-	-
Disperse yellow 54	-	+	-	-
Disperse red 161	-	-	-	-
Reactive blue 19	-	+	-	+
Reactive blue 158	-	+	+	+
Reactive red 141	-	-	-	-
Reactive red 180	-	-	-	-
Reactive yellow 84	-	-	-	-
Sulfur black 1	+	+	-	+
Vat blue 6	+	+	-	-
Vat red 10	-	+	-	-
Vat yellow 46	-	+	-	-
COLORFAN				
Orisol black 2V	NA	NA	-	+
Orisol blue BH	+	+	+	+
Orisol orange S	-	-	-	-
Orisol scarlet 4BS	-	-	-	-
Orisol turquoise JL	-	+	+	+
Orisol yellow 4JLZ	-	-	-	-

* Not assayed.

alcohol oxidase (AAO) activity was estimated by the oxidation of 5 mM veratryl alcohol (3,4-dimethoxybenzyl alcohol) to veratraldehyde in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0 ($\epsilon_{310} = 9.30 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [26]. Manganese peroxidase (MnP) activity was assayed by the oxidation of 1 mM $MnSO_4$ in 50 mM sodium malonate, pH 4.5, in the presence of 0.1 mM H_2O_2 . Manganic ions, Mn^{3+} , form a complex with malonate, which absorbs at 270 nm ($\epsilon_{270} = 11.59 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [41]. Lignin peroxidase activity was determined as the oxidation of 4 mM veratryl alcohol to veratraldehyde in 20 mM succinate buffer pH 4.0, in the presence of 0.4 mM of H_2O_2 [39]. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme oxidizing 1 μmol of substrate min^{-1} . Decolorization activity was determined by measuring the decrease of the dye absorbance at their maximum visible absorbance wavelength. Dye concentration in the reaction mixture was adjusted to 1.0 absorbance unit at the maximum wavelength in the visible spectrum.

Laccase purification. Twenty-day-old cultures of solid-state fermentation of *Trametes hispida* 8260 on oats were each extracted three times with 100 mM phosphate buffer (pH 6.0), and the extracellular liquid was filtered and concentrated by ultrafiltration (Amicon PM10). The concentrated extract was applied to an anion exchange column (diethylaminoethyl cellulose DES2, Whatman). The column was equilibrated with 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) and eluted with a 0-0.6 M NaCl gradient in the same buffer. This column served to remove the majority

E. Rodríguez et al.: Decolorization by Laccases

Table 2. Enzymatic activities and dye decolorization^a of crude extracts from *Pleurotus ostreatus* IE8 grown in different media

Enzymatic activity	Liquid		Wheat		Oat	
	U/flask	U/mg protein	U/flask	U/mg protein	U/flask	U/mg protein
Laccase	410	15	2462	106	3052	181
Manganese peroxidase	ND ^b	ND	19	1	17	2
Aryl alcohol oxidase	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lignin peroxidase	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Reactive blue 158	102	11	2244	96	2418	149
Acid blue 185	32	4	654	28	684	42
Acid black 194	34	4	78	3	126	7

align.

^a Units for dye decolorization activity were estimated as the DA/min at the maximum visible absorbance (see Materials and Methods).

^b ND, not detected.

of the pigment. Fractions containing laccase activity were pooled, concentrated, and dialyzed by ultrafiltration. The enzyme was then applied to a Sephadex-G100 column (Sigma) and eluted with 60 mM sodium phosphate buffer pH 6.0. Fractions containing laccase activity were pooled and concentrated. The enzyme was applied a second time on a DE52 column under the same conditions to remove any residual pigment. Fractions with laccase activity were concentrated and applied to an Econo-Pac Q, strong anion exchanger (Bio-Rad), eluted with a gradient from 0 to 100% of 1 M NaCl in a 10-mM sodium phosphate buffer pH 6.0. Two peaks containing laccase activity were detected and called laccase I and II according to elution time. Laccase I and II showed specific activities of 168 U/mg and 170 U/mg, respectively.

Analytical procedures. Protein concentration was determined by the Bio-Rad protein assay. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10% polyacrylamide gels was performed by the method of Laemmli [23] with lysozyme (14.3 kDa), β -lactalbumin (18.4 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), ovalbumin (43 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), phosphorylase B (97.4 kDa), myosin (H-chain; 200 kDa) as molecular mass standards (Gibco BRL).

