



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Trabajo presentado para aspirar al título de  
Doctor en Química

# Producción, caracterización e inmovilización de lacasas para uso en biocatálisis y biorremediación

## Directoras

Dra. Carmen  
Manta

Dra. María del Pilar  
Menéndez

Dra. Karen  
Ovsejevi

**B.C. Larissa Gioia Fabre**

Facultad de Química – UdelaR  
Marzo 2017

---



---

“Si vale la pena, no será fácil”

A mis padres con amor



*“La gratitud es la memoria de un corazón contento”*

Por eso quiero expresar un enorme agradecimiento a todos los que han participado y participarán en distintos tramos del camino que estoy recorriendo.

A mis tutoras por su confianza, por la motivación y la dedicación que me brindaron siempre.

Agradezco a quienes muy amablemente aceptaron formar parte del tribunal, Francisco Batista-Viera, Paula Rodríguez y Laura Levin.

A Susana Rodríguez-Couto, Juan Burgueño y Diana Míguez, por ayudarme a realizar partes muy importantes de este trabajo.

A Danilo Davyt y Ale Galetta por ayudarme con el HPLC. A Cristina Olivaro y toda la barra del CUT de Tbó. A Patricia, Agustín y Rafael del Departamento de aguas del LATU. A Carlitos y Pablo que me ayudaron con las lechuguitas. A todo el LBB y la Cátedra de Bioquímica, los compañeros de vigilancia y muchos más de Facultad de Química. A todos, por siempre estar más que generosamente dispuestos a darme una mano, un mate o un “vamo’arriba que se puede”, gracias.

A Lina Bettucci, Carlos Mantero, Carlos Beloso, Juan Ramirez, Sandra Castro, Raquel Piaggio, LATU y REDES-AT Uruguay, por el asesoramiento y/o suministro de materiales, fundamentales para el desarrollo del posgrado.

Debo agradecer además a PEDECIBA, ANII, Comisión Académica de Posgrado, Fundación Carolina y UdelaR.

Por último a mis afectos. Necesitaría otro capítulo para enumerar todo lo que agradezco a mis padres, Analía y Miguel. Gracias a toda mi familia y amigos, a amigas del tacua y de facultad, a amigos del LBB y de Bioquímica y a Fer. Por la amistad, el amor, los sobrinos, las risas, las lágrimas, la paciencia, los abrazos, el aguante y por tanto más. Gracias !!



---

## TABLA DE CONTENIDOS

---

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Agradecimientos .....</b>  | <b>I</b>    |
| <b>Tabla de contenidos .....</b>  | <b>III</b>  |
| <b>Índice de tablas.....</b>  | <b>IX</b>   |
| <b>Índice de figuras .....</b>  | <b>XI</b>   |
| <b>Abreviaturas .....</b>   | <b>XV</b>   |
| <b>Resumen .....</b>  | <b>XVII</b> |
| <b>Capítulo I – Introducción.....</b>   | <b>1</b>    |
| 1.    Biotecnología en la industria .....   | 3           |
| 1.1.  Enzimas en procesos industriales .....  | 4           |
| 2.    Inmovilización de proteínas.....  | 5           |
| 2.1.  Generalidades.....  | 5           |
| 2.2.  Inmovilización covalente reversible.....  | 7           |
| 2.2.1  Obtención de soportes activados con grupos tiolsulfonato .....                                   | 7           |
| 2.2.2  Inmovilización de proteínas en soportes tiol-reactivos .....                                     | 8           |
| 3.    Lacasas.....  | 10          |
| 3.1.  Generalidades.....  | 10          |
| 3.2.  Sitio activo y actividad catalítica .....   | 11          |
| 3.3.  Sistema lacasa-mediador (SLM) .....   | 13          |
| 3.4.  Aplicaciones de la enzima lacasa y el sistema lacasa-mediador .....                               | 17          |
| 4.    Producción de lacasa nativa por basidiomicetes de la podredumbre blanca .....                     | 20          |
| 4.1.  Generalidades.....  | 20          |
| 4.2.  Fermentación en estado sólido y semi-sólido para la producción de enzimas .....                   | 21          |
| 5.    Colorantes sintéticos.....  | 23          |
| 5.1.  Denominación y clasificación.....   | 23          |
| 5.2.  Contaminación causada por colorantes y tratamientos de efluentes coloreados .....                 | 25          |
| 6.    Evaluación ecotoxicológica del efecto de contaminantes en el ambiente .....                       | 28          |
| 6.1.  Generalidades.....  | 28          |
| 6.2.  Bioensayo de toxicidad aguda con semillas de Lactuca sativa .....                                 | 31          |
| 6.3.  Bioensayo de toxicidad aguda con el crustáceo Daphnia magna .....                                 | 34          |
| 6.4.  Bioensayo de toxicidad aguda con la bacteria Vibrio fischeri: Microtox® .....                     | 35          |
| <b>Capítulo II - Producción de lacasa por basidiomicetes de la podredumbre blanca de la madera.....</b> | <b>37</b>   |
| <b>1. Objetivos.....</b>  | <b>39</b>   |
| <b>2. Metodología.....</b>  | <b>40</b>   |
| 2.1    Determinación de actividad enzimática .....  | 40          |
| 2.1.1.  Actividad lacasa .....  | 40          |
| 2.1.2.  Actividad lignina peroxidasa (LiP) .....  | 41          |
| 2.1.3.  Actividad manganeso peroxidasa (MnP) .....  | 41          |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.2       | Selección de cepas de basidiomicetes aislados en Uruguay .....   | 41        |
| 2.3       | Optimización de la producción de lacasa por <i>Trametes villosa</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i> en cultivo sumergido .....                                  | 42        |
| 2.3.1.    | <i>Trametes villosa</i> .....  | 42        |
| 2.3.2.    | <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....   | 43        |
| 2.4.      | Optimización de la producción de lacasa por fermentación en estado semi-sólido (FSS).....  | 45        |
| 2.4.1.    | Producción de lacasa por <i>Pycnoporus sanguineus</i> por FSS .....  | 45        |
| 2.4.1.1   | Estudio exploratorio.....  | 46        |
| 2.4.1.2   | Diseño factorial completo 2 <sup>4</sup> .....   | 47        |
| 2.4.1.3   | Evaluación del efecto de inductores en la producción de lacasa .....   | 47        |
| 2.4.2.    | Producción de lacasa por <i>Trametes villosa</i> por FSS .....   | 48        |
| 2.4.2.1   | Diseño factorial exploratorio .....  | 48        |
| 2.4.2.2   | Primer diseño factorial de optimización .....  | 49        |
| 2.4.2.3   | Segundo diseño factorial de optimización .....   | 50        |
| <b>3.</b> | <b>Resultados y discusión. ....</b>  | <b>51</b> |
| 3.1.      | Selección de cepas de basidiomicetes aislados en Uruguay.....  | 51        |
| 3.2.      | Optimización de la producción de lacasa en cultivo sumergido por cepas de <i>Trametes villosa</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....                         | 52        |
| 3.2.1.    | <i>Trametes villosa</i> .....  | 52        |
| 3.2.2     | <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....   | 53        |
| 3.3.      | Optimización de la producción de lacasa por fermentación en estado semi-sólido (FSS) por cepas de <i>Pycnoporus sanguineus</i> y <i>Trametes villosa</i> ..... | 55        |
| 3.3.1.    | <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....   | 55        |
| 3.3.1.1   | Estudio exploratorio (Diseño factorial fraccionado 2 <sup>8-4</sup> ).....   | 55        |
| 3.3.1.2   | Experimento factorial completo 2 <sup>4</sup> .....  | 57        |
| 3.3.1.3   | Evaluación del efecto de inductores en la producción de lacasa .....   | 60        |
| 3.3.1.4   | Producción de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa .....  | 62        |
| 3.3.2.    | <i>Trametes villosa</i> .....  | 62        |
| 3.3.2.1   | Diseño factorial exploratorio .....  | 62        |
| 3.3.2.2   | Primer diseño factorial de optimización .....  | 65        |
| 3.3.2.3   | Segundo diseño factorial de optimización .....   | 68        |
| 3.4       | Discusión .....  | 70        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Capítulo III - Purificación y caracterización de lacasas producidas por <i>Trametes villosa</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i>.....</b> | <b>75</b> |
| <b>1. Objetivos.....</b>   | <b>77</b> |
| <b>2. Metodología.....</b>   | <b>78</b> |
| 2.1 Control electroforético .....  | 78        |
| 2.2 Purificación de lacasa de <i>Trametes villosa</i> .....  | 78        |
| 2.2.1. Protocolo de purificación I: a- Precipitación salina, b- Cromatografía de interacción hidrofóbica .....                             | 79        |
| 2.2.2. Protocolo de purificación II: a- Precipitación salina, b- Intercambio Iónico .....  | 80        |

|  |            |
|--|------------|
| 2.2.3. Protocolo de purificación III: a- Precipitación salina, b- Cromatografía de interacción hidrofóbica, c- Cromatografía de intercambio iónico .....         | 80         |
| 2.3 Caracterización de lacasa de <i>Trametes villosa</i> .....   | 81         |
| 2.4 Purificación de lacasa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....   | 82         |
| 2.5 Caracterización de lacasa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....  | 83         |
| <b>3. Resultados y discusión.....</b>  | <b>84</b>  |
| 3.1. Purificación y caracterización de lacasa de <i>Trametes villosa</i> .....   | 84         |
| 3.1.1. Protocolo I de purificación de lacasa de <i>T. villosa</i> (Precipitación salina – Cromatografía de interacción hidrofóbica).....                         | 84         |
| 3.1.2. Protocolo II de purificación de lacasa de <i>T. villosa</i> (Precipitación salina – Intercambio iónico) .....   | 85         |
| 3.1.3. Protocolo III de purificación de lacasa de <i>T. villosa</i> (Precipitación salina – Cromatografía de interacción hidrofóbica – Intercambio iónico) ..... | 86         |
| 3.1.4. Caracterización de lacasa de <i>Trametes villosa</i> .....  | 87         |
| 3.2. Purificación y caracterización de lacasa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....  | 90         |
| 3.2.1. Purificación de lacasa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....  | 90         |
| 3.2.2. Caracterización de lacasa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....   | 91         |
| 3.3. Discusión .....   | 94         |
| <b>Capítulo IV - Inmovilización de lacasas fúngicas mediante el método covalente reversible .....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>1. Objetivos .....</b>  | <b>101</b> |
| <b>2. Metodología .....</b>  | <b>102</b> |
| 2.1 Determinación de actividad enzimática .....  | 102        |
| 2.2 Determinación de concentración de proteínas .....  | 102        |
| 2.3 Síntesis de tiolsulfonato-agarosa (TSI-agarosa) .....  | 102        |
| 2.3.1 Síntesis de tiol-agarosa.....  | 102        |
| 2.3.2 Preparación de tiolsulfonato-agarosa .....   | 103        |
| 2.3.3 Título de estructuras reactivas en el derivado TSI-agarosa .....   | 103        |
| Estudios realizados para la lacasa de <i>Trametes villosa</i> .....  | 104        |
| 2.4 Metodologías para la obtención de grupos tiol expuestos en la lacasa de <i>T. villosa</i> semi-purificada (E <sub>sp</sub> ) .....                           | 104        |
| 2.4.1 Reducción de enlaces disulfuro con ditiotreitól .....  | 104        |
| 2.4.2 Introducción de grupos tiol <i>de novo</i> .....   | 105        |
| 2.4.3 Título de grupos tiol .....  | 106        |
| 2.5 Inmovilización de lacasa de <i>T. villosa</i> semi-purificada (Esp) en TSI-agarosa .....   | 106        |
| 2.5.1. Reversibilidad de la unión .....  | 107        |
| 2.6 Inmovilización de lacasa de <i>T. villosa</i> purificada (Ep) .....  | 107        |
| 2.6.1 Efecto del SPDP en la tiolación .....  | 107        |
| 2.6.2 Efecto del pH en la inmovilización .....   | 107        |
| 2.7 Caracterización de la enzima inmovilizada de <i>Trametes villosa</i> (Esp) .....   | 108        |
| 2.7.1 Determinación de pH óptimo .....   | 108        |
| 2.7.2 Efecto del pH en la estabilidad enzimática .....   | 108        |
| 2.7.3. Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática .....   | 108        |

|   |            |
|---|------------|
| 2.7.4. Determinación de parámetros cinéticos .....  | 109        |
| 2.7.5. Evaluación de la capacidad de reutilización del biocatalizador .....   | 109        |
| Estudios realizados para la lacasa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....  | 110        |
| 2.8 Inmovilización de lacasa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....  | 110        |
| 2.8.1. Reducción de la enzima nativa de <i>P. sanguineus</i> e inmovilización en TSI-agarosa<br>.....   | 110        |
| 2.8.2. Introducción de grupos tiol <i>de novo</i> e inmovilización de lacasa de <i>P. sanguineus</i><br>.....                                     | 110        |
| <b>3. Resultados y discusión .....</b>  | <b>111</b> |
| 3.1. Inmovilización de lacasa de <i>Trametes villosa</i> semi-purificada (Esp) .....  | 111        |
| 3.1.1. Inmovilización de lacasa nativa .....  | 111        |
| 3.1.2. Inmovilización de lacasa reducida con DTT .....  | 111        |
| 3.1.3. Introducción de grupos tiol <i>de novo</i> e inmovilización .....  | 111        |
| 3.1.3.1. Efecto de la carga enzimática en el rendimiento de inmovilización .....  | 112        |
| 3.1.3.2. Reversibilidad de la unión proteína-soporte .....  | 112        |
| 3.2. Inmovilización de lacasa de <i>Trametes villosa</i> purificada (Ep) .....  | 113        |
| 3.2.1. Efecto de la cantidad de SPDP utilizada en la tiolación .....  | 113        |
| 3.2.2. Efecto del pH de inmovilización .....  | 114        |
| 3.3 Caracterización de la lacasa inmovilizada de <i>T. villosa</i> (Esp tiolada) y<br>comparación con la correspondiente enzima en solución ..... | 115        |
| 3.3.1 Rango de pH óptimo .....  | 115        |
| 3.3.2 Efecto del pH en la estabilidad del derivado enzimático .....   | 115        |
| 3.3.3 Efecto de la temperatura en la estabilidad del derivado enzimático .....  | 116        |
| 3.3.4 Determinación de parámetros cinéticos .....   | 117        |
| 3.3.5 Estudio de la estabilidad operacional (reutilización) del derivado .....  | 118        |
| 3.4. Inmovilización de lacasa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....   | 118        |
| 3.4.1 Inmovilización de la enzima nativa .....  | 118        |
| 3.4.2 Reducción e inmovilización .....  | 118        |
| 3.4.3 Introducción de grupos tiol <i>de novo</i> e inmovilización de lacasa de<br><i>P. sanguineus</i> .....                                      | 119        |
| 3.5 Discusión .....   | 120        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Capítulo V - Degradación de colorantes sintéticos mediante lacasas fúngicas solubles e<br/>inmovilizadas .....</b> | <b>123</b> |
| <b>1. Objetivos .....</b>   | <b>125</b> |
| <b>2. Metodología .....</b>   | <b>126</b> |
| 2.1 Cuantificación de la degradación de colorantes sintéticos .....   | 126        |
| 2.2 Degradación de colorantes sintéticos con lacasa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....                             | 126        |
| 2.3 Degradación de colorantes sintéticos con lacasa de <i>Trametes villosa</i> .....                                  | 127        |
| 2.3.1. Degradación de un colorante antraquinónico con lacasa inmovilizada de<br><i>Trametes villosa</i> .....         | 127        |
| 2.3.2 Degradación de colorantes azoicos con lacasa de <i>Trametes villosa</i> .....                                   | 127        |
| 2.3.2.1 Selección del sistema lacasa-mediador para la decoloración de AR88 y<br>AB172.....                            | 128        |

