

DECOLORACIÓN ENZIMÁTICA DE COLORANTES INDUSTRIALES

Mariana Gutiérrez Cortés, Emmanuel García Escudero
Colegio Marymount

Estrella del Norte #6, Rancho Tetela, Cuernavaca, 62160 Morelos, MEXICO.

colegio@marymount.edu.mx

Abstracto. Hongos ligninolíticos fueron estudiados para la decoloración de 5 colorantes industriales. Se expusieron cinco diferentes colorantes industriales a cuatro hongos ligninolíticos en un medio líquido. Se comprobó que la enzima purificada lacasa es la causante de la decoloración de ciertos colorantes industriales.

Introducción.

Efluentes industriales pueden ser arrojados al medio ambiente por medio de dos principales fuentes: como efluentes de síntesis de plantas y del uso de colorantes en la industria, como lo son las fábricas textiles. La industria textil es el mayor consumidor de colorantes sintéticos, consumiendo 56 % del estimado anual de producción mundial (11). Es estimado que entre el 10 y el 15% del total de colorante utilizado en el proceso de coloración puede ser encontrado en los deshechos de agua (5). Muchos de estos colorantes son muy estables a la luz, temperatura, y ataque de microbios, haciéndolos componentes recalcitrantes (13). Cerca del 50% de la producción mundial de colorantes industriales son componentes azo (12). Estos pueden ser transformados en componentes cancerígenos bajo condiciones anaerobias (6). Efluentes industriales no solo producen contaminación visual sino que también representan un riesgo para la ecología y la salud pública.

Los hongos ligninolíticos han sido estudiados por su habilidad de degradar contaminantes orgánicos recalcitrantes como algunos hidrocarburos aromáticos cíclicos (4), fenoles clorados (16), PCBs (17, 3) dioxinas (19), pesticidas, explosivos (10), dicloroanilinas (2), y colorantes. *Phanerochaete chrysosporium* se ha reportado que decolora varios colorantes industriales (7, 14). Otros hongos ligninolíticos han mostrado también la capacidad de decolorar colorantes. Chivukula y Renganathan (1995) mostraron que una lacasa que proviene de *Pyricularia oryzae* oxida un número de colorantes fenólicos azo incluyendo metiles, metóxidos, cloros, y sustituyentes nitro derivados de 4-4-fenol. Esta oxidación enzimática produce quinones y suelta nitrógenos moleculares de enlaces azo, reduciendo así la formación de amina aromáticas tóxicas.

Esa lacasa puede actuar en compuestos cromofóricos así como Azul Brillante Remazol (18) o colorantes trientilmetanos (20) sugiere un potencial de aplicación en procesos industriales de decoloración y blanqueamiento. Recientemente Rodríguez (1999) estudio la decoloración de 23 colorantes industriales por hongos ligninolíticos. Las actividades de la lacasa, peroxidasa de manganeso, peroxidasa lignino, fueron determinadas en extractos crudos de colonias sólidas de 16 diferentes tipos de hongos. Solo la actividad de la lacasa era relacionada con la capacidad de decolorar. Dentro de esos tipos, la lacasa con

mayor capacidad de decoloración fue encontrada en *Coriopsis gálica* y la enzima purificada fue capaz de decolorar varios colorantes.

En este trabajo de investigación se utilizaron 4 distintos tipos de hongos ligninolíticos y se trato de relacionar la decoloración de los colorantes con la enzima lacasa producida por estos. Se utilizo la enzima lacasa purificada del *T. versicolor* y dos versiones de enzima lacasa del *C. gálica*, una mas purificada que la otra.

Materiales y Métodos.

Tipos de hongos: *C. gálica*, *P. Chrysosporium*, *P. ostreatus* y *T. versicolor*. Todos estos hongos se obtuvieron del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, México. Los hongos se cultivaron durante 21 días a 28°C a 200 RPM en una incubadora en matraces Erlenmeyer de 250ml con 50 ml de medio de cultivo.