Results

Cultures of the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 24725) and *Pleurotus ostreatus* (IE8), growing on agar complex medium containing one of 23 industrial dyes tested, showed that *P. ostreatus* is able to decolorize 12 of 23 industrial dyes in vivo, while *P. chrysosporium* decolorized only 5 dyes (Table 1). These industrial dyes were selected on the basis of their stability to a range of pH (pH 3–11), thermostability, and stability under culture conditions in noninoculated flasks. This decolorization capacity was associated with extracellular enzymes; nevertheless, the crude extracellular extracts from *P. ostreatus* were able to decolorize only five dyes (Table 1), showing that other enzymatic mechanisms could be involved in the dye decolorization in vivo experiments. Extracellular crude extracts from *Trametes hispida* grown on oat grain were able to decolorize in vitro 11 of 23 industrial dyes (Table 1).

With the aim of finding higher decolorization activity, and because extracellular ligninolytic enzymes have

Table 3. Enzymatic activities of crude extracts from solid cultures of different fungi grown on oat grains

Strains	Volumetric activity (U/L) ^a		
	Laccase	Mn-peroxidase	Vcratryl alcohol oxidase
<i>B. adusta</i> (4312) ^b	ND	ND	54–160
<i>B. adusta</i> (7308)	5–7	66–70	ND
<i>B. adusta</i> (8258)	6–18	126–226	ND
<i>P. ostreatus</i> (7964)	83–181	59–75	ND
<i>P. ostreatus</i> (7972)	151–223	21–81	ND
<i>P. ostreatus</i> (7980)	109–421	47–61	24–97
<i>P. ostreatus</i> (7988)	235–588	77–157	ND
<i>P. ostreatus</i> (7989)	287–427	97–108	41–42
<i>P. ostreatus</i> (7992)	134–215	78–253	ND
<i>P. ostreatus</i> (IE8)	403–1272	49–67	ND
<i>P. chrysosporium</i> (3541)	ND	ND	ND
<i>P. chrysosporium</i> (3642)	ND	ND	ND
<i>P. chrysosporium</i> (ATCC-24725)	ND	ND	ND
<i>S. pulverulentum</i> (4521)	ND	ND	ND
<i>T. hispida</i> (8260)	1184–1766	78–99	ND
<i>T. versicolor</i> (8272)	86–1042	39–96	ND

^a Activity range from three independent replicates. Volumetric activity found in 300 ml extract from solid-state fermentation after 20 days' growth on 50 g of oat grains.

^b Strain number from the University of Alberta Mold Herbarium.

^c ND, not detected.

been shown to be induced by growth on natural lignin substrates, *Pleurotus ostreatus* IE8, used as an indicator strain from preliminary experiments, was grown in media containing different ligninocellulosic substrates. Solid-state cultures with whole wheat and oats were compared with submerged culture in the complex medium. These natural substrates induced the production of the ligninolytic enzymes laccase and manganese peroxidase, and the crude extracellular extract showed higher dye decolorization capacity than that obtained from the complex medium (Table 2). *P. ostreatus* IE8, grown on oats,

Table 4. Dye decolorization by crude extracts from solid cultures of different fungi grown on oat grains

Strains	Decolorization activity* ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ l}^{-1}$)				
	Reactive blue 158	Acid blue 185	Acid black 194	Orisol blue	Orisol turquoise
<i>B. adusta</i> (4312) ^b	ND ^c	ND	ND	ND	ND
<i>B. adusta</i> (7308)	940-1800	520-667	ND	ND	133-180
<i>B. adusta</i> (8258)	ND	ND	ND	ND	ND
<i>P. ostreatus</i> (7964)	1300-2220	440-580	ND	ND	560-1040
<i>P. ostreatus</i> (7972)	1040-3320	140-460	0-160	0-180	400-480
<i>P. ostreatus</i> (7980)	8080-8420	1440	0-100	0-400	2040-3000
<i>P. ostreatus</i> (7988)	4180-10160	1580-3500	0-360	180-600	1800-6060
<i>P. ostreatus</i> (7989)	3860-6660	880-1960	0-460	160-320	1060-2580
<i>P. ostreatus</i> (7992)	1580-1820	60-600	0-40	0-260	0-780
<i>P. ostreatus</i> (IE8)	1060-9500	1160-2500	130-500	650-900	1200-2300
<i>P. chrysosporium</i> (3541)	ND	ND	ND	ND	ND
<i>P. chrysosporium</i> (3642)	ND	ND	ND	ND	ND
<i>P. chrysosporium</i> (ATCC-24725)	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. pulverulentem</i> (4521)	ND	ND	ND	ND	ND
<i>T. hispida</i> (8260)	14020-21700	2640-12840	420-740	240-780	2840-3720
<i>T. versicolor</i> (8272)	3480-14540	400-1220	0-840	360-840	480-900

