

Aplicación de lacasas producidas por hongos para degradación de colorantes microbiológicos (orceína y cristal violeta)

Leticia Caudillo Ortega (1), Dra. Rosa María García Nieto (2), Claudia Erika Morales Hernández (3)

1 [Escuela de Nivel Medio Superior de Guanajuato, Colegio de Nivel Medio Superior, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [leti-caor99@hotmail.com]

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

3 [Escuela de Nivel Medio Superior de Guanajuato, Colegio de Nivel medio Superior, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [claumh7@hotmail.com]

Resumen

Las lacasas son enzimas producidas por algunos hongos que pertenecen a la familia de las enzimas multicobre oxidadas. Estas enzimas tienen la capacidad de degradar a la lignina, un componente estructural de paredes vegetales. Estas familias de oxidadas se han empleado en múltiples usos en la industria y se ha propuesto su uso como biosensores y en procesos de biorremediación por su capacidad para degradar una amplia variedad de compuestos similares a la lignina tanto fenólicos como no fenólicos. En el grupo de trabajo se han investigado la actividad de lacasa de un hongo lignolítico denominado H2DP traída de la sierra Santa Rosa en Guanajuato, sobre colorantes industriales. En el presente trabajo se creció este hongo en All-Bran® para inducir la secreción de lacasas, se determinó el perfil proteico y se estudió la degradación de colorantes microbiológicos empleados en tinciones celulares adicionados a estos cultivos. En el perfil electroforético se observó una banda de aproximadamente 30 kDa que corresponde a un PM esperado para las lacasas, además la orceína y cristal violeta fueron degradados por cultivos de H2DP en 72h.

Abstract

Laccases are enzymes produced by some fungi belong to the family multicopper oxidase enzymes. These enzymes have the ability to degrade lignin, a structural component of plant cell walls. These families of oxidases have been used in many medical applications in the textile industry and has been proposed as biosensors and bioremediation of pesticides, insecticides and tinctures, taking advantage of its ability to degrade a wide variety compounds similar to lignin both phenolic and non-phenolic. In the working group we have been investigated laccase activity of a ligninolytic fungus called H2DP from Santa Rosa in Guanajuato, to degradate industrial dyes. In the present work this fungus was grow with All-Bran® to induce the secretion of laccases, the protein profile was determined and the culture media was used to see degradation of dyes used in cell staining. In the electrophoretic profile a band of approximately 30 kDa corresponds to an expected MW for laccases, also the orcein and crystal violet were degraded by H2DP in 72h cultures was observed.

Palabras Clave

Oxidadas; Inoculación; Electroforesis; All-Bran® ; colorantes

INTRODUCCIÓN

Los hongos lignolíticos provenientes de la podredumbre blanca de la madera son una valiosa fuente de estudio debido a su capacidad por degradar lignina, que es un componente que proporciona soporte estructural junto con la celulosa a la materia vegetal. Estos hongos secretan enzimas de tipo peroxidasas y oxidasas.

Los hongos deben absorber nutrientes simples y solubles que obtienen mediante la degradación de biopolímeros tales como celulosa, hemicelulosa y lignina, por acción de un complejo sistema de enzimas hidrolíticas que liberan a su medio ambiente [1]. Entre ellas se encuentran las lacasas las cuales tienen un peso molecular de entre 60 y 90 KDa, además se han convertido en una opción para la degradación de colorantes tanto fenólicos y no fenólicos utilizados en los laboratorios como en la industria, ya que estos muestran estructuras parecidas a la de la lignina, por lo que se han hecho con ellas pruebas de biodegradación, para aplicarse a los colorantes industriales debido a su impacto ambiental en los mantos acuíferos.

Las lacasas pertenecen a la familia de enzimas multicobre oxidasa y pueden realizar reacciones catalizadas como la polimerización de monómeros, la degradación de polímeros y la oxidación de compuestos aromáticos por ejemplo aminas aromáticas, orto y para difenoles, bencenodoles entre otros [2].

Algunos de los usos de las enzimas producidas por los hongos lignolíticos se encuentran: el tratamiento de derrames de petróleo degradando tolueno o benceno (hidrocarburos tóxicos), en la industria del papel son muy útiles para obtener la celulosa para disgregar la lignina y resulta más ecológico realizarlo con estas enzimas [3]. Una estrategia semejante puede emplearse en la biodegradación de colorantes empleados en el laboratorio de microbiología.

Los hongos productores de estas enzimas pueden crecer en medios con fuentes de lignina, por lo que

se ha crecido el hongo H2DP en un medio con All-Bran®, para la obtención de estas enzimas y la realización del presente trabajo.

Colorantes Orceína y cristal violeta

La orceína es un colorante de color rojo violáceo (púrpura) que se extrae de forma natural de diversos líquenes (*orchella*), su estructura se muestra en la figura 1. Se emplea en la industria alimentaria con el código E182. La síntesis artificial fue descrita por Cocq en el año 1812. Los componentes químicos de la orceína se elucidaron en la década de 1950s por Hans Musso. Uno de sus componentes el Orcinol que se extrae del líquen archil denominado *Roccella tinctoria*. Es una sustancia que se utiliza para teñir y ver las distintas fases de los cromosomas en división celular y observar las diferentes etapas de la mitosis. Se emplea también en la tinción de tejidos como la piel para hacer comparaciones entre pacientes sanos y enfermos [4].

