



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



PURIFICACIÓN DE LACASAS Y SU APLICACIÓN EN LA REMOCIÓN DE CONTAMINANTES EN AGUA.

Rafael Valera Pérez¹, Karla Patricia Becerra Cano¹, Alma Ivonne Arce Rodríguez², Romero Martínez Renata², Claudia Montalvo Paquini², M.L. Osnelida Villegas Rosas³, **Alejandro I.A. Alonso Calderón**^{1,2,3}

(1) Facultad de Ingeniería Química de la BUAP, (2) Universidad Politécnica de Puebla (3) Instituto de Ciencias, Posgrado en Ciencias Ambientales BUAP, , augusto96mx@hotmail.com isalonso@siu.buap.mx

Palabras clave: Lacasas, cromatografía, colorantes

Antecedentes: El empleo de hongos de la podredumbre blanca es una alternativa para realizar la decoloración de efluentes. Es por ello que hongos lignolíticos como *Pleurotus ostreatus*, han sido ampliamente estudiados debido a que en particular este microorganismo posee una maquinaria enzimática compleja que le permite degradar sustancias tales como lignina, celulosa y hemicelulosa^{1,2}. Como objetivos de este trabajo fue el de producir y purificar a la enzima lacasa (ρ -difenol: oxígeno óxido reductasas E.C: 1.10.3.2) a partir de *Pleurotus ostreatus* y remover diversos contaminantes aromáticos y colorantes de naturaleza "azo" ampliamente utilizados por la Industria textil poblana.

Metodología. Se utilizó la cepa de *Pleurotus ostreatus* donada por el Departamento de Investigaciones en Ciencias Agrícolas del ICUAP la cual se propagó en medio PDA, para la producción de las enzimas lacasa se prepararon medios líquidos minerales a base de All-Bran, se monitoreó la producción de estas enzimas en fermentación líquida a los 3, 5, 7, y 10 días, utilizando ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), monitoreando la oxidación del sustrato a 420nm utilizando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible con programa de cinéticas.

El concentrado enzimático de la fermentación con mayor actividad lacasa se aplicó en aguas contaminadas con los colorantes azul cibacron y azul solofenil a 50 ppm y 200 ppm, así como a los compuestos aromáticos anilina y 2-clorofenol a 100 ppm, todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Con la finalidad de aumentar la purificación de la enzima, la muestra con mayor actividad se sometió a un proceso de diálisis en buffer de fosfatos 20 mM/ pH: 7.4/12 h. transcurrido el tiempo se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico DE-53, realizando elución isocrática (NaCl 1M) y de gradiente lineal de concentración (20 mM-800 mM de NaCl amortiguado en buffer de fosfatos pH: 7.4, 20 mM).

Para conocer la masa molecular de la enzima purificada se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de concentración, utilizando 15 μ L de extracto a 120 V/2:30 h.

Resultados y Discusión. La mayor actividad lacasa se tuvo a los 7 días de fermentación líquida y esta al aplicarla en las muestras de agua contaminada fue capaz de remover al azul cibacron a 50 ppm en un 94% y a 200 ppm en un 97% en lo que se refiere al azul solofenil se tuvieron remociones de un 77 y 74% respectivamente, además de polimerizar a la anilina y al 2-Clorofenol generando productos de reacción insolubles. La purificación permitió aumentar la actividad enzimática de 167 a 451.1 UI/mL en la última etapa de purificación, la electroforesis evidenció una masa molecular de 56.2 kDa, característica de las lacasas.

Conclusiones. La utilización de hongos para la producción de enzimas que tradicionalmente se han utilizado para la alimentación abre un abanico de posibilidades de aplicarlas en la biorremediación y de esa manera estos productos bióticos autóctonos de nuestro país adquieran un valor agregado.

Bibliografía.

- 1.-Bourbonnais, R.; Paice, M. G.; Reid, I. D.; Lanthier, R; Yaguchi. 1995. Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator ABTS in Kraft Lignin Depolymerization. Applied and Environmental Microbiology 61: 157-162.
- 2.- Vázquez, D, R y Dávila, G, (2006), "Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales", Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México. Higuchi, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradación Wood Sci. Technol. 24:23-63.