* Decolorization activity is estimated as the decrease in absorbance at the maximum visible wave length for each dye.

^b Strain number from the University of Alberta Mold Herbarium.

^c ND, not detected.

showed the highest volumetric and specific enzyme production and dye decolorization activities. Laccase activity production was 7.5 times higher in oat cultures than in liquid cultures, and the decolorization activity against Reactive blue 158 from solid phase oat extracts was 23 times higher than that from complex medium culture supernatant. No lignin peroxidase or aryl alcohol oxidase activity was detected in any of the culture supernatants of *P. ostreatus* IE-8.

After this, all fungi were grown on oats in solid state fermentation. Extracellular extracts were tested for enzyme production (Table 3) and dye decoloration (Table 4). Lignin peroxidase, manganese peroxidase, laccase, and veratryl alcohol oxidase activities were determined in the crude extracts from all 16 fungal strains. All strains of *P. ostreatus* were active to various levels in decolorizing the five dyes tested, but *T. hispida* showed the highest volumetric activity. *Bjerkandera adusta* strains showed high manganese peroxidase but low laccase and decolorizing activity, and *Phanerochaete chrysosporium*, well known as a producer of ligninolytic enzymes under low-nitrogen growth, produced none of the enzymes nor decolorized the dyes under these growth conditions. Of the four enzyme activities assayed in these extracts, only laccase seems to be correlated with the dye decolorization (Fig. 1), and *Trametes hispida* showed the highest laccase activity production, which is consistent with the highest dye decolorization activity. No lignin peroxidase activity could be detected in any of the fungi strains cultured under our growth conditions.

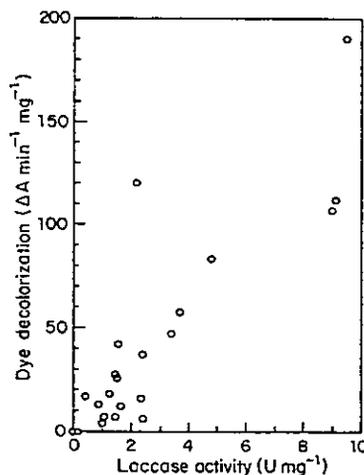


Fig. 1. Correlation between laccase activity and decolorization capacity of Reactive blue 158 dye by crude extracellular extract from 16 different fungal strains grown on oat grains.

Because the crude extract from *T. hispida* cultures showed the highest laccase and decolorization activities, laccase isoenzymes from *T. hispida* were purified and their kinetics constants determined with ABTS and Reactive blue 158 (Remazol brilliant blue, CI 61200) as substrates. Specific activities of the two purified enzymes were 168 U mg^{-1} for laccase I and 170 U mg^{-1} for

Table 5. Kinetic constants of laccase isoenzymes for ABTS and Reactive blue 158 oxidations

Enzyme	ABTS			Reactive blue		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μ M)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (μ M)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Laccase I	16	16	986	46	3500	13
Laccase II	178	235	759	25	3900	7

laccase II. The kinetic constants, determined by double reciprocal plots (Table 5), showed that the k_{cat} for ABTS oxidation is 10 times higher in laccase II than those found with laccase I. However, the K_M value of laccase II is also higher than that of laccase I, making no significant difference in the catalytic efficiency values (k_{cat}/K_M) for ABTS. On the other hand, kinetic constants for the Reactive blue 158 as substrate were similar for both laccases. The molecular weights determined by SDS-PAGE electrophoresis showed that both laccase I and laccase II are 68-kDa proteins, and both enzymes were stable, showing no decrease in activity during 30 days at room temperature under aseptic conditions. Although data are presented for only five dyes, *T. hispidia* laccase was able to decolorize in vitro 11 of the 23 industrial, while *P. ostreatus* laccase was able to oxidize in vitro only five of the same dyes. These results also show that there are other enzymatic systems involved in dye decolorization in in vivo cultures.