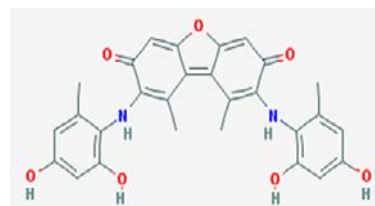


Figura 1: Estructura de la orceína cuya estructura es 2,8-bis(2,4-dihydroxy-6-methylanilino)-1,9-dimethyldibenzofuran-3,7-dione

Violeta de genciana o cristal violeta es un colorante azul cuya estructura se muestra en la figura 2, extraído de planta del género *Gentiana*, utilizado en solución tópica con propiedades antifúngicas y antimicóticas. Violeta de genciana (GV) al disociarse presenta carga positiva (GV⁺) por lo que interactúa con los componentes cargados negativamente de la pared celular bacteriana, incluyendo lipopolisacáridos, peptidoglicanos y el ADN. Es un mutágeno, de ese modo inhibe el crecimiento celular. GV provoca una acción fotodinámica mediada por un mecanismo de radicales libres. Además, este agente disipa el potencial de acción en la membrana bacteriana, lo que conduce a la muerte celular [5].

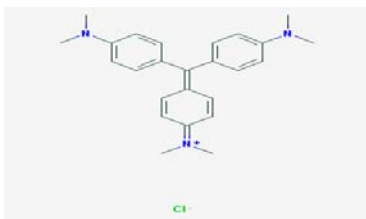


Figura 2: violeta de genciana cuya fórmula molecular es [4-[bis[4-(dimethylamino)phenyl]methylidene]cyclohexa-2,5-dien-1-ylidene]-dimethylazanium;chloride.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Se trabajó con un hongo denominado H2DP, muestra traída de un tronco de la sierra Santa Rosa en Guanajuato.

1.-Crecimiento del hongo en medios comerciales sólidos. Se sembraron placas de Petri con agar dextrosa Sabouraud con la cepa por el método de espatulado o de estría. Las cajas se incubaron a 28°C.

2.- Crecimiento en medios líquidos en presencia de All-Bran. Los medios líquidos contenían 37.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos de pH: 6, 38 mL de agua destilada y 3 gramos de All-Bran®.

Los medios líquidos estériles se inocularon con cuatro cuadros del hongo crecido en medio sólido. Cada 24 horas se tomó 1 ml de cada matraz, se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min, se recuperó el sobrenadante y se congelaron a -20 °C.

3.-Prueba de identificación de enzimas con guayacol. Al medio de cultivo sólido con la cepa en crecimiento se adicionaron 2 gotas de guayacol concentrado y se incubaron a 28°C

Para los medios líquidos, en una placa de ELISA se colocaron 100 µL del sobrenadante de muestra del cultivo líquido se agregaron 10µL de guayacol puro y 1µL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se incubó a 28°C por 24 h.

4.-Cuantificación de proteína (Método Micro-Lowry). Se cuantificó la concentración de proteína de los sobrenadantes de los cultivos líquidos por el método de Lowry empleando una curva estándar de proteína con albúmina sérica de bovino (BSA).

5.-Separación de proteínas por PAGE-SDS.

Se preparó un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 10 %, se cargó con aproximadamente 30 µg de proteína de sobrenadantes de diferentes muestras. Se llevó a cabo la electroforesis a 110 V, por un tiempo de 1.25 h. Al término de la corrida el gel se tiñó con plata.

6.-Colorantes

En los medios líquidos previamente inoculados se agregaron 100 µl de colorante cristal violeta en el matraz con el hongo H2DP en crecimiento y 100 µl de colorante orceína de igual manera en otro matraz. Se revisaron cada 24 horas para ver la degradación del colorante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento del hongo H2DP en medio líquido en presencia de All-Bran®

El hongo H2DP sembrado en el medio líquido (amortiguador de fosfatos pH 6.0) en presencia de All-Bran®, comenzó a esporular a los 9 días. Su crecimiento fue muy bueno y su morfología presentó textura algodonosa color verde opaco con blanco que se puede observar en la Figura 3.



Figura 3: Cepa H2DP sembrado en medio líquido en presencia de All-Bran®.

Determinación de la actividad de lacasas de la cepa H2DP crecida en el medio sólido en presencia de All-Bran®

El hongo H2DP se creció en medio dextrosa Sabouraud en presencia de All-Bran® durante varios días hasta tener un crecimiento visible de colonias. Se adicionó guayacol para determinar la actividad de lacasa. Se obtuvo un resultado positivo ya que se desarrolló un color rojizo que indica actividad enzimática (Figura 4).



Figura 4. Hongo H2DP con 2 gotas de guayacol.