|  |            |
|--|------------|
| 2.3.2.2. Decoloración de AR88 y AB172 con el derivado lacasa-TSI-agarosa.....  | 128        |
| 2.3.2.3. Estabilidad operacional del derivado TSI-lacasa de <i>Trametes villosa</i> en la degradación de colorantes azoicos .....                  | 128        |
| 2.3.2.4 Estudio del efecto de la concentración de mediador redox en la reacción de decoloración con enzima inmovilizada de <i>T. villosa</i> ..... | 129        |
| 2.3.2.5. Análisis de las reacciones de decoloración de AR88 y AB172 por HPLC .....   | 129        |
| <b>3. Resultados y discusión .....</b>   | <b>131</b> |
| 3.1. Degradación de colorantes sintéticos con lacasa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....   | 131        |
| 3.1.1 Discusión.....   | 135        |
| 3.2 Degradación de colorantes sintéticos con lacasa de <i>Trametes villosa</i> .....   | 137        |
| 3.2.1 Degradación de un colorante antraquinónico con lacasa inmovilizada de <i>T. villosa</i> .....  | 137        |
| 3.2.1.1 Discusión.....   | 139        |
| 3.2.2 Degradación de colorantes azoicos con lacasa de <i>Trametes villosa</i> .....  | 140        |
| 3.2.2.1 Decoloración de AB172 y AR88 con lacasa soluble de <i>Trametes villosa</i> y mediadores redox .....  | 140        |
| 3.2.2.2 Decoloración de AR88 y AB172 con el derivado lacasa-TSI-agarosa .....  | 141        |
| 3.2.2.3 Análisis de las reacciones de degradación de AR88 y AB172 por HPLC .....   | 144        |
| 3.2.2.4 Discusión.....   | 150        |

## Capítulo VI – Evaluación ecotoxicológica del tratamiento enzimático de colorantes

|  |            |
|--|------------|
| azoicos con lacasa .....   | 153        |
| <b>1. Objetivos .....</b>  | <b>155</b> |
| <b>2. Metodología .....</b>  | <b>156</b> |
| 2.1 Bioensayos de toxicidad aguda seleccionados .....  | 156        |
| 2.2 Muestras analizadas .....  | 156        |
| 2.3 Reacciones de decoloración .....   | 157        |
| 2.4 Ensayo de toxicidad aguda con semillas de <i>Lactuca sativa L</i> .....                          | 157        |
| 2.4.1. Organismos de prueba .....  | 157        |
| 2.4.2. Control negativo .....  | 158        |
| 2.4.3. Preparación de las diluciones seriadas .....  | 158        |
| 2.4.4. Procedimiento del ensayo .....  | 158        |
| 2.4.5. Medida de los puntos finales para la evaluación de la fitotoxicidad .....                     | 159        |
| 2.4.6. Cálculos para la expresión de los resultados .....  | 161        |
| 2.5. Ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i> Straus ( <i>Cladocera, Crustacea</i> ) ..... | 162        |
| 2.5.1. Organismo de prueba .....   | 162        |
| 2.5.2. Control negativo .....  | 163        |
| 2.5.3. Preparación de las diluciones seriadas de las soluciones problema .....                       | 164        |
| 2.5.4. Procedimiento de ensayo .....   | 164        |
| 2.5.5. Medida del punto final .....  | 165        |
| 2.5.6. Expresión de resultados .....   | 165        |
| 2.6. Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria luminiscente <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) ..... | 166        |
| 2.6.1. Organismo de prueba .....   | 166        |

|   |            |
|---|------------|
| 2.6.2. Procedimiento de ensayo .....  | 166        |
| 2.6.3. Preparación de la muestra .....  | 167        |
| 2.6.4. Control positivo .....   | 167        |
| 2.6.5. Expresión de los resultados .....  | 167        |
| <b>3. Resultados y discusión .....</b>  | <b>168</b> |
| 3.1. Resultados para el colorante Acid Black 172 .....  | 168        |
| 3.2. Resultados para el colorante Acid Red 88 .....   | 172        |
| 3.3. Discusión .....  | 174        |
| <b>Conclusiones y perspectivas .....</b>  | <b>179</b> |
| <b>Bibliografía .....</b>   | <b>183</b> |
| <b>Anexos .....</b>   | <b>203</b> |
| ANEXO II – 1. Diseño factorial: producción de lacasa por <i>P. sanguineus</i> en cultivo sumergido.....                                       | 204        |
| ANEXO II – 2. Diseño factorial fraccionado (estudio exploratorio): producción de lacasa por <i>P. sanguineus</i> en cultivo semi-sólido ..... | 205        |
| ANEXO II – 3 A. Diseño factorial completo 24 - producción de lacasa por <i>P. sanguineus</i> en cultivo semi-sólido.....                      | 206        |
| ANEXO II – 3 B. Diseño factorial completo 24 - producción de lacasa por <i>P. sanguineus</i> en cultivo semi-sólido.....                      | 207        |
| ANEXO II – 4. Diseño factorial exploratorio: producción de lacasa por <i>T. villosa</i> en cultivo semi-sólido.....                           | 208        |
| ANEXO II – 5. Primer Diseño factorial de optimización: producción de lacasa por <i>T. villosa</i> en cultivo semi-sólido. ....                | 209        |
| ANEXO II – 6. Segundo Diseño factorial de optimización: producción de lacasa por <i>T. villosa</i> en cultivo semi-sólido. ....               | 211        |
| ANEXO VI-1. Estudio de condiciones para el ensayo de fitotoxicidad aguda con semillas de <i>Lactuca sativa</i> .....                          | 212        |
| ANEXO VI-2. Procedimiento del Bioensayo Microtox® empleado en el Laboratorio Ambiental de DINAMA .....  | 215        |
| ANEXO VI - 3. Hoja de datos de seguridad del colorante Acid Black 172 .....   | 223        |
| ANEXO VI – 4 A. Hojas de datos de seguridad del colorante Acid Red 88. Fabricante: SIGMA-ALDRICH (Producto número 195227) .....               | 224        |
| ANEXO VI – 4 B. Hojas de datos de seguridad del colorante Acid Red 88. Fabricante: MP Biomedicals .....                                       | 225        |
| <b>Trabajos publicados en base a los resultados obtenidos durante esta tesis .....</b>  | <b>226</b> |

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla I-1</b> Protocolos estandarizados para ensayos de toxicidad aguda con <i>Lactuca sativa</i> , <i>Daphnia magna</i> y <i>Vibrio fischeri</i> .....    | 31 |
| <b>Tabla II-1</b> - Concentraciones de componentes agregados al medio basal para el experimento factorial en cultivo sumergido con <i>P. sanguineus</i> ..... | 44 |
| <b>Tabla II-2.</b> Niveles de las variables independientes del diseño factorial fraccionado $2^{8-4}$ para <i>P. sanguineus</i> (FSS).....                    | 46 |
| <b>Tabla II-3.</b> Niveles de variables independientes estudiadas en el diseño factorial completo $2^4$ para <i>P. sanguineus</i> (FSS).....                  | 47 |
| <b>Tabla II-4.</b> Variables estudiadas en el diseño factorial exploratorio para <i>T. villosa</i> .....  | 49 |
| <b>Tabla II-5.</b> Factores y niveles utilizados en el segundo diseño factorial de optimización para <i>T. villosa</i> en FSS.....                            | 49 |
| <b>Tabla II-6.</b> Concentraciones de glucosa y peptona utilizadas en el diseño factorial completo.....   | 50 |
| <b>Tabla II-7.</b> Estudio de la producción de lacasas por cepas nativas de basidiomicetes aisladas en Uruguay.....   | 51 |
| <b>Tabla II-8.</b> ANOVA para el diseño factorial de <i>P. sanguineus</i> en cultivo sumergido.....   | 54 |
| <b>Tabla II-9.</b> Comparación del efecto inductor de los compuestos estudiados.....  | 55 |
| <b>Tabla II-10.</b> Coeficientes de regresión del modelo al incluir solo la variable urea.....  | 56 |
| <b>Tabla II-11.</b> Resultados del modelo para el nivel inferior de la variable urea.....   | 56 |
| <b>Tabla II-12.</b> Resultados del ANOVA del modelo de regresión múltiple.....  | 58 |
| <b>Tabla II-13.</b> Coeficientes de regresión y su significancia para el modelo ajustado.....   | 58 |
| <b>Tabla II-14.</b> ANOVA para el diseño factorial exploratorio ( <i>T. villosa</i> ).....  | 63 |
| <b>Tabla II-15.</b> Comparación de medias para los factores en las interacciones Sustrato*Fuente de N (A) y Fuente de C*Fuente de N (B).....                  | 64 |
| <b>Tabla II-16.</b> Análisis de varianza del modelo ASReml para el primer diseño factorial de optimización para <i>T. villosa</i> en FSS.....                 | 65 |
| <b>Tabla II-17.</b> Pruebas para cada nivel de ambos factores en la interacción GLU*PEP.....  | 68 |
| <b>Tabla II-18.</b> ANOVA para niveles de peptona mayores a cero.....   | 69 |
| <b>Tabla II-19.</b> Coeficientes estimados para el modelo de regresión.....   | 70 |
| <b>Tabla III-1.</b> Condiciones ensayadas en la cromatografía de interacción hidrofóbica (purificación de lacasa de <i>T. villosa</i> ).....                  | 79 |

---

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla III-2.</b> Comparación cromatografías de interacción hidrofóbica (HIC) del Protocolo I para la purificación de lacasa de <i>T. villosa</i> .....      | 84  |
| <b>Tabla III-3.</b> Cuadro de purificación de lacasa de <i>T. villosa</i> (Protocolo III) .....  | 87  |
| <b>Tabla III-4.</b> Purificación de lacasa de <i>P. sanguineus</i> .....   | 90  |
| <b>Tabla III-5.</b> Efecto del sistema tampón en la estabilidad (24 h, 4°C) de la lacasa de <i>P. sanguineus</i> a distintos pH.....                           | 93  |
| <br>   |     |
| <b>Tabla IV-1.</b> Inmovilización de lacasa de <i>T. villosa</i> en TSI-agarosa .....  | 112 |
| <b>Tabla IV- 2.</b> Inmovilización de lacasa de <i>Trametes villosa</i> (Ep) tiolada con distintas cantidades de SPDP.....                                     | 113 |
| <b>Tabla IV- 3.</b> Efecto del pH en la inmovilización de lacasa de <i>T. villosa</i> en TSI-agarosa.....  | 114 |
| <b>Tabla IV - 4.</b> Parámetros cinéticos para la enzima nativa e inmovilizada.....  | 117 |
| <b>Tabla IV- 5.</b> Inmovilización de lacasa reducida de <i>P. sanguineus</i> en TSI-agarosa.....  | 119 |
| <br>   |     |
| <b>Tabla V-1.</b> Colorantes utilizados en los distintos ensayos realizados.....   | 130 |
| <br>   |     |
| <b>Tabla VI -1.</b> Análisis físico-químico del agua mineral envasada (natural, sin gasificar) informado por el fabricante (Análisis N° 1390595).....          | 164 |
| <b>Tabla VI -2.</b> Clasificación de la muestra según el valor de CE50 del ensayo Microtox® .....  | 167 |
| <b>Tabla VI -3.</b> Inhibición de la germinación en el bioensayo de <i>L. sativa</i> .....   | 168 |
| <b>Tabla VI -4.</b> Clasificación de las muestras analizadas según el valor de CE50 y un intervalo de confianza de 95 %, obtenido en el ensayo Microtox® ..... | 171 |