Químicos: Rojo Reactivo E7B, Verde Orisol B, Azul disperso R, Azul Indanthren BC, y Negro Ácido M-16. Estos colorantes fueron expuestos a los 4 diferentes hongos ligninolíticos en las siguientes proporciones: Rojo Reactivo E7B, Verde Orisol B, Azul disperso R, Azul Indanthren BC (todos 1500 µl) y Negro Ácido (750 µl).

Para un litro de medio de cultivo se utilizó: glucosa (10 g), KH_2SO_4 (0.5 g), MgSO_4 (0.5 g), extracto de malta (3.5 g), bacto pectoma (0.1 g), solución stock de sales (1 ml/l), agua destilada (1 l). Se ajustó el pH a 4.5 y se esterilizó a 15 lb/in² por 15 min.

Tanto los colorantes industriales como los químicos para el medio de cultivo fueron proporcionados por el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, México.

Actividad enzimática: La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente conforme la absorbancia detectada en cada colorante disminuía con respecto al tiempo expuesto a la enzima. Cada colorante fue analizado con las características dadas por la tabla 1:

Tabla 1. Condiciones de los colorantes al ser estudiados en el espectrofotometro.

Colorante	Cantidad	λ	Absorbancia
Azul Indanthren BC	120 μ l	600nm	1.137
Negro Acido M-16	20 μ l	560nm	1.325
Azul Disperso R	200 μ l	575nm	1.03
Rojo Reactivo E7B	18 μ l	520nm	0.9828
Verde Orioso B	40 μ l	617nm	0.948

Resultados y Discusión.

Después de 21 días de incubación de los hongos, los colorantes presentaron las características mostradas en las siguientes tablas:

Tabla 2: Resultados para el hongo *C. gálica*.

Colorante	Resultado
Azul Indanthren BC	El hongo lo atrapó y decoloró poco.
Negro Acido M-16	El hongo lo atrapó y decoloró poco.
Azul Disperso R	Lo atrapó poco el hongo y decoloró casi totalmente.
Rojo Reactivo E7B	Lo atrapó el hongo y no decoloró.
Verde Orioso B	Lo atrapó el hongo y decoloró.

Tabla 3: Resultados para el hongo *P. ostreatus*

Colorante	Resultado
Azul Indanthren BC	El hongo lo atrapó y decoloró poco.
Negro Acido M-16	El hongo lo atrapó y decoloró poco.
Azul Disperso R	Lo atrapó poco el hongo y decoloró casi totalmente.
Rojo Reactivo E7B	Lo atrapó el hongo y decoloró poco.
Verde Orioso B	Lo atrapó el hongo y decoloró poco.

Tabla 4: Resultados para el hongo *T. versicolor*

Colorante	Resultado
Azul Indanthren BC	El hongo lo atrapó poco y decoloró poco.
Negro Acido M-16	El hongo no lo atrapó y decoloró casi totalmente.
Azul Disperso R	Se decoloró completamente.
Rojo Reactivo E7B	Lo atrapó el hongo y decoloró.
Verde Orioso B	Se decoloró completamente.

Tabla 5. Resultados para el hongo *P. chrysosporium*.

Colorante	Resultado
Azul Indanthren BC	El hongo lo atrapó y decoloró casi totalmente.
Negro Acido M-16	El hongo lo atrapó y no

	decoloró.
Azul Disperso R	Se decoloró completamente.
Rojo Reactivo E7B	Lo atrapó el hongo y decoloró poco.
Verde Orioso B	Lo atrapó el hongo y decoloró poco.

Al someter los colorantes por un minuto al espectrofotometro y las distintas enzimas se obtuvieron los resultados siguientes:

Tabla 6. Velocidad de decoloración de los colorantes tras un minuto de exposición a las enzimas de los siguientes hongos utilizando la absorbancia detectada.