Discussion

Ligninocellulosic materials were able to induce ligninolytic enzyme production in many fungi. The increase of enzyme activities is correlated with the decolorization capacity of extracellular medium (Table 2). Lignin peroxidase has been shown to be involved in dye decolorization, mainly in *P. chrysosporium* cultures [7, 12, 27, 30, 44]. However, none of the strains tested under our conditions produced detectable amounts of lignin peroxidase (Table 3), while most of the extracellular extracts from these cultures were able to decolorize several dyes (Table 4). Manganese peroxidase [1, 16, 29] and laccase also have been reported to decolorize some synthetic dyes. From the strains we tested, it seems that laccase is the main enzyme involved in dye decolorization: this activity is clearly correlated with the decolorization capacity (Fig. 1), and the purified preparations are able to perform this decolorization reaction in vitro.

While laccases from different sources have many similar properties, there are also catalytic differences. We found that the molecular weight of both laccases from *T. hispidia* was 68 kDa, in the same range reported for

laccases I and II found in *Pleurotus ostreatus*, 64 kDa [43]; *Trametes versicolor*, 67 kDa [5]; and *Pleurotus eryngii*, 65 and 61 kDa respectively [26]. However, the laccases from *T. hispidia* and *P. ostreatus* (IE-8) exhibited different substrate specificities. *T. hispidia* laccase was able to decolorize in vitro 11 of the 23 industrial dyes. On the other hand, *P. ostreatus* laccase was able to oxidize only five dyes in vitro, even if it was capable of oxidizing 11 industrial dyes in in vivo experiments. The differences of substrate specificity between purified laccases from both microorganisms could be explained by the differences of amino acid sequences [26] and seems not to be related to the culture conditions. These results also show that there are other enzymatic systems in *P. ostreatus* involved in dye decolorization in in vivo cultures, such as cytochromes P450 or peroxidases [34].

In conclusion, several industrial dyes were decolorized biocatalytically by extracellular enzymes from different strains of white-rot fungi grown on oats in solid-state fermentation. This decolorization capacity was correlated with the laccase activity levels. *Trametes hispidia* showed the highest volumetric decolorization activity, and purified laccases from *T. hispidia* were able to decolorize several synthetic dyes in vitro. This enzymatic system appears to be a good candidate for immobilization and use as a bioreactor for effluent treatment from the dye and printing industries.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by a DGAPA-UNAM Grant IN 220597 and by the National Council for Science and Technology of Mexico (Grant 25376-A).

Literature Cited

1. Archibald FS (1992) A new assay for lignin-type peroxidase employing the dye Azure B. *Appl Environ Microbiol* 58:3110-3116
2. Arjmand M, Sandermann H (1985) Mineralization of chloraniline/lignin conjugates and of free chloranilines by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J Agric Food Chem* 33:1055-1060
3. Bogan BW, Lamar RT (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete leavis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol* 62:1597-1603
4. Bourbonnais R, Paice MG (1990) Oxidation of non-phenolic substrates. *FEBS Lett* 267:99-102
5. Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P, Yaguchi M (1995) Lignin oxidation by laccase isoenzymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in Kraft lignin depolymerization. *Appl Environ Microbiol* 61:1876-1880
6. Brown DH, Hitz HR, Schafer L (1981) The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic wastewater bacteria. Experience with a screening test. *Chemosphere* 10:245-261
7. Bumps JA, Brock BJ (1988) Biodegradation of crystal violet by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 54:1143-1150

8. Bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228:1434-1435
9. Chivukula M, Renganathan V (1995) Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl Environ Microbiol* 61:4374-4377
10. Chivukula M, Spadaro JT, Renganathan V (1995) Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxide. *Biochemistry* 34:7765
11. Chung K-T, Stevens E (1992) The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit Rev Microbiol* 18:175-190
12. Cripps C, Bumpus JA, Aust SD (1990) Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 56:1114-1118
13. Dey S, Maiti TK, Bhanacharyya BC (1994) Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Pleurotus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. *Appl Environ Microbiol* 60:4216-4218
14. Field JA, de Jong E, Feijoo-Costa G, de Bont JAM (1993) Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol* 11:44-49
15. Glenn JK, Gold MH (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 45:1741-1747
16. Gold MH, Glenn JK, Alic M (1988) Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. *Methods Enzymol* 161:74-78
17. Gorontzy T, Drzyga O, Kahl MW, Bruns-Nagel D, Breitung J, von Loew E, Biotevogel KH (1994) Microbial degradation of explosives and related compounds. *Crit Rev Microbiol* 20:265-284
18. Hammel KE, Kalyanaraman B, Kirk TK (1986) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[*p*]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J Biol Chem* 261:16948-16952
19. Kennedy DW, Aust SD, Bumpus JA (1990) Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767). *Appl Environ Microbiol* 56:2347-2353
20. Kirby N, McMullan G, Marchant R (1995) Decolourisation of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Lett* 17:761-764
21. Kulkarni SV, Blackwell CD, Blackard AL, Stackhose CW, Alexander MW (1985) Textile dyes and dyeing equipment, classification, properties and environmental aspects. U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC. EPA-600/2-85/010
22. Kullman SW, Matsumura F (1996) Metabolic pathway *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of cyclodiene pesticide Endosulfan. *Appl Environ Microbiol* 62:593-600
23. Laemmli UK (1970) Change of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
24. Lewandowski GA, Armenante PM, Pak D (1990) Reactor design for hazardous waste treatment using a white rot fungus. *Water Res* 24:75-82
25. Morgan P, Lewis ST, Watkinson RJ (1991) Comparison of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotics compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 34:693-696
26. Muñoz G, Gillén F, Marfnez AT, Marfnez MJ (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl Environ Microbiol* 63:2166-2174
27. Ollikka P, Alhoniemi K, Leppanen V-M, Glumoff T, Rajjola T, Suominen Y (1993) Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 59:4010-4016
28. Pagga U, Brown DH (1986) The degradation of dyestuffs, part II. Behavior of the dyestuffs in aerobic biodegradation test. *Chemosphere* 15:479-491
29. Pasti-Grigsby MB, Paszczynski A, Goszczynski S, Crawford DL, Crawford RL (1992) Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 58:3605-3613
30. Paszczynski A, Crawford RL (1991) Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol. *Biochem Biophys Res Commun* 178:1056-1063
31. Platt MW, Hadar Y, Chet H (1985) The decolorization of the polymeric dye Poly-blue (polyvinylamine sulfonate-anthraquinone) by lignin degrading fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 21:394-396
32. Ruckenstein E, Wang X-B (1994) Production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on porous poly(styrene-divinylbenzene) carrier and its application to the degrading of 2-chlorophenol. *Biotechnol Bioeng* 44:79-86
33. Sasek V, Volfova O, Erbanova P, Vyas BRM, Matucha M (1993) Degradation of PCBs by white rot fungi, methylotrophic and hydrocarbon utilizing yeasts and bacteria. *Biotechnol Lett* 15:521-526
34. Shin KS, Oh IK, Kim CJ (1997) Production and purification of Remazol Brilliant Blue R decolorization peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 63:1744-1748
35. Spadaro JT, Renganathan V (1994) Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of Disperse Yellow 3 degradation. *Arch Biochem Biophys* 312:301-307
36. Spadaro JT, Gold MH, Renganathan V (1992) Degradation of azo dyes by lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 58:2397-2401
37. Spiker JK, Crawford DL, Crawford RL (1992) Influence of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) concentration on the degradation of TNT in explosive contaminated soil by white rot fungus. *Appl Environ Microbiol* 58:3199-3202
38. Takada S, Nakamura M, Matsueda T, Kondo R, Sakai K (1996) Degradation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl Environ Microbiol* 62:4323-4328
39. Tien M, Kirk TK (1983) Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2280-2284
40. Vazquez-Duhalt R, Westlake DWS, Fedorak PM (1994) Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl Environ Microbiol* 60:459-466
41. Wariishi H, Valli K, Gold MH (1992) Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 267:23688-23695
42. Yadav JS, Quensen JF, Tiedje JM, Reddy CA (1995) Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Appl Environ Microbiol* 61:2560-2565
43. Youn HD, Kim KJ, Han YH, Jeong IB, Jeong G, Kang SO, Hah YC (1995) Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology* 141:393-398
44. Young L, Yu J (1997) Ligninase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res* 31:1187-1193