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura I-1.</b> Descripción del método de inmovilización covalente reversible.....  | 8  |
| <b>Figura I-2.</b> Síntesis de un soporte activado con óxidos de disulfuro. ....   | 9  |
| <b>Figura I-3.</b> Estructura tridimensional de lacasa nativa del basidiomicete <i>Trametes hirsuta</i> . ....   | 11 |
| <b>Figura I-4</b> Modelo de sitio activo de lacasa y representación del ciclo catalítico.....  | 13 |
| <b>Figura I-5.</b> Sistema lacasa-mediador.....  | 14 |
| <b>Figura I-6.</b> Ejemplos de mediadores sintéticos y naturales usados en el sistema lacasa-mediador.....   | 16 |
| <b>Figura I-7.</b> Oxidación de un compuesto modelo de lignina no fenólico mediante el sistema lacasa-mediador con mediadores tipo N-OH o fenólicos.....       | 17 |
| <b>Figura I-8.</b> Ejemplo de aplicación sintética de la lacasa.....   | 19 |
| <b>Figura I-9.</b> Semilla y plántula de <i>L. sativa</i> .....  | 33 |
| <b>Figura I-10.</b> <i>Daphnia magna</i> Straus.....   | 34 |
| <b>Figura I-11.</b> Bioensayo Microtox® .....  | 36 |
| <br>   |    |
| <b>Figura II-1.</b> Oxidación del sustrato artificial ABTS por lacasa en el ensayo de actividad.....   | 40 |
| <b>Figura II-2.</b> Estructura de los compuestos fenólicos utilizados como inductores.....   | 43 |
| <b>Figura II-3.</b> Cultivo en fase semi-sólida de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....  | 46 |
| <b>Figura II-4.</b> Producción de lacasa por <i>T. villosa</i> en cultivo sumergido. Actividad registrada en cada día del cultivo en los medios EM y EMCu..... | 52 |
| <b>Figura II-5.</b> Efecto de inductores en la producción de lacasa por <i>T.villosa</i> en medio EM. ....   | 53 |
| <b>Figura II-6.</b> Producción de lacasa por <i>P. sanguinesus</i> en cultivo sumergido.....   | 54 |
| <b>Figura II-7.</b> Efecto sobre la producción de lacasa (ln(act)) de interacciones entre 3 factores.....  | 59 |
| <b>Figura II-8.</b> Efecto de inductores en la producción de lacasa por <i>P. sanguineus</i> en cultivo semisólido.....  | 61 |
| <b>Figura II-9.</b> Efecto del agregado de cobre (0.5 mM) en diferentes etapas del cultivo (días 0, 3 y 7).....  | 61 |
| <b>Figura II-10.</b> Efecto de los factores en las interacciones del experimento factorial exploratorio para <i>T. villosa</i> .....                           | 63 |
| <b>Figura II- 11.</b> Efecto de los factores glucosa y peptona para el sustrato Corteza de <i>E. grandis</i> molida.....                                       | 66 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura II-12.</b> Efecto de los factores glucosa y peptona para el sustrato Corteza de <i>E. grandis</i> troceada. ....   | 67  |
| <b>Figura II- 13.</b> Efecto de los factores glucosa y peptona para el sustrato Madera de <i>E. grandis</i> molida.....  | 67  |
| <b>Figura II-14.</b> Superficie de respuesta para el modelo del diseño factorial completo, con variación de concentración de glucosa y peptona para <i>T. villosa</i> por FSS.....   | 70  |
| <b>Figura III-1.</b> Electroforesis SDS-PAGE: evaluación del Protocolo I – HIC A para la purificación de lacasa de <i>T. villosa</i> .....   | 85  |
| <b>Figura III-2.</b> Perfil de elución de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex® (purificación de lacasa de <i>T. villosa</i> , Protocolo III).....   | 86  |
| <b>Figura III-3.</b> Electroforesis SDS-PAGE: evaluación de Protocolo III para la purificación de lacasa de <i>T. villosa</i> .....  | 87  |
| <b>Figura III-4.</b> Isoelectroenfoque para la determinación del punto isoeléctrico (pI) de lacasa de <i>T. villosa</i> purificada.....  | 88  |
| <b>Figura III-5.</b> Caracterización de lacasa de <i>T. villosa</i> . A. Determinación del rango de pH óptimo. B. Estabilidad frente a pH (24 h, 4 °C). C. Estabilidad térmica (1 h, pH 6) D. Determinación de constantes cinéticas (linealización de Lineweaver-Burk).....      | 89  |
| <b>Figura III-6.</b> Caracterización de lacasa de <i>T. villosa</i> . Determinación de la constante $K_M$ para ABTS por el método gráfico directo de Eisenthal y Cornish-Bowden.....   | 89  |
| <b>Figura III-7.</b> Perfil de elución por aumento de fuerza iónica en Intercambio Iónico.....   | 90  |
| <b>Figura III-8.</b> Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Evaluación de la purificación de lacasa de <i>P. sanguineus</i> .....   | 91  |
| <b>Figura III-9.</b> Isoelectroenfoque para la determinación del punto isoeléctrico (pI) de la lacasa de <i>P. sanguineus</i> .....  | 91  |
| <b>Figura III-10.</b> Caracterización de lacasa de <i>P. sanguineus</i> . A. Estabilidad frente a pH (24 h, 4 °C). B. Estabilidad térmica (1 h, pH 6). C. Determinación del rango de pH óptimo. D. Determinación de constantes cinéticas (linealización de Lineweaver-Burk)..... | 92  |
| <b>Figura III-11.</b> Caracterización de lacasa de <i>P. sanguineus</i> . Determinación de la constante $K_M$ para ABTS mediante el método gráfico directo de Eisenthal y Cornish-Bowden.....  | 93  |
| <b>Figura IV-1.</b> Tratamientos para la generación de grupos tiol en la enzima.....   | 105 |
| <b>Figura IV-2.</b> Reacción de intercambio tiol-disulfuro.....  | 106 |
| <b>Figura IV-3.</b> Efecto del pH en la actividad catalítica de la lacasa. ....  | 115 |
| <b>Figura IV-4.</b> Efecto del pH en la estabilidad de la lacasa. ....   | 116 |
| <b>Figura IV- 5.</b> Efecto de la temperatura en la estabilidad de la lacasa. ....   | 117 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura IV-6.</b> Estabilidad operacional del derivado insoluble lacasa-TSI.....   | 118 |
| <b>Figura V-1.</b> Mediadores redox utilizados en las reacciones de degradación de colorantes.....   | 129 |
| <b>Figura V-2.</b> Estudio de la decoloración de AR88 con lacasa de <i>P. sanguineus</i> y distintos mediadores redox (1.0 y 0.5 mM).....  | 131 |
| <b>Figura V-3.</b> Efecto de la concentración de lacasa de <i>P. sanguineus</i> en la decoloración de AR88 con MS (1.0 mM) como mediador.....  | 132 |
| <b>Figura V-4.</b> Estudio de la decoloración de RB5 con lacasa de <i>P. sanguineus</i> (1000 UE/L) y distintos mediadores redox (1.0 y 0.5 mM).....   | 133 |
| <b>Figura V-5.</b> Estudio de la decoloración de LG con lacasa de <i>P. sanguineus</i> (1000 UE/L) y distintos mediadores redox (1.0 y 0.5 mM).....  | 134 |
| <b>Figura V-6.</b> Decoloración de Acid Red 88, Reactive Black 5 y Lanaset Grey G con lacasa no purificada de <i>P. sanguineus</i> y mediadores redox (0.5 mM) en 24 h a pH 4.8 y 22 °C.....   | 136 |
| <b>Figura V-7.</b> Reacción de decoloración de RBBR con lacasa de <i>T. villosa</i> parcialmente purificada inmovilizada en TSI-agarosa.....   | 137 |
| <b>Figura V-8.</b> Cinética de decoloración de RBBR con el derivado lacasa-TSI. Decoloración calculada para muestras tomadas a diferentes tiempos.....   | 137 |
| <b>Figura V-9.</b> Análisis de la reacción de decoloración de RBBR por HPLC-DAD.....   | 138 |
| <b>Figura V-10.</b> Decoloración de Acid Red 88 ( <i>izq.</i> ) y Acid Black 172 ( <i>der.</i> ) con lacasa de <i>T. villosa</i> con mediadores redox.....   | 140 |
| <b>Figura V-11 .</b> Decoloración de Acid Red 88 y Acid Black 172 (100 ppm) con lacasa de <i>Trametes villosa</i> soluble e inmovilizada (100 UE/L), sin o con mediador redox (1.0 mM), y control de adsorción en el soporte utilizado para la inmovilización..... | 141 |
| <b>Figura V-12.</b> Reacciones de decoloración de AR88 (A1) y AB172 (B1).....  | 142 |
| <b>Figura V-13.</b> Reutilización del derivado lacasa-TSI-agarosa en la decoloración de AR88 con Vai 1.0 mM ( <i>izq.</i> ) y AB172 con AVi 1.0 mM ( <i>der.</i> ). .....  | 142 |
| <b>Figura V-14.</b> Decoloración de AR88 con el derivado lacasa-TSI-agarosa y concentraciones variables de vainillina (24 h de reacción).....  | 143 |
| <b>Figura V-15.</b> Decoloración de AB172 con el derivado lacasa-TSI-agarosa y concentraciones variables de ácido violúrico para 24 y 40 h de reacción.....  | 143 |
| <b>Figura V-16.</b> Decoloración de AB172 con el derivado lacasa-TSI-agarosa y ácido violúrico (0.00 a 1.00 mM), para 24 h (a) y 40 h (b) de reacción.....   | 144 |
| <b>Figura V-17.</b> Cromatogramas superpuestos de AR88 ( $t_R$ 14.3 min), vainillina ( $t_R$ 6 min) y mezcla de reacción a 24 horas ( $t_R$ 4-6.5 min), registrados a 254 nm.....  | 144 |

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura V-18.</b> Cromatograma de los productos de degradación de Acid Red 88 (mezcla de reacción 24 h), registrado a 254 y 500 nm.....   | 145 |
| <b>Figura V-19. A</b> Cromatogramas superpuestos de: mezcla de reacción con los productos de degradación de Acid Red 88 y de vainillina (a 254 nm y 300 nm). B. Ampliación de A entre 4 y 8 minutos.....  | 146 |
| <b>Figura V-20.</b> Cromatogramas superpuestos de (de abajo a arriba): la solución de Acid Black 172 (572 y 254 nm), mezcla de productos de reacción (572 y 254 nm) y ácido violúrico “AVi” (254 nm)..... | 147 |
| <b>Figura V-21.</b> Espectros de absorción de los 3 picos del cromatograma de AB172 que absorben a 572 nm, con $t_R = 22.3$ (A), 24.5 (B) y 25.7 (C) minutos.....   | 148 |
| <b>Figura V-22.</b> Isomería $N\alpha/N\beta$ originada en la síntesis de complejos de cromo con ligandos azoicos asimétricos.....  | 149 |
| <br>  |     |
| <b>Figura VI-1.</b> Ensayo de toxicidad aguda con <i>L. sativa</i> .....  | 160 |
| <b>Figura VI-2.</b> Reproducción de <i>Daphnia magna</i> .....  | 163 |
| <b>Figura VI-3.</b> Manipulación de neonatos de <i>D. magna</i> para la ejecución del ensayo y su observación al finalizar la exposición.....   | 163 |
| <b>Figura VI -4.</b> Efecto de las muestras “AB172”, “productos de la reacción de degradación de AB172” y “Ácido violúrico” en el desarrollo de plántulas de <i>L. sativa var crespa</i> .....            | 169 |
| <b>Figura VI -5.</b> Resultado del bioensayo con <i>D. magna</i> (48 h) para las muestras “AB172”, “ácido violúrico” y “productos de degradación de AB172” .....  | 171 |
| <b>Figura VI -6.</b> Efecto de las muestras “AR88”, “productos de la reacción de degradación de AR88” y “Vainillina” en el desarrollo de plántulas de <i>L. sativa var crespa</i> .....                   | 173 |

---

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

---

**AB172** - Acid Black 172

**ABTS** - ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

**AcS** - acetosiringona

**AcV** - acetovainillona

**AE** - actividad específica

**ANOVA** - análisis de varianza

**APHA** - Asociación Americana para la Salud Pública

**AR88** - Acid red 88

**AVi** - ácido violúrico

**BCA** - ácido bicinconínico

**CE50** - concentración efectiva media

**CI50** - concentración inhibitoria media

**C.I.** - Colour Index

**CIGN** - número genérico del Colour Index

**CICN** - número de constitución del Colour Index

**CL50** - concentración letal media

**DAD** - detector de arreglo de diodos

**DEAE** - dietilaminoetil (intercambiador aniónico)

**DINAMA** - Dirección Nacional de Medio Ambiente

**DTNB** - ácido ditionitrobenzoico

**DTT** - ditionitrotol

**EC** - Agencia Ambiental de Canadá (Environment Canada)

**EM** - medio extracto de malta

**E<sub>p</sub>** - enzima purificada

**E<sub>sp</sub>** - enzima semi-purificada

**ET** - mecanismo de transferencia de electrones

**F<sub>p</sub>** - factor de purificación

**FSS** - fermentación en estado semi-sólido

**HAT** - mecanismo de transferencia de radical hidrógeno

**HBT** - N-hidroxibenzotriazol

**HIC** - cromatografía de interacción hidrofóbica

**HPLC** - cromatografía líquida de alta performance

**IEF** - isoelectroenfoque

---

**ISO** - Organismo Internacional de normalización

**K<sub>M</sub>** - constante de Michaelis-Menten

**LG** - Lanaset Grey G

**LiP** - lignina peroxidasa

**LOEC** - menor concentración a la cual se observa efecto

**MMPP** - monoperoxifitalato de magnesio

**MnP** - manganeso peroxidasa

**MS** - metilsiringato

**MOVOTMA** - Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente

**NOEC** - mayor concentración a la cual no se observa efecto

**OECD** - Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica

**OSE** - Obras Sanitarias del Estado

**pI** - punto isoeléctrico

**RB5** - Reactive Black 5

**RBBR** - Remazol Brilliant Blue R (Reactive Blue 19)

**SDS-PAGE** - electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida

**SPDP** - N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato

**TEMPO** - 2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oxi

**TNB** - ácido 2-nitro-5-tiobenzoico

**t<sub>R</sub>** - tiempo de retención

**TSI** - tiolsulfinato

**UE** - unidad de enzima

**UEt** - unidades de enzima totales

**US EPA** - Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

**Vai** - vainillina

**V<sub>máx</sub>** - velocidad máxima

# Resumen



Los colorantes sintéticos son ampliamente utilizados en la industria textil. La presencia de estos compuestos recalcitrantes en los efluentes industriales representa un problema ambiental si no se realiza un tratamiento previo para su eliminación antes de su vertido en los cursos de agua. Estos xenobióticos presentan una elevada resistencia a la degradación química y/o biológica, causan la disminución de entrada de luz en ecosistemas acuáticos retardando la fotosíntesis y modifican la solubilidad de gases en el agua afectando el desarrollo de organismos acuáticos. Adicionalmente, muchos son tóxicos, carcinógenos o mutagénicos.

La aplicación de lacasas en el tratamiento enzimático de colorantes utilizados en la industria textil surge como alternativa a los tratamientos con métodos tradicionales, los cuales no siempre son ambientalmente amigables, accesibles desde el punto de vista económico, ni completamente efectivos. Estas oxidorreductasas son muy versátiles debido a su baja especificidad, pueden oxidar diversos compuestos fenólicos y aminas aromáticas, así como compuestos más complejos utilizando mediadores redox como co-sustrato.