Colorante	<i>T. versicolor</i> (5 μ l)	<i>C. gálica</i> (semipurificada) (5 μ l)	<i>C. gálica</i> (purificada) (4 μ l)
Azul Indanthren BC	-0.002	n/d	n/a
Negro Acido M-16	-0.340	-0.029	-0.224
Azul Disperso R	-0.006	-0.009	-0.019
Rojo Reactivo E7B	n/d	n/d	n/d
Verde Orioso B	-0.018	-0.001	-0.023

Al observar los hongos pudimos notar que el colorante que sufría mayor decoloración fue el Azul Disperso R, y el que menos se decoloró fue el Rojo Reactivo E7B, como se muestra en las tablas 2, 3, 4, y 5.

Al someter los colorantes a las enzimas en el espectrofotometro el colorante que más se decoloró fue el Negro Acido con la enzima del hongo *T. versicolor*, y el que menos se decoloró fue el Rojo Reactivo E7B con todas las enzimas probadas.

Como esperado, algunos colorantes industriales presentaron decoloración frente a la enzima lacasa de diferentes hongos. Se recomienda hacer experimentos testigo para cada colorante en su medio de cultivación pero sin ningún hongo para comprobar que la decoloración no es causada por las condiciones de incubación sino por el hongo.

Agradecimientos.

Quisiéramos agradecer al Dr. Rafael Vazquez-Duhalt (IBT-UNAM) por su asesoría y facilidades prestadas para realizar esta investigación.

Bibliografía.

- 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.
- Beaudette LA, Davies S, Fedorak PM, Ward OP, Pickard MA (1998) Comparison of biodegradation and mineralization as methods for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of four white rot fungi. *Appl. Env. Microbiol.* **64**: 2020-2025.

4. Bogan BW, Lamar RT (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbon-degradation capabilities of *Phanerochaete leavis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 1597-1603.
5. Brown Dh, Hitz HR, Schafer L (1981) The assesment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic wastewater barterial. *Experience with a streaning test. Chemosphere* 10: 245-261.
6. Chung K-T, Stevens E (1992) The reduction of azo dyes by intestinal microflora. *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 175-190.
7. Cripps C, Bumpus JA, Aust SD (1990) Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Env. Microbiol.* 56: 1114-1118.
8. Damkus T, Schneider P, Bech L, Heinzkill M (1996) *Coprinaceae laccases* International Pat. WO96/06930A1 (March 7, 1996).
9. Davis S, Burns RG (1992) Covalent immobilisation of laccase on activated carbon for phenolic effluent treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:474-479.
10. Gorontzy T, Drzga O, Kahl MW, Bruns-Nagel D, Breitung J, von Loew E, Blotevogel KH (1994) Microbial degradation of explosives and related compounds. *Crit. Rev. Microbiol.* 20: 265-284.
11. Hutzinger O (1980) The handbook of environmental Chemistry, Vol 3, Part A. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 188 pp.
12. Kulkarni SV, Blackwell CD, Blackard AL, Stackhose CW, Alexander MW (1985) Textile dyes and dyeing equipment, classification, properties and environmental aspects. US Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC, EPA-66/2-85/010.
13. Pagga U Brown D (1986) The degradation of dyestuffs. Part II. Behavior of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere* 15:479-491.
14. Paszcynski A, Crawford RL (1991) Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 1056-1063
15. Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi, and oxidation by *Coriolodopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl. Env. Microbiol.* 65 (in press).
16. 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
17. 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
18. Schliephake K, Lonegran GT (1996) Laccase variation during dye decolourisation in a 200 L packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.* 18: 881-886
19. Takada S, Naksamra M, Mastueda T, Kondo R, Sakai K (1996) Degradation of polychlorinated dibenzo-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl. Env. Microbiol.* 62: 4323-4328.
20. Vasdev K, Kulad RC, Saxena RK (1995) Decolorization of triphenylmethane dyes by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. *Curr. Microbiol.* 30: 268-272.