Determinación de la actividad de lacasas de la cepa H2DP crecida en el medio líquido en presencia de All-Bran®

Después de 10 días de crecimiento de la cepa H2DP se tomaron alícuotas de 1 ml del medio extracelular. El cual se centrifugó para obtener la fracción soluble. 100 µl de este sobrenadante se colocó en pozos de placas de ELISA y se adicionó 10 µl de guayacol concentrado, finalmente se incubó a 28°C por 24 h. Se observó un pequeño cambio de coloración como se muestra en la figura 5, después de la incubación con guayacol.

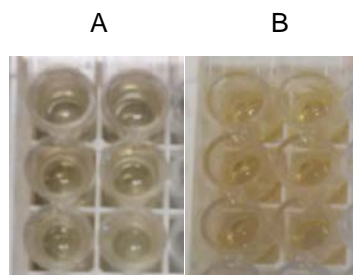


Figura 5: Determinación de la actividad de lacasa A) 0 horas B) Después de las 24 horas en incubación.

Determinación del perfil electroforético de las proteínas extracelulares secretadas por el hongo H2DP inducido por All-Bran®

Se obtuvo el sobrenadante del hongo H2DP después de varios días de crecimiento. Se determinó la cantidad de proteína de cada sobrenadante y se prepararon las muestras para ser sometidas a una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Al finalizar la electroforesis se tiñó el gel con plata. Se calcularon los pesos moleculares de las bandas de proteínas observadas. Se encontró en todas las muestras dos proteínas mayoritarias una de aproximadamente 30 kDa y otra de alrededor de 60 kDa (figura 6). Los pesos moleculares coinciden con lo reportado en la bibliografía para las lacasas.

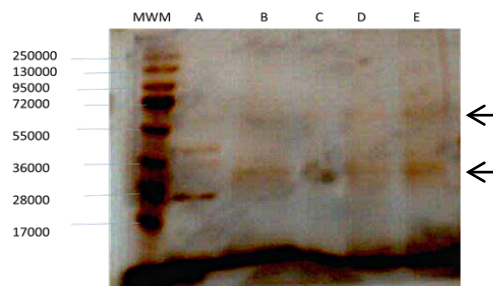


Figura 6: MWM) Marcadores de Peso molecular, A) H2DP sembrado el 15 de junio muestra tomada el 1 de julio con PM 56.2 Y 39.8kDa; B) H2DP 1 sembrado el 22 de junio muestra tomada el 2 de julio con PM 56.2 y 30.9 kDa; C) H2DP 2 sembrado el 22 de junio muestra tomada el primero de julio con PM 56.2 y 28.1; D) H2DP 1 sembrado el 22 de junio muestra tomada el 1 de julio con PM 61.6, 43.6 y 33.1 kDa E) H2DP 2 sembrado el 22 de junio muestra tomada el 2 de julio con PM 56.2, 32.3 Y 22,9 KDa.

Biodegradación de colorantes microbiológicos por la cepa H2DP

Para determinar la actividad de biodegradación de colorantes microbiológicos por las lacasas secretadas por el hongo H2DP en presencia de All-Bran®, se adicionó orceína o cristal violeta directamente a los matraces con el hongo en crecimiento y se observó la degradación cada 24 h. Los colorantes orceína y cristal violeta se

degradaron, mostrándose una degradación completa de la orceína a las 72 horas de incubación, en menor medida de degradación está el azul violeta durante el mismo tiempo que la orceína (figura 7).

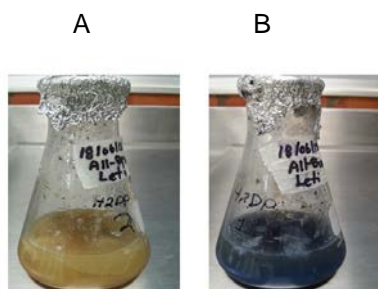


Figura 7: Degradación de colorante por hongos lignolíticos A) Orceína degradada B) Azul violeta menos presencia de degradación.

CONCLUSIONES

Se creció la cepa H2DP en medio líquido en presencia de All-Bran®

Se demostró la presencia de actividad de lacasa secretada por la cepa H2DP en medio sólido empleando guayacol.

Se determinó la presencia de dos bandas de 30 kDa y 60 kDa en el medio extracelular del hongo H2DP que son PM semejantes a los reportados para lacasas.

Los colorantes orceína y cristal violeta adicionados a cultivos de H2DP se biodegradaron después de 72 h de incubación.

REFERENCIAS

- [1] Sánchez Paz, Judith (2012) Estudio de lacasas provenientes de hongos degradadores de madera para eliminación de contaminantes de lixiviado del relleno sanitario de León, Gto (tesis de licenciatura inédita) DCNE, Universidad de Guanajuato.
- [2] Torres Navarro, Viridiana Habacuc (2014) Utilización de lacasas secretadas por hongos para la degradación de colorantes (tesis de licenciatura inédita), DCNE, Universidad de Guanajuato

[3] Sharaddha, Ravi Shekher, Simran Sehgal, Mohit Kamthania, Ajay Kumar, (2011), Laccase: Microbial sources, production, purificación an potential biotechnological applications, Mangalayatan University, [4]<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Orcein>_National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. (accessed July 16, 2015).

[5]http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Crystal_violet National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database. (accessed July 16, 2015).