En esta Tesis se trabajó con dos lacasas producidas por cepas nativas de los basidiomicetes *Trametes villosa* y *Pycnoporus sanguineus* aislados de zonas forestadas con *Eucalyptus globulus* en Uruguay. Se optimizó la producción de ambas enzimas en un medio de cultivo semi-sólido utilizando como sustrato un sub-producto de la industria forestal y las mismas fueron purificadas y caracterizadas.

Estas lacasas presentaron una alta capacidad de degradación de distintos colorantes sintéticos, incluso en algunos casos sin necesidad de un mediador redox. Los estudios realizados representan una contribución importante al área ya que no se ha reportado previamente el tratamiento de efluentes coloreados con lacasas producidas por hongos de colecciones locales.

Por otro lado, dadas las ventajas que ofrecen los procesos de inmovilización de proteínas, las lacasas fueron inmovilizadas para la obtención de nuevos biocatalizadores insolubles. La inmovilización hace posible la separación del derivado enzimático de los productos de reacción así como la disminución de los costos globales del proceso al permitir el re-uso del biocatalizador. Como método de inmovilización se seleccionó el covalente reversible. El mismo combina una unión fuerte que evita la

pérdida de enzima durante la aplicación del biocatalizador insoluble y posibilita regenerar el soporte por reversibilidad de la unión, lo cual contribuye a la reducción del costo global del proceso. Es importante remarcar que el desarrollo de un biocatalizador insoluble en base a lacasa inmovilizada en el soporte tiolsulfinato-agarosa es totalmente novedoso y de gran potencial para futuras aplicaciones biotecnológicas. En particular, con el derivado obtenido por inmovilización de lacasa de *T. villosa* se logró alcanzar altos rendimientos de degradación de colorantes tipo azoico y antraquinónico, los cuales representan las principales clases de colorantes empleados a nivel industrial.

Por último, se debe tener en cuenta que si bien la disminución del color del efluente puede ser el principal objetivo de los tratamientos realizados en la industria no debe ser el único, ya que se debe considerar asimismo la toxicidad de los productos obtenidos. En este sentido, los estudios realizados aportan información significativa acerca de la ecotoxicidad de dos colorantes azoicos (Acid Red 88 y Acid Black 172) tratados con el sistema lacasa-mediador.

De esta forma, el trabajo realizado contribuye al desarrollo de técnicas para el tratamiento de efluentes industriales coloreados que contemplen diferentes aspectos relacionados a la preservación del medio ambiente.

---

# CAPÍTULO I

## Introducción



## 1. Biotecnología en la industria

---

A nivel mundial existe un creciente reconocimiento de que la gestión y el uso de los recursos naturales deben ser mejorados, al igual que la reducción de la contaminación generada por las diferentes actividades humanas. Para ello es necesario minimizar o eliminar las modalidades de producción y consumo no sostenibles y desarrollar procesos industriales que busquen la reducción del impacto ambiental y la mejora de la calidad de vida. Es así que el desarrollo de una bioeconomía sustentable en base a bioprocesos ecoeficientes y recursos renovables representa uno de los retos estratégicos más relevantes [1].

Así, resulta fundamental que la industria satisfaga los siguientes requisitos básicos: el proceso correspondiente debe ser económicamente viable, ambientalmente compatible y socialmente responsable, gestionando adecuadamente los diferentes impactos generados en su producción. Esta sostenibilidad industrial se puede lograr a través de la estrategia denominada “producción más limpia”, la cual involucra un cambio de paradigma basado en la aplicación de la innovación tecnológica para desarrollar procesos y sistemas de producción que permitan la reducción de costos, disminuyendo el gasto innecesario de materiales y energía y con ello los residuos y contaminantes generados. Implica además el uso más eficiente de los recursos renovables y una menor dependencia de los no renovables, con una reducción en la emisión de gases del efecto invernadero [1].

La biotecnología industrial constituye una herramienta fundamental para lograr el desarrollo industrial sostenible. Su principal objetivo es la creación de productos fácilmente degradables y de menor toxicidad a través de procesos de producción que consuman menos energía y generen menos residuos así como mejoras en el rendimiento respecto a los procesos químicos convencionales [2].

Entre los ejemplos de aplicación de la biotecnología en la mejora de la eficiencia de procesos industriales se pueden mencionar:

- uso de microorganismos y enzimas para la obtención de productos químicos,
- uso de enzimas y microorganismos para destruir contaminantes peligrosos en el proceso de tratamiento de efluentes,
- creación de nuevos materiales biodegradables como plásticos y textiles,

- desarrollo de nuevas fuentes de energía renovables, como los biocombustibles. Los materiales de origen biológico constituyen un recurso renovable y además pueden presentar menor toxicidad y persistencia que los derivados del petróleo [3]. Actualmente la aplicación de la biotecnología se da en diversos sectores tales como: desarrollo de productos químicos, plásticos, procesamiento de alimentos, textiles, pulpa y papel, minería y energía.

### **1.1. Enzimas en procesos industriales**

El uso de biocatalizadores se remonta a tiempos remotos pues se han utilizado desde hace varios siglos en industrias como la cervecera, láctea, de panificación o peletera. Desde el comienzo del siglo 20 las enzimas se usan en procesos de producción industrial de forma consciente a través del estudio de su estructura y funcionamiento. Estos catalizadores biológicos poseen muy diversa especificidad, reactividad, así como propiedades fisicoquímicas, catalíticas y biológicas muy deseables para diversas aplicaciones industriales en las que se pueden usar ya sea reemplazando los procesos tradicionales o complementándolos [4].

El uso de enzimas como biocatalizadores constituye un ejemplo de aplicación de la química verde, presentando las siguientes características [5]:

- Como catalizadores naturales, constituyen una materia prima renovable, que además es no tóxica y biodegradable.
- Operan en condiciones suaves de reacción como temperatura, presión y pH, resultando en un menor consumo de energía.
- Pueden actuar en un medio de reacción acuoso permitiendo un menor consumo de solventes orgánicos.
- Pueden operar con alta selectividad dando productos de elevada pureza.
- Su aplicación puede disminuir la generación de residuos que posteriormente requieran tratamiento y eliminación.
- Pueden disminuir el tiempo de un proceso de síntesis orgánica reduciendo el número de pasos necesarios y evitando el uso de catalizadores inorgánicos.

Es importante tener en cuenta, que si bien los procesos en los que se aplica la biocatálisis son potencialmente más ecológicos o sostenibles que sus alternativas

químicas, siempre será necesario evaluar la rentabilidad y el impacto ambiental asociado a cada procedimiento en particular [5].

En el tratamiento de efluentes industriales la aplicación de enzimas aisladas representa una alternativa biotecnológica a la biodegradación con microorganismos y los métodos fisicoquímicos utilizados normalmente tales como coagulación, floculación y adsorción en carbón activado. Este tipo de tratamientos presenta algunas desventajas como el elevado costo y la generación de grandes cantidades de lodos y residuos que requieren un tratamiento adicional antes de la disposición final [6–8].

Si bien es posible utilizar enzimas en forma de extracto crudo sin purificar, esta tecnología aún presenta como limitante el no ser económicamente viable para utilizarse a gran escala [6]. Es así que surge el interés en la aplicación de métodos de inmovilización de proteínas y tecnología enzimática que permitan reutilizar el biocatalizador y maximizar el rendimiento del proceso, de forma de reducir los costos globales del mismo.

## 2. Inmovilización de proteínas

---

### 2.1 Generalidades

La inmovilización surge como una alternativa para superar los inconvenientes que implican el empleo de enzimas en forma soluble. Mediante el uso de enzimas inmovilizadas es posible incrementar la estabilidad de la enzima, facilitar su separación de los productos de reacción evitando agregar contaminantes al efluente del proceso, así como diseñar procesos continuos gracias a la posibilidad de reuso del biocatalizador. El término "enzima inmovilizada" se puede definir como "enzima confinada físicamente o localizada en cierta región definida del espacio con retención de su actividad catalítica, y que se puede utilizar repetidamente y de forma continua". De esta forma la enzima en fase sólida es un catalizador heterogéneo aplicable en reacciones donde el sustrato se encuentre en solución [9].

Dependiendo de la aplicación que se le dará al biocatalizador insoluble, para el diseño de un protocolo de inmovilización se deberá definir: la enzima a inmovilizar, el soporte sólido o matriz, el tipo de unión de la proteína con dicho soporte (método de inmovilización), y en algunos casos también se deberá estudiar cómo realizar la

protección de la enzima inmovilizada para prolongar la vida útil del catalizador (por ej. mediante multicapas de polielectrolitos).

En cuanto al soporte, las propiedades ideales incluyen resistencia física a la compresión, hidrofiliidad, facilidad de derivatización, biocompatibilidad, resistencia al ataque microbiano y disponibilidad a bajo costo.

Las matrices pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica, las últimas a su vez pueden ser polímeros sintéticos o materiales de origen natural [10].

Las características físicas del soporte resultan críticas tanto para favorecer la inmovilización del biocatalizador como para la elección del tipo de reactor a utilizar. En particular, el tamaño de poro y de partícula determinan el área superficial total el cual afecta directamente la capacidad de unión de las proteínas. Los soportes no porosos muestran menores limitaciones difusionales pero como contraparte presentan una menor capacidad de unión y además la enzima inmovilizada resulta menos protegida del medio en comparación a los de tipo poroso.

Entre los soportes porosos y de naturaleza orgánica se encuentra la agarosa, un polímero natural formado por unidades de galactosa. Se trata de una matriz ampliamente utilizada que presenta: elevada porosidad la cual permite una gran capacidad de unión de proteína; carácter hidrofílico; facilidad de derivatización por su alto contenido de grupos OH y ausencia de grupos cargados que evita la adsorción no específica de sustratos o productos. Una limitación importante para este soporte es el costo elevado, por lo que es particularmente interesante su uso en los métodos reversibles de inmovilización los cuales permiten su regeneración y reuso [10].

Los diferentes métodos de inmovilización existentes se pueden clasificar en dos grandes grupos de acuerdo a la capacidad de recuperar la enzima libre de la matriz, estos son los irreversibles y los reversibles.

Métodos irreversibles:

- atrapamiento de la enzima dentro de una red formada por un polímero orgánico como alginato de calcio
- entrecruzamiento, donde no se utiliza un soporte sino que se forma una red por interacción entre las moléculas proteicas y un agente entrecruzante como el glutaraldehido

- unión covalente irreversible entre grupos funcionales de la proteína (principalmente amino) y el soporte activado, a través de enlaces isourea, amida, amina secundaria o éter, entre otros.

Métodos reversibles:

- adsorción por interacciones hidrofóbicas
- adsorción por interacciones iónicas
- adsorción por interacciones de Van der Waals
- unión covalente reversible a través de enlaces disulfuro

Cada método de inmovilización presenta ventajas y desventajas por lo que la elección del más apropiado dependerá de las características de la enzima, del soporte a utilizar y del proceso específico en el que se aplicará el derivado [10].

## **2.2. Inmovilización covalente reversible**

En el método covalente reversible la unión ocurre por formación de puentes disulfuro entre el soporte activado con grupos tiol-reactivos (tiolsulfinatos o tiolsulfonatos) y los grupos tiol de la enzima (**Fig. I-1**). El mismo presenta algunas ventajas sobre las técnicas más usuales de inmovilización ya que al estar basado en una unión covalente implica la formación de un enlace fuerte que alarga la vida útil del biocatalizador inmovilizado, y al mismo tiempo permite la reutilización del soporte por la reversibilidad de la unión. Dicha reversibilidad permite la liberación de la enzima cuando pierde su actividad luego de varios ciclos de uso y la recuperación del soporte para reactivarlo y cargarlo nuevamente con enzima, contribuyendo a la disminución de costos del proceso en el que se aplica el biocatalizador [11]. La ruptura de los enlaces disulfuro que unen la enzima a la matriz se logra utilizando un agente reductor de bajo peso molecular como el ditiotreitól o mercaptoetanol en condiciones suaves de reacción (**Fig. I-1 b**).

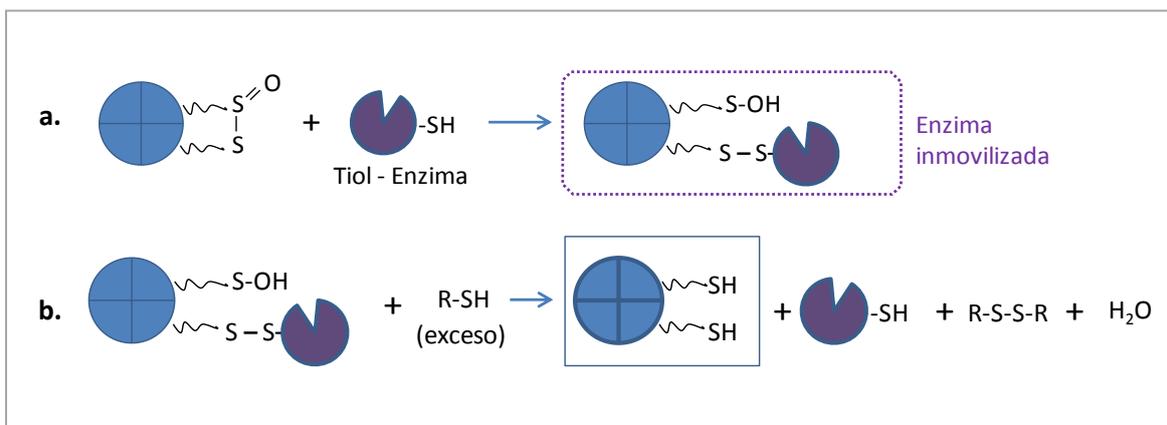
Por lo anteriormente expuesto éste es el método de inmovilización de elección para la presente Tesis.

### **2.2.1 Obtención de soportes activados con grupos tiolsulfinato**

Los geles tiol-reactivos activados con estructuras de óxido de disulfuro del tipo tiolsulfinato (R-S-SO-R) pueden ser sintetizados siguiendo protocolos relativamente

sencillos. En primer lugar se debe introducir en el soporte grupos  $-SH$  mediante un proceso de tiolación en tres etapas (**fig.I-2 a-c**). La primera involucra la reacción del soporte con epiclorhidrina en medio alcalino para introducir grupos oxirano en el gel, los que luego son derivatizados a grupos S-alquil-tiosulfato por reacción con tiosulfato de sodio obteniéndose el derivado denominado Bunte Salt (**fig. I-2 b**). Finalmente la reducción de estos grupos S-alquil-tiosulfato con ditioneitol (DTT) genera los grupos tiol en el soporte.

Para la obtención de los grupos tiolsulfinato se debe realizar un proceso en dos etapas comenzando con una oxidación suave de los grupos tiol con ferricianuro de potasio a pH 7.0 para generar las estructuras disulfuro que en la segunda etapa son convertidas en tiolsulfinato por oxidación controlada con monoperoxifalato de magnesio (MMPP) a pH 5.0 - 7.0 (**Fig. I-2 d**). Este agente oxidante permite la introducción de un solo átomo de oxígeno por grupo disulfuro alifático inmovilizado para formar un grupo tiolsulfinato [9].



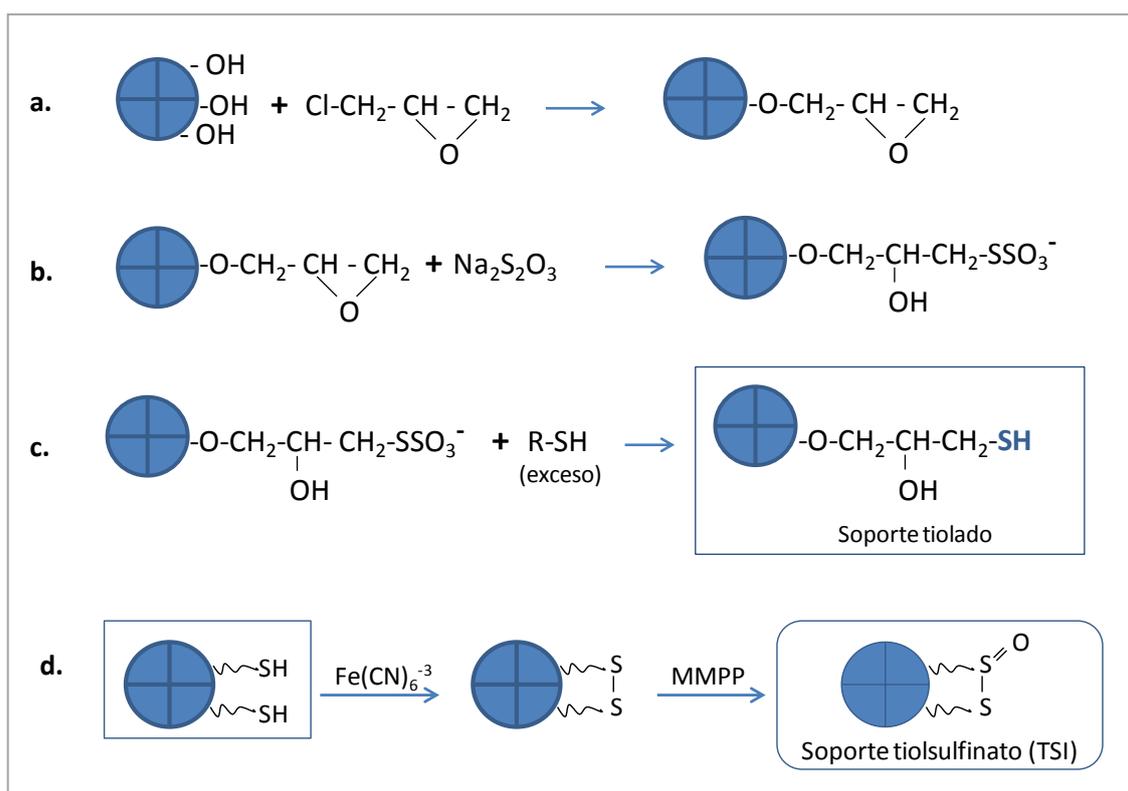
**Figura I-1.** Descripción del método de inmovilización covalente reversible. **a.** Inmovilización de tiol-enzimas en soportes tiolsulfinato (TSI). **b.** Liberación de la enzima con un exceso de tiol de bajo peso molecular para la recuperación del soporte y posterior regeneración de grupos TSI.

### 2.2.2 Inmovilización de proteínas en soportes tiol-reactivos

Los grupos tiolsulfinato inmovilizados son muy estables en un rango de pH de 3.0 a 8.0 permitiendo que los soportes activados con los mismos puedan ser almacenados como suspensiones a pH 5.0 y 4 °C por períodos prolongados [11]. La inmovilización en este tipo de soporte se realiza en condiciones moderadas de temperatura y pH. En dicho proceso las moléculas de péptidos o proteínas que contienen grupos tiol expuestos

reaccionan con el átomo de azufre no oxidado, es decir el más electrofílico, resultando inmovilizadas por enlaces disulfuro a la fase sólida. Además se genera un grupo cargado, ácido sulfénico, que permanece unido al soporte (**fig. I-1 a**). Este grupo es fácilmente reducido a tiol durante la recuperación del soporte (**fig. I-1 b**) para luego seguir con la correspondiente oxidación (**fig. I-2 d**).

De esta forma los geles tiolsulfinato pueden ser regenerados un gran número de veces sin perder grupos reactivos [9]. Los grupos -SH necesarios en la enzima deben encontrarse expuestos en la superficie de la misma. Estos pueden ser nativos o generados por distintos tratamientos. Una posibilidad es la reducción de enlaces disulfuro presentes en la proteína, utilizando ya sea un agente reductor soluble como el DTT o un reductor en fase sólida. Otro tratamiento consiste en la introducción de los grupos *de novo* mediante una reacción de tiolación, como se explicará en el Capítulo IV [12–14].



**Figura I-2.** Síntesis de un soporte activado con óxidos de disulfuro. **a.** Epoxi-activación de la fase sólida con epiclorhidrina. **b.** Reacción con tiosulfato de sodio para obtener el derivado Bunte salt. **c.** Reducción de los grupos S-alquil-tiosulfato con exceso de un tiol de bajo peso molecular, como ditiotreitolo ( $\text{R-SH}$ ). **d.** Preparación del soporte tiolsulfinato por oxidación controlada del soporte previamente tiolado.

### 3. Lacasas

---

#### 3.1. Generalidades

Las lacasas o “bencenodiol: oxígeno oxidorreductasas” se identifican por el número sistemático EC 1.10.3.2 de acuerdo a la clasificación de enzimas del Comité de nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología molecular (IUBMB). Las mismas pertenecen al grupo de Oxidorreductasas (EC 1), que actúan sobre difenoles y compuestos dadores de electrones relacionados (EC 1.10) y utilizan oxígeno como aceptor (EC 1.10.3). El último número corresponde al nombre común de la enzima en particular, en este caso lacasa [15]. Dicho nombre responde a que la misma fue aislada por primera vez de la savia del “árbol japonés de la laca”, *Rhus verniciflua*, por el japonés Hikorokuro Yoshida en 1883 [16].

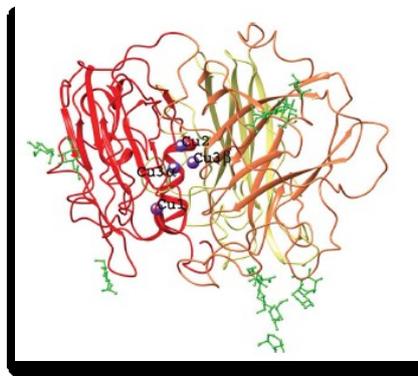
Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en plantas, hongos (basidiomicetes y ascomicetes), bacterias, insectos y crustáceos, desempeñando distintas funciones. En plantas, se asocian a procesos de formación de lignina, en hongos a la degradación de la lignina, producción de pigmentos y patogénesis de plantas, en bacterias participan en la homeostasis del cobre, pigmentación de esporas y resistencia a factores de estrés, mientras que en insectos interviene en el proceso de esclerotización de la cutícula [17–19]. La mayoría de las lacasas estudiadas son producidas por hongos, especialmente por basidiomicetes de la podredumbre blanca de la madera. Estos son los únicos microorganismos capaces de degradar la lignina de forma eficiente (solubilización y mineralización) metabolizándola a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Este proceso es posible gracias a las enzimas extracelulares con actividad ligninolítica que sintetizan, entre las que se encuentra la lacasa. El sistema enzimático incluye además enzimas como la lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14) y manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) entre otras [17,19].

La producción extracelular de la enzima por estos hongos representa una gran ventaja frente a otros organismos desde el punto de vista biotecnológico, ya que se simplifica la etapa de recuperación de la proteína del medio de cultivo.

De acuerdo a su estructura molecular las lacasas pertenecen a la familia de Oxidasas

multicobre por presentar átomos de cobre en su sitio activo, siendo estructuralmente homólogas a proteínas como la ceruloplasmina o la ascorbato oxidasa. Son glicoproteínas N-glicosiladas (los carbohidratos se unen al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina), con 3 a 10 sitios de glicosilación, en la mayoría de los casos con manosa y N-acetilglucosamina [20]. Generalmente, el contenido de carbohidratos constituye entre el 10 y 25 % del peso molecular de la proteína. Esta fracción glucídica tiene un importante rol en la secreción de la proteína, en la retención del cobre, en la estabilidad térmica así como en la protección frente a proteólisis e inactivación por radicales libres [21–23].

Su forma enzimáticamente activa puede ser un monómero, dímero, trímero o tetrámero [24–26], aunque la estructura encontrada con más frecuencia en lacasas provenientes de hongos consiste en un monómero de entre 55 y 85 KDa, organizado en tres dominios tipo cupredoxin (**fig. I-3**) [20,23,27]. El punto isoeléctrico de estas enzimas se encuentra próximo a pH 4.0, en un rango entre 3.0 y 7.0. El pH óptimo para la actividad catalítica varía entre 3.0 y 5.0, mientras que la temperatura óptima se encuentra entre 50 y 70 °C [20–23].



**Figura I-3.** Estructura tridimensional de lacasa nativa del basidiomicete *Trametes hirsuta*. Se indica con diferentes colores los tres dominios, los cuatro átomos de cobre en el centro, y los carbohidratos en el exterior [26].

### 3.2. Sitio activo y actividad catalítica

A diferencia de la mayoría de las enzimas las lacasas actúan sobre un amplio rango de sustratos, catalizando la oxidación de varios compuestos ricos en electrones como para y orto-difenoles, aminofenoles, metoxifenoles, polifenoles, poliaminas y aminas aromáticas. La reacción de oxidación ocurre a través de un mecanismo radicalario con la reducción de oxígeno molecular a agua, sin liberación de peróxidos orgánicos

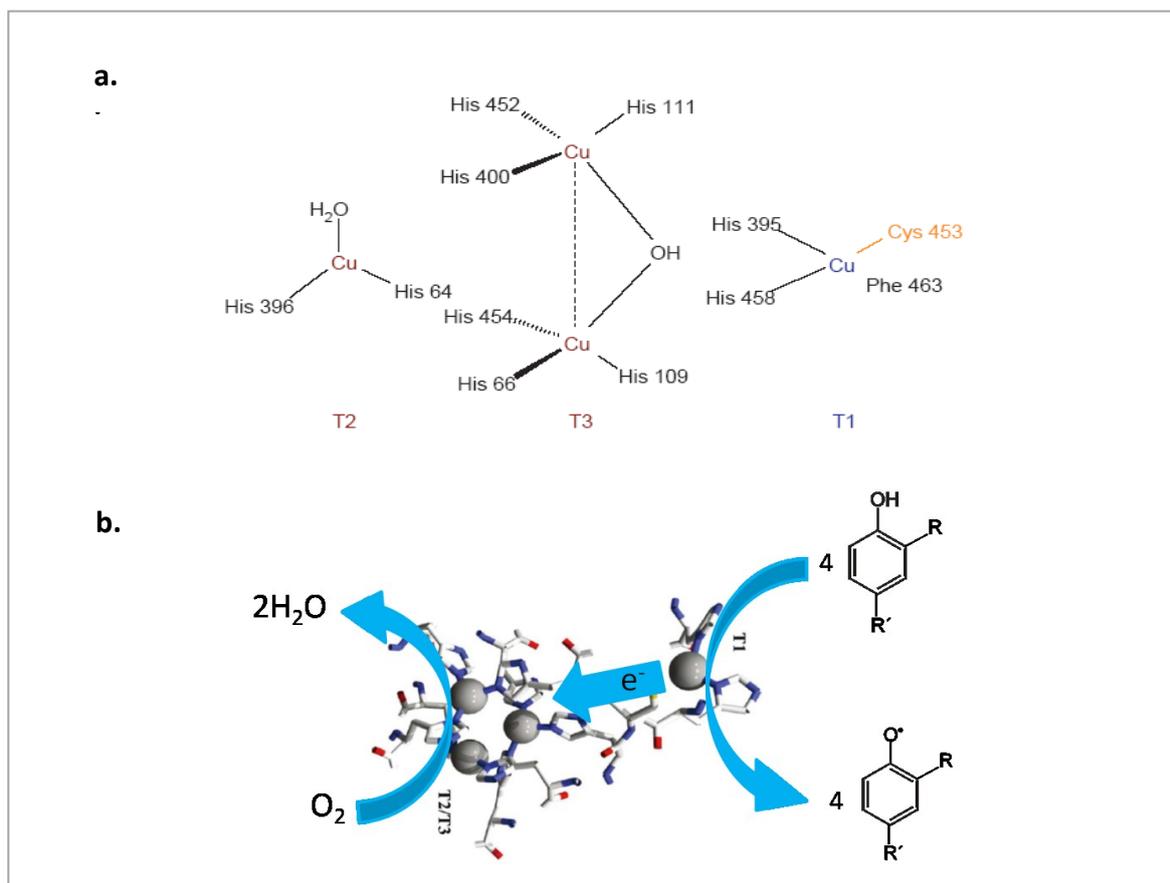
intermediarios y sin la introducción de átomos de oxígeno en la molécula de sustrato [20]. Al igual que otras oxidasas de cobre, no requieren para su actividad de cofactores tales como NADPH o NADH, por lo que son especialmente adecuadas para su aplicación in vitro, de forma independiente del metabolismo celular y sin necesidad de agregar estos compuestos al medio de reacción [28].

En el sitio activo del monómero los cuatro átomos de cobre se distribuyen en tres sitios redox, dispuestos de forma clave para la actividad catalítica: un átomo de Cu en T1, otro en T2 y dos en T3 (**fig. I-4**). Los tres tipos de iones se clasifican de acuerdo a sus propiedades de espectroscopía UV-Vis y de resonancia de spin electrónico. El cobre Tipo 1 otorga el típico color a las proteínas llamadas “azules de cobre”, es el de mayor potencial redox y de más fácil acceso para una molécula de sustrato, por lo que es el sitio donde se produce la oxidación. Durante un ciclo catalítico este cobre debe ser oxidado y reducido cuatro veces [20]. Este cobre se encuentra coordinado a un residuo de cisteína y a dos de histidina con un tercer ligando axial que puede variar (metionina en bacterias, leucina o fenilalanina en hongos). Las lacasas son capaces de oxidar directamente sólo los compuestos cuyos potenciales de ionización no excedan significativamente el potencial redox del ión de cobre T1, como es el caso de los sustratos típicos fenólicos. Se ha determinado el potencial redox del cobre en T1 para una gran cantidad de lacasas mediante titulaciones potenciométricas y se ha observado una considerable variación del mismo entre 420 y 790 mV [29]. Algunas lacasas son consideradas atípicas por carecer de la absorción a 600 nm en el espectro visible, característica del centro redox T1, por lo que se las denomina lacasas amarillas o blancas. Si bien algunos autores no aceptan la clasificación de estas enzimas como lacasas, las mismas no se pueden diferenciar si se considera la actividad catalítica y los sustratos sobre los que actúan [23,29].

Los átomos de cobre T2 y T3 se encuentran coordinados a residuos de histidina y forman un clúster trinuclear donde ocurre la reducción del oxígeno molecular y la liberación de agua [17].

De forma simplificada, el resultado de un ciclo catalítico de una lacasa con 4 átomos de cobre es la reducción de una molécula de oxígeno en dos moléculas de agua y la oxidación de cuatro moléculas de sustrato para producir cuatro radicales (**fig. I-4 b**) [17,30]. Dada la inestabilidad de los radicales fenoxilos formados, el mismo sustrato

puede ser reoxidado por la enzima o bien participar en una reacción no enzimática. Como consecuencia, estos compuestos reactivos pueden polimerizar formándose dímeros u oligómeros a través de enlaces C-C, C-O y C-N; pueden dar lugar a la formación de quinonas mediante rearrreglos, así como también puede ocurrir la ruptura de la unión arilo-alquilo o la ruptura del anillo aromático [22,29].



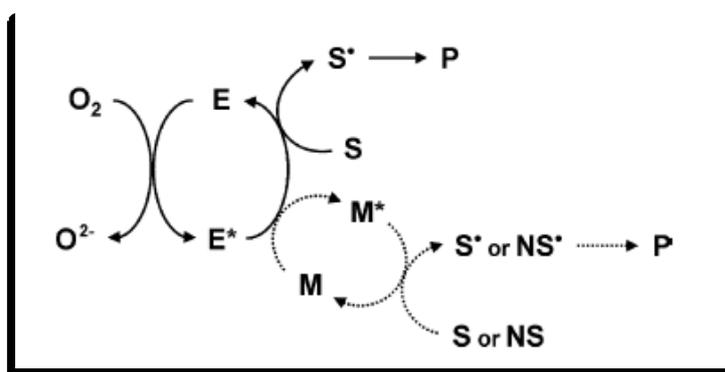
**Figura I-4** Modelo de sitio activo de lacasa y representación del ciclo catalítico. **a.** Sitio activo de la lacasa del basidiomicete *Trametes versicolor* [30]. **b.** Ciclo catalítico representado en el sitio activo de la lacasa de *Melanocarpus albomyces*. Adaptado de [31].

### 3.3. Sistema lacasa-mediador (SLM)

Se ha comprobado que las lacasas pueden oxidar compuestos de mayor complejidad de forma indirecta a través de moléculas que actúan como mediadores en la transferencia de electrones en la reacción redox. Dichos mediadores son de bajo peso molecular y con un potencial redox tal que permite su oxidación mono-electrónica directa por acción de la enzima. Los intermediarios generados en esta oxidación

pueden difundir desde el sitio activo para oxidar al compuesto “no sustrato” mediante una reacción no enzimática (**fig. I-5**).

El sistema lacasa-mediador permite la oxidación de algunos compuestos de elevado peso molecular que no tienen acceso al sitio activo, así como de otros que presentan un potencial redox mayor al de la enzima. De esta forma se expande aún más el rango de sustratos sobre los que pueden actuar las lacasas y con ello sus posibles aplicaciones [21,30,32–34].



**Figura I-5.** Sistema lacasa-mediador. Se representa la actividad catalítica directa de la enzima sobre el sustrato y la oxidación indirecta (del sustrato o de otro compuesto “no-sustrato”) en presencia del mediador redox. *Abreviaturas:* enzima (E); enzima oxidada ( $E^*$ ); sustrato (S); radical sustrato ( $S^*$ ); no-sustrato (NS); radical no-sustrato ( $NS^*$ ); productos (P); oxígeno ( $O_2$ ); oxígeno reducido ( $O^{2-}$ ); mediador (M); mediador oxidado ( $M^*$ ) [34].

Entre las condiciones que debería reunir un mediador redox se puede mencionar [29,35,36]:

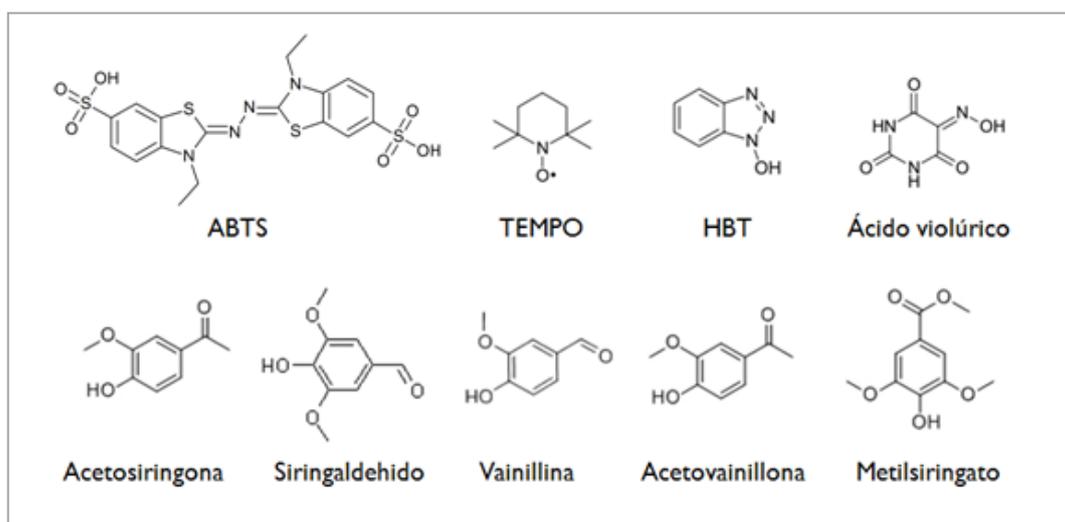
- debe ser un buen sustrato para la lacasa
- no debe inhibir la actividad enzimática
- debe existir un equilibrio entre la estabilidad y la reactividad del radical formado
- la forma oxidada debe tener una vida media tal que permita su difusión hacia el compuesto a oxidar y en algunos casos, debe poseer un potencial redox elevado para efectivamente lograr esta oxidación
- su conversión redox debería ser cíclica, en un proceso en el cual el mediador oxidado por la enzima a continuación es reducido en la oxidación del compuesto “no-sustrato”, retornando a la forma inicial y cerrando así el ciclo
- en relación a su aplicación industrial los mediadores deberían ser inocuos para el medio ambiente y estar disponibles a un bajo costo

Idealmente, si no ocurren reacciones secundarias un mediador redox puede participar en muchos ciclos catalíticos regenerándose sin degradarse. Sin embargo, en la mayoría de los casos se ha descrito que esto no sucede, sino que se observa una disminución de la concentración de mediador en el medio de reacción. Mientras que muchos autores se refieren a estos compuestos como “mediadores” sin tener en cuenta el cumplimiento del requisito de ser reconvertidos cíclicamente, otros optan por usar el término “potenciador”, no existiendo un consenso en este punto. De forma estricta, sólo los complejos de metales de transición serían auténticos mediadores redox [37–39]. En esta Tesis se hará referencia a los mismos utilizando el término “mediador”. Los primeros mediadores estudiados fueron de naturaleza sintética, como el ABTS, TEMPO, HBT, ácido violúrico, entre otros (**fig. I-6**), sin embargo, debido a su elevado costo y potencial toxicidad se comenzó a investigar la aplicación de compuestos fenólicos derivados de la despolimerización de la lignina. Los mismos pueden ser considerados como mediadores naturales no solo por su origen, sino también por cumplir con la misma función en la naturaleza, ya que las lacasas de los hongos de la podredumbre blanca los utilizan para la biodegradación de este polímero vegetal, en el cual un 80 % de su estructura corresponde a unidades no fenólicas. Se ha descrito que algunos hongos productores de lacasa que no expresan otras enzimas ligninolíticas son capaces de degradar la lignina y por otro lado, se ha comprobado que la enzima es incapaz de actuar sobre el polímero sin la presencia de mediadores. Estas observaciones comprueban el rol central de la lacasa fúngica y los compuestos fenólicos en este proceso descrito como “combustión enzimática” y fue por ello que surgió el interés de su aplicación biotecnológica en la deslignificación de la pulpa de celulosa inicialmente y luego en otros procesos como por ejemplo la degradación de compuestos recalcitrantes [17,29,36,39].

Teniendo en cuenta que los mediadores no se recuperan del medio de reacción e incluso es de esperar que se transformen debido a reacciones secundarias, la principal ventaja de la utilización de compuestos fenólicos de origen natural respecto a los mediadores sintéticos reside en el bajo costo de los mismos ya que se obtienen a partir de una fuente renovable [40]. Los mismos derivan de unidades fenilpropano oxidadas de la lignina y se pueden obtener a partir de material vegetal o como producto secundario en la producción de pulpa de celulosa [41]. Con respecto a la eficacia de

estos compuestos en muchos casos es comparable a la de los de origen sintético, mientras que en algunos trabajos se ha descrito ventajas adicionales relacionadas con la posibilidad de utilizar una menor concentración de los mismos y la observación de un menor efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática [35,36,42].

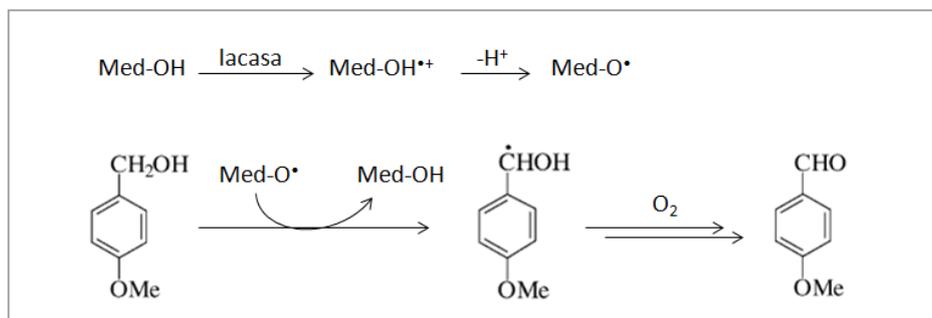
El mecanismo de reacción para el sistema lacasa-mediador depende de la estructura del mediador redox utilizado y en ocasiones determina la obtención de distintos productos a partir del mismo sustrato.



**Figura I-6.** Ejemplos de mediadores sintéticos y naturales usados en el sistema lacasa-mediador. Sintéticos: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 2,2,6,6-tetrametilpiperidín-1-oxi (TEMPO), N-hidroxibenzotriazol (HBT) y ácido violúrico. Naturales: acetosiringona, siringaldehído, vainillina, acetovainillona y metilsiringato [30].

Se han propuesto tres mecanismos de reacción posibles [43,44]: 1- *mecanismo de transferencia de electrones o ET*, describe la reacción mediada por el compuesto de origen sintético ABTS; 2- *mecanismo de oxidación iónica*, como su nombre lo indica no se da por interacción radicalaria sino por una de tipo iónica y es particular para el mediador TEMPO; 3- *mecanismo de transferencia de radical hidrógeno o HAT*, representa la reacción para los mediadores tipo N-OH sintéticos, como el HBT o ácido violúrico, así como también para los compuestos fenólicos o mediadores "naturales". Los mediadores redox utilizados en esta Tesis pertenecen a este tercer grupo. En la **figura I-7** se representa el mecanismo HAT para la oxidación de un alcohol bencílico. El mediador (N-OH o fenólico) es oxidado por la lacasa que sustrae un átomo de hidrógeno generando un radical nitroxilo o fenoxilo ( $\text{Med-O}^\bullet$ ). De igual forma, dicho

radical sustrae un protón del alcohol, que en el ejemplo por tratarse de un alcohol primario será convertido en aldehído.



**Figura I-7.** Oxidación de un compuesto modelo de lignina no fenólico mediante el sistema lacasa-mediador con mediadores tipo N-OH o fenólicos. Mecanismo de transferencia de radical hidrógeno o “HAT” [36,43].

A diferencia del mecanismo ET, donde el factor determinante de la reactividad es el potencial redox y requiere que los sustratos presenten un bajo potencial, en este caso la fuerza motriz es el equilibrio de entalpía entre el enlace disociado C-H en el sustrato y el enlace O-H formado en el mediador [45,46]. En alcoholes bencílicos primarios la fuerza del enlace  $C_{\alpha}$ -H, geminal al  $C_{\alpha}$ -O del hidroxilo, es de energía comparable a la del enlace O-H de compuestos N-OH o de fenoles (82-85 kcal/mol). Esto determina que la ruptura resulte favorable desde el punto de vista termodinámico [45–48].

Dado que son numerosos los factores que inciden en la eficiencia del sistema lacasa-mediador resulta compleja la selección de un mediador adecuado, por lo que la decisión puede resultar en muchas ocasiones de observaciones empíricas. Dichos factores están relacionados con la enzima y su procedencia, el mediador y su mecanismo de acción así como con el sustrato y su estructura [37].

### 3.4. Aplicaciones de la enzima lacasa y el sistema lacasa-mediador

La versatilidad respecto al sustrato así como la posibilidad de potenciar esta característica mediante el sistema lacasa-mediador hace a estas enzimas atractivas para numerosas aplicaciones donde la catálisis enzimática puede representar una alternativa ambientalmente más benigna y/o de menor costo que los procesos químicos usados normalmente [33,49,50]. A continuación se mencionan algunos ejemplos.

- *En la industria alimentaria:* para la estabilización del vino, cerveza y jugos de frutas por remoción selectiva de compuestos fenólicos [19,51–54]. En estos casos la enzima debe ser inmovilizada debido a que no han sido aprobadas como aditivo alimentario [30].

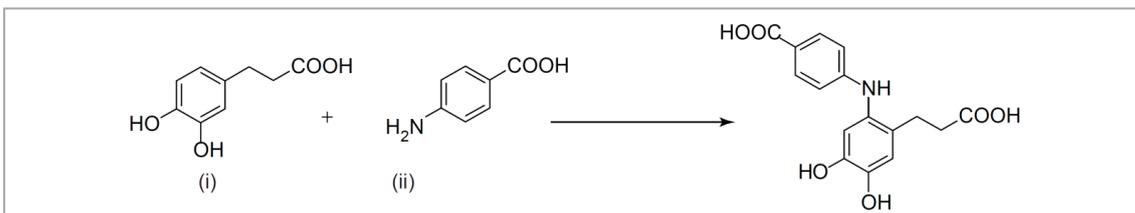
- *Producción de Bioetanol a partir de material lignocelulósico:* debido a su capacidad para actuar directamente sobre los compuestos fenólicos presentes en la lignina permitiendo el acceso a los azúcares fermentables [19,55,56].

- *Deslignificación de pulpa de celulosa y bio-blanqueo para la producción industrial de papel:* este proceso requiere la separación y degradación de la lignina de la madera para obtener la pulpa de celulosa. Los aspectos ambientales han determinado que se reemplacen los procedimientos convencionales de deslignificación y blanqueo a base de cloro por otros menos contaminantes como el tratamiento con oxígeno. Sin embargo, los pre-tratamientos de la pulpa con enzimas ligninolíticas proporcionan una estrategia más suave y limpia de deslignificación que además permite preservar la estructura de la celulosa [33]. Se ha patentado un proceso basado en el sistema lacasa-mediador denominado “Lignozym®-process”, en el que se combina lacasa de *Trametes versicolor* con mediadores que presentan los grupos N-OH, N-óxido, oxima o ácido hidroxámico [57].

- *Desarrollo de biosensores:* el progreso de la bioelectroquímica ha sido integrado en aplicaciones analíticas en biosensores trabajando como detectores en análisis clínicos y medioambientales. Dado que las lacasas son capaces de catalizar reacciones de transferencia de electrones sin la necesidad de cofactores, su uso ha sido estudiado en biosensores para detectar varios compuestos fenólicos, oxígeno, azidas, morfina, codeína, catecolaminas, flavonoides, así como para electroinmunoensayos [58,59].

- *Biocatálisis (química sintética):* los radicales generados por la oxidación de fenoles sufren reacciones de acoplamiento, llevando a la formación de compuestos de relevancia en síntesis orgánica (dímeros, oligómeros, polímeros). Estos radicales pueden además reaccionar con moléculas distintas dando lugar a nuevos compuestos, lo que se ha empleado en varios tipos de reacciones, como por ejemplo en el acoplamiento de *p*-hidroquinonas y aminas aromáticas o en la reacción del ácido

dihidrocafeico con ácido 4-aminobenzoico que se muestra en la **figura I-8** [28–30,41,60–67].



**Figura I-8.** Ejemplo de aplicación sintética de la lacasa. Acoplamiento de ácido dihidrocafeico (i) con ácido 4-aminobenzoico (ii) para formar ácido 3-[6-(4-carboxifenil) amino-3,4-dihydroxifenil]-propiónico como producto principal [30].

- *Modificación de fibras en la industria textil:* se aplica el sistema lacasa-mediador en el aclarado oxidativo de las prendas de tela denim o mezclilla, como alternativa al método químico en el que se aplican agentes oxidantes fuertes como hipoclorito, permanganato u ozono. En esta reacción el cromóforo del colorante azul índigo o añil (C.I. Vat blue 1) se escinde para producir dos moléculas de isatina incoloras. Uno de los sistemas enzimáticos utilizados comprende una formulación granular de lacasa de *Myceliophthora thermophila* expresada en *Aspergillus oryzae* con éster de metilo de ácido siríngico como mediador redox [68].

- *Procesos de biorremediación y de tratamiento de efluentes:* se ha aplicado a la degradación de compuestos recalcitrantes como los PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos) o los metabolitos producidos por la reducción del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) los cuales son una importante fuente de contaminación del suelo.

Asimismo, se ha estudiado la oxidación directa de derivados fenólicos por las lacasas para la descontaminación de efluentes industriales. Se plantea que los polímeros polifenólicos resultantes de la actividad enzimática son usualmente insolubles y pueden ser separados fácilmente por filtración o sedimentación [30]. De igual forma, se propone la degradación de colorantes sintéticos para el tratamiento de efluentes de la industria textil y del cuero, los cuales pueden presentar elevados niveles de toxicidad y mutagenicidad. Se ha comprobado que con la lacasa se puede lograr tanto la eliminación del color como la detoxificación, aunque no existe correlación entre los niveles de estas dos actividades [19,29,33].

## 4. Producción de lacasa nativa por basidiomicetes de la podredumbre blanca de la madera

---

### 4.1. Generalidades

Para utilizar las lacasas en todas las aplicaciones mencionadas es esencial la producción de grandes cantidades de la enzima a un bajo costo. La producción de enzimas es un área importante y creciente de la biotecnología. Si bien existen cepas muy eficientes adaptadas mediante ingeniería genética que se encuentran disponibles para producción enzimática a escala industrial, otra posible estrategia biotecnológica consiste en la optimización del proceso con cepas nativas [69,70]. La producción de lacasa por hongos ligninolíticos es dependiente del género, especie y cepa del hongo, por lo que la selección de una cepa que muestre un alto nivel de expresión de la enzima será el primer paso a seguir [27,71,72]. Por otro lado, distintas variables de fermentación que afectan la producción enzimática y que son cepa-dependientes deben ser tenidas en cuenta en la optimización del sistema de cultivo, para obtener el máximo rendimiento [73].

Entre los factores estudiados habitualmente se encuentran la fuente de nitrógeno, la fuente de carbono y la concentración de estos nutrientes, así como condiciones del cultivo como pH, temperatura y aireación. La suplementación del medio con inductores como compuestos fenólicos u otros aromáticos, o con metales como el cobre es uno de los métodos más eficaces para maximizar la producción enzimática. La regulación de la expresión a nivel transcripcional ha sido comprobada para el cobre, así como para el nitrógeno y los compuestos aromáticos [73,70]. En base a estos resultados se ha recurrido al uso de residuos agroindustriales como una fuente económica de nutrientes e inductores aromáticos [70].

Por último, un factor fundamental a considerar es el tipo de cultivo o tipo de fermentación seleccionado, pudiendo ser cultivo en medio líquido (sumergido), cultivo en fase sólida, ó cultivo en fase semi-sólida, resultando estos dos últimos los más adecuados para el crecimiento de los hongos ligninolíticos, como se describe a continuación [71,72,74].

## 4.2 Fermentación en estado sólido y semi-sólido para la producción de enzimas

Aproximadamente 90 % de las enzimas comercializadas son producidas mediante el sistema de fermentación en cultivo sumergido, en el cual los microorganismos utilizados crecen en una fase líquida homogénea [69]. Sin embargo, la fermentación en estado sólido ha mostrado ser una metodología especialmente apropiada para la producción de enzimas por hongos filamentosos, ya que reproduce las condiciones naturales del medio que éstos habitan [75].

Esta tecnología es aplicada en distintos procesos desde la antigüedad en países asiáticos y posteriormente también en occidente, con ejemplos típicos como la fermentación tradicional japonesa “koji”, la producción de “tempeh” de Indonesia o la fabricación del queso azul en Francia [76]. Ejemplos más actuales son los procesos de compostaje y ensilado así como la producción de hongos. Para su aplicación en la producción de enzimas y metabolitos secundarios a escala industrial se debe considerar aspectos ingenieriles relacionados al escalado y el diseño de los biorreactores, los cuales aún se encuentran desarrollo. Sin embargo, se han producido avances significativos para procesos que antes se consideraban factibles sólo en cultivo sumergido [69,75,77,78].

Este sistema se puede definir como un cultivo en el cual los microorganismos crecen sobre un material sólido humedecido e insoluble en agua, en ausencia de líquido libre en el medio [79].

En condiciones de fermentación en estado semi-sólido (FSS) el sistema es modificado incorporando una pequeña cantidad de líquido de modo de facilitar el control de la fermentación y aumentar la disponibilidad de nutrientes [80,81]. Este cultivo puede ser utilizado de manera controlada para obtener el producto deseado presentando algunas ventajas frente a la fermentación en cultivo sumergido. Una de las principales ventajas que se le atribuye es que permite alcanzar un mayor nivel de producción de enzima para la misma cepa y composición del medio de cultivo. Se describe como un sistema que trabaja como batch alimentado con oxigenación rápida y suministro lento de azúcar. Por otro lado, es un proceso estático que no implica gastos de energía mecánica para su funcionamiento [82]. Otras ventajas biotecnológicas de este sistema de cultivo, a escala de laboratorio son: mayor estabilidad de productos, menor represión catabólica, menor volumen de líquido residual, permite el cultivo mixto de

distintos hongos y una menor demanda de esterilidad debido a la baja actividad de agua utilizada [83]. El bajo contenido de líquido es un factor importante ya que maximiza el contacto del microorganismo con el aire estimulando la actividad y la producción enzimática, además de simplificar la etapa de recuperación de la misma. En cuanto al escalado, la naturaleza sólida del soporte ocasiona algunos inconvenientes como la dificultad para el monitoreo de los parámetros del proceso como pH, humedad, temperatura, oxígeno y cantidad de biomasa. Por otro lado, el menor requerimiento espacial es un aspecto positivo para el diseño de los biorreactores [84].

La selección de un soporte adecuado para el cultivo en fase sólida de hongos filamentosos es esencial para el éxito del proceso. La composición química, la porosidad, así como la disponibilidad y el costo son características importantes a tener en cuenta en su elección.

Los materiales utilizados pueden ser de tipo inerte o no inerte. El uso de un medio líquido definido y un soporte inerte con una estructura física homogénea (por ejemplo de espuma de poliuretano), mejora el control y monitoreo del proceso así como la reproducibilidad de las fermentaciones y facilita la recuperación del producto obtenido. Sin embargo, estos materiales presentan un costo elevado. Los materiales no inertes cumplen un doble rol ya que además de funcionar como soporte donde se fija el microorganismo, pueden suministrar nutrientes al medio como carbono, nitrógeno y minerales, entre otros. La morfología de los hongos filamentosos les permite colonizar y penetrar en el soporte en busca de dichos nutrientes [84].

Por otro lado, el empleo de residuos agro-industriales de bajo costo como soporte-sustrato contribuye a solucionar los problemas económicos y medioambientales causados por su disposición como desechos, ofreciendo una alternativa de uso para estos materiales. En particular, en Uruguay la industria forestal genera una importante cantidad de residuos, alcanzando 1.3 millones de toneladas en el año 2010 [85].

La composición química del soporte-sustrato se debe seleccionar dependiendo de la enzima que se desea producir y del microorganismo utilizado para ello. Cuando se degrada el material en el cultivo se liberan distintas sustancias, algunas de las cuales pueden actuar como inductores que estimulen la producción de determinada enzima. Los sustratos utilizados habitualmente contienen lignina, celulosa y hemicelulosa, estas

sustancias en particular actúan como inductores de la producción de enzimas extracelulares de los hongos ligninolíticos. En el caso de la lacasa, se ha comprobado que su producción por los basidiomicetes de la podredumbre blanca es estimulada cuando se utilizan residuos lignocelulósicos como soporte-sustrato en el medio de cultivo [76].

Para determinar la viabilidad de este cultivo para un propósito específico es necesario realizar una evaluación económica de todo el proceso. Por ejemplo, para la obtención de productos farmacéuticos el nivel de pureza requerido es el más elevado por lo que sería de preferencia utilizar un soporte inerte que simplifica la etapa de purificación y recuperación del producto. Para otras aplicaciones el grado de pureza no es de mayor relevancia, sino que lo que se busca es obtener el producto final lo más concentrado posible. En este caso es conveniente el uso de un sustrato orgánico biodegradable como soporte no inerte de menor costo, donde el producto se obtiene junto a impurezas provenientes del material y de la metabolización por el microorganismo. La producción de enzimas como celulasas para bioconversión de biomasa, proteasas para la industria del cuero o lacasas para distintas aplicaciones, son algunos ejemplos donde se utiliza el extracto de enzima crudo [75]. Para estos procesos industriales a gran escala resulta muy conveniente la utilización de un sistema eficiente de producción de bajo costo.

La fermentación en estado semi-sólido fue el tipo de cultivo seleccionado para la producción de lacasa por las cepas de basidiomicetes utilizadas en esta Tesis.

## 5. Colorantes sintéticos

---

### 5.1. Denominación y clasificación

La industria química ha desarrollado una amplia gama de colorantes sintéticos que permiten acceder a una gran diversidad de tonalidades. Para nombrar esta variedad de productos se utilizan nombres comerciales informales debido entre otras cosas a la complejidad de sus estructuras, sin embargo, para cada colorante se pueden encontrar múltiples nombres comerciales dependiendo de los fabricantes. Por lo tanto, es importante la disponibilidad de un sistema de clasificación único que sea utilizado por todos los fabricantes así como por los consumidores, el cual asigne un código a cada

colorante.

Colour Index™ es una base de datos de referencia publicada desde el año 1924 por Society of Dyers and Colourists (SDC) y American Association of Textile Chemists and Colourists (AATCC) que actualmente contiene 27000 colorantes registrados, y se publica en la página web <http://colour-index.com>. Esta guía utiliza un sistema de clasificación dual con un descriptor llamado nombre genérico C.I. ó CIGN (Colour Index™ Generic Name) y otro llamado número de constitución ó CICN (Colour Index™ Constitution Number). De esta forma, cada colorante se describe según una clase de aplicación (por la asignación de un CIGN) y una clase química (a través del CICN). Las preparaciones comerciales contienen otras sustancias distintas al colorante denominadas aditivos, los cuales no son considerados en esta clasificación [86].

El nombre genérico C.I. (CIGN) es el principal identificador utilizado. Describe un producto por la clase de uso o aplicación, su matiz y un número serial que refleja simplemente el orden cronológico de registro, por ejemplo C.I. Acid Blue 52 o C.I. Direct Red 122. Entre las categorías de aplicación del C.I. se encuentran por ejemplo las de colorantes reactivos y directos, utilizados para teñir fibras de celulosa como el algodón o el lino; así como los colorantes dispersos, básicos, ácidos y mordientes que se usan en el teñido de lana y fibras sintéticas como el poliéster [87].

El número de constitución (CICN) consta de 5 o 6 cifras precedido de "CI". Este número es asignado al colorante cuando un fabricante registra un nuevo compuesto, y está relacionado a la estructura química del mismo. De acuerdo a su estructura, las diversas clases se diferencian en base al principal cromóforo responsable del color. Entre dichas clases se encuentran por ejemplo la de colorantes azoicos, antraquinónicos, indigoides, ftalocianinas, sulfurosos, nitro y nitrosos.

De esta forma, para el caso por ejemplo del colorante Remazol Brilliant Blue R (nombre comercial) el CIGN es Reactive Blue 19 y el CICN es CI 61200, este número se encuentra en el rango que corresponde a los colorantes antraquinónicos: 58000—72999 [86].

Dentro de una misma clase química se encuentran variantes dadas por ejemplo, por el tipo y número de grupos auxóchromos. Estos son sustituyentes como el OH, NH<sub>2</sub>, halógenos, etc, que modifican la longitud de onda y la intensidad de absorción máxima del sistema conjugado, influyendo por lo tanto en el color resultante. Los grupos distintos al cromóforo se introducen en la molécula de colorante no solo para que

contribuyan a la obtención de determinada tonalidad sino también porque les confieren buenas propiedades relacionadas a su aplicación. En el caso de la industria textil, el colorante debe fijarse sobre el tejido a teñir ya sea por adsorción o unión covalente, por interacción iónica, o por coordinación. Por otro lado, dichos colorantes deben presentar resistencia al efecto del lavado y de la exposición a la luz y una solubilidad adecuada es otra propiedad que puede ser necesaria en el compuesto [88]. Entre las distintas clases químicas existentes, los colorantes azoicos - compuestos aromáticos con uno o más grupos azo (-N=N-) asociados con grupos auxócromos (-OH o -NH-) - constituyen la más grande e importante de colorantes sintéticos usados en aplicaciones comerciales [89]. La misma incluye a los complejos azo-metálicos y se subdivide según el número de grupos azo que presente la molécula, con la mayor parte comprendida en la clase de monoazos. Casi dos tercios de todos los colorantes orgánicos del Colour Index pertenecen a esta clase, la siguiente clase química más importante es la de colorantes antraquinónicos, representando el 15 % del total, mientras que ninguna de las demás clases supera el 5% del total de colorantes indexados [87].

## **5.2. Contaminación causada por colorantes y tratamientos de efluentes coloreados**

Los problemas ambientales típicos asociados con la industria textil son aquellos relacionados a la contaminación del agua causada por la descarga de efluentes no tratados [88]. Se ha estimado que aproximadamente del 10 al 15% de los colorantes utilizados en procesos de teñido no se une a la fibra textil y 280000 toneladas de colorantes textiles se descargan en efluentes industriales por año a nivel mundial. La introducción de estos compuestos en el ambiente genera diversos impactos, el principal se debe a la absorción y reflejo de la luz solar en el agua, que afecta la actividad fotosintética de algas y otros organismos acuáticos e influye seriamente en la cadena alimentaria. Por otra parte, la percepción pública de la calidad del agua está muy influenciada por el color de la misma y dado que la presencia de colorantes es visiblemente notoria aún a concentraciones muy bajas (menor a 1 mg/L), la eliminación del color de aguas residuales es con frecuencia tanto o más importante que la eliminación de las sustancias orgánicas incoloras [87,88].

Dependiendo del tiempo de exposición y de la concentración de los colorantes, estos

pueden tener efectos tóxicos agudos y/o crónicos sobre los organismos expuestos. Además, muchos colorantes y sus productos de descomposición pueden ser cancerígenos y/o mutagénicos, existiendo una amplia evidencia de sus efectos nocivos incluso para el ser humano [88].

Los colorantes sintéticos están diseñados para ser recalcitrantes en las condiciones de uso tales como la exposición a la luz solar, el lavado, los productos químicos y el ataque microbiano, para mejorar la calidad de los textiles. Sin embargo, estas propiedades contribuyen a su persistencia en el ambiente durante un período de tiempo prolongado. Asimismo, se puede producir su acumulación en los sedimentos, en peces u otras formas de vida acuática y pueden aumentar la demanda de oxígeno disuelto de las aguas receptoras [88,90]. En el caso de los colorantes azoicos, la resistencia a la degradación se atribuye a la deficiencia electrónica originada por grupos atrayentes de electrones en la molécula [89]. En la industria textil son utilizados cerca del 80 % de los colorantes azoicos producidos. La presencia de estos compuestos en particular en el ecosistema acuático es la causa de serios problemas medioambientales, ya que los mismos presentan toxicidad aguda y crónica y pueden ser carcinógenos y/o mutagénicos [88,89].

Es así que el tratamiento de los efluentes coloreados previo al vertido es esencial. Por otra parte, la posibilidad de reciclar el agua tratada representa una gran ventaja ya que en la industria textil se utiliza un gran volumen en la etapa de acabado [91]. Como es de esperar, las propiedades de los colorantes que determinan que sean adecuados para el uso (estabilidad frente a luz, temperatura, etc) también determinan que su tratamiento sea dificultoso [88,90].

En la industria textil se han utilizado varios métodos para el tratamiento de efluentes incluyendo métodos fisicoquímicos como filtración por membrana, carbón activado, coagulación y floculación química. Aunque los mismos proporcionan una eficiente decoloración y reducción de la demanda química de oxígeno (DQO), presentan un elevado costo y conllevan la formación del lodo concentrado que crea un problema secundario de disposición de residuos.

Más recientemente, el uso de tecnología basada en la biorremediación como alternativa ha atraído interés debido a su rentabilidad, capacidad para producir menos lodos y por ser de naturaleza ecológica [89]. Los diferentes tipos de biorremediación

de efluentes coloreados pueden utilizar organismos aislados, cultivos mixtos así como enzimas aisladas [91]. Se ha reportado que la mayoría de los colorantes sintéticos son recalcitrantes frente a la biodegradación aerobia convencional y la mayoría de los colorantes azoicos no son modificados en el proceso de lodo activado, mientras que algunos se adsorben en los sólidos del lodo y solo una minoría es degradada [90–92]. Estos colorantes son considerados compuestos xenobióticos muy recalcitrantes en procesos biodegradativos. A pesar de ello, se ha demostrado que varios microorganismos son capaces de transformarlos a productos incoloros e incluso mineralizarlos completamente, como es el caso de varios hongos ligninolíticos con sus enzimas oxidasas [93].

La utilización de reactores con enzimas aisladas presenta ciertas ventajas sobre los sistemas de células enteras. La producción de la enzima se puede llevar a cabo por tecnologías de fermentación especializadas, por ejemplo, optimizando la expresión enzimática en un organismo adecuado mediante ingeniería genética y optimizando las condiciones del cultivo. Además, es posible llevar a cabo procesos como los de inmovilización y de estabilización de la enzima. El uso de enzimas inmovilizadas permite el reciclado de los efluentes decolorados en el proceso de teñido. De esta forma, los procesos de obtención y preparación del biocatalizador se separan del sitio de su aplicación [91]. Un aspecto negativo del tratamiento de efluentes con microorganismos es la necesidad de agregado de componentes adicionales para el crecimiento de los mismos, además de que secretan diversos compuestos al medio [91].

Muchas enzimas con actividad redox como peroxidasas, lacasas o azoreductasas muestran un gran potencial para la degradación de colorantes textiles, con una especificidad de sustrato relativamente amplia [89,91]. Entre estas, las lacasas parecen muy prometedoras, demostrando ser eficientes para decolorar un amplio rango de colorantes industriales sin requerir cofactores para su actividad, si bien en algunos casos el agregado de mediadores redox puede servir para extender aún más dicho rango [91].

En el caso de enzimas como reductasas u oxidasas, no es factible su aplicación de forma aislada dado el elevado costo de cofactores que necesitan como NAD(H), NADP(H) o FAD(H), resultando más adecuado el uso de sistemas de células enteras

[91]. El principal inconveniente de los procesos enzimáticos es la gama limitada de colorantes que se puede decolorar con una sola enzima, lo cual se podría solucionar mediante el uso de cócteles de enzimas.

Algunos aspectos que deben abordarse para aplicar el enfoque de decoloración enzimática son el desarrollo de fuentes de enzimas de bajo costo y alto rendimiento, la eficiencia de las enzimas en condiciones de aplicación, la caracterización de los productos de reacción y el impacto en procesos downstream y en el ambiente en el que se liberan los residuos tratados [94].

## **6. Evaluación ecotoxicológica del efecto de contaminantes en el ambiente**

---

### **6.1 Generalidades**

La Ecotoxicología es la rama de la ciencia que se ocupa del estudio de los efectos tóxicos causados por contaminantes a los componentes de los ecosistemas en un contexto integrado [95]. Se basa en el principio de que los organismos vivos son herramientas esenciales para la evaluación de la calidad ambiental, puesto que ellos son los que están expuestos a los efectos combinados de la ecotoxicidad.

La ecotoxicología aplicada tiene como objetivo el desarrollo de protocolos de ensayos biológicos estandarizados (bioensayos de toxicidad) para ser utilizados como herramientas de predicción tempranas que permitan definir umbrales permisibles, con niveles de incertidumbre aceptables, y sirvan de guía a las entidades reguladores para la toma de decisiones [96].

Desde el punto de vista regulatorio las pruebas biológicas pueden utilizarse para establecer criterios de calidad ambiental, para controlar descargas de aguas residuales municipales e industriales, para regular el uso y producción de sustancias químicas y para enjuiciar y defender actividades relacionadas con los contaminantes en casos de litigio ambiental. Por último, las industrias pueden incorporar las pruebas biológicas a su proceso de toma de decisiones con respecto al desarrollo, manufactura y comercialización de sus productos [97].

Las alteraciones que los compuestos contaminantes generan en los ecosistemas acuáticos son el resultado de los efectos letales y subletales sobre organismos de

diferente nivel trófico y distinto nivel de organización. La presencia de los contaminantes no solo afecta a los componentes bióticos de los sistemas acuáticos, sino que limita además el uso del recurso hídrico (consumo humano, recreativo, agrícola, industrial) poniendo incluso en riesgo a la salud humana.

Los efectos nocivos de los contaminantes en los organismos vivos pueden manifestarse a diferentes niveles, pueden provocar la muerte del individuo -efecto letal- así como producir una diversidad de respuestas que implican alteraciones bioquímicas y celulares -efectos subletales-. Estos últimos incluyen genotoxicidad, disrupciones endócrinas, alteraciones a nivel morfológico y fisiológico, efectos en el crecimiento y desarrollo, además de alteraciones en parámetros poblacionales [98].

La toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer el efecto nocivo y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración. Según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo, las pruebas podrán ser de tipo agudo, subcrónico o crónico. Al efecto seleccionado como parámetro a cuantificar en un bioensayo se lo denomina punto final de evaluación de la toxicidad [96,98].

Conjuntamente con la estandarización de bioensayos de toxicidad se ha buscado seleccionar pruebas que utilicen distintas especies para integrar lo que se conoce como “baterías de bioensayos”. Con esta metodología se busca identificar los efectos de los contaminantes sobre un grupo de organismos de prueba que representen distintos grupos taxonómicos de importancia ecológica y cuyas sensibilidades sean complementarias. De esta forma se hace posible detectar un efecto en el caso de muestras en las que se desconoce el origen de su toxicidad [96]. Es el caso de los efluentes sobre los que se emplean ensayos de toxicidad como estrategia regulatoria, con el fin de detectar la presencia de compuestos tóxicos no analizados químicamente; evaluando el efecto conjunto de todas las sustancias detectando efectos sinérgicos, aditivos o de potenciación [99].

La magnitud del parámetro “toxicidad” del efluente que se considera aceptable para el vertido a un cuerpo receptor va a depender de los caudales del efluente y del río al que se vuelque: la dilución del mismo en el cuerpo receptor deberá ser tal que no cause toxicidad aguda ni crónica, contemplando situaciones de bajo caudal [99]. Entre los distintos organismos a considerar para formar la batería de bioensayos es

importante incluir especies animales así como plantas vasculares, microalgas y microorganismos.

En Uruguay las instituciones que tienen como cometido la regulación y control del cumplimiento de la normativa ambiental y más específicamente en lo referido al recurso hídrico son el Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA) a través de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA); los gobiernos departamentales y el organismo estatal Obras Sanitarias del Estado (OSE) [100]. En los últimos años se ha incorporado algunos bioensayos en documentos utilizados por dichos organismos estatales como instrumento de evaluación de ecotoxicidad en el control de la calidad ambiental. En los mismos se definen estándares de calidad para cursos y cuerpos de agua, estándares de vertido a los que deben ajustarse los efluentes industriales, así como metodología de referencia para la realización de los ensayos. Es así que por ejemplo, entre los parámetros de control de calidad de agua que evalúa la Intendencia de Montevideo, se encuentran los bioensayos con el crustáceo *Daphnia magna* y el celenterado *Hydra attenuata* [101].

Por otro lado, en el documento elaborado por GESTA-Agua<sup>1</sup> donde se presenta una propuesta de modificación del Decreto 253/79 –el cual establece las pautas para control de contaminación de aguas-, así como en el “Compendio de metodologías analíticas” definido y actualizado por la DINAMA se incluyen bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna* y la bacteria *Vibrio fischeri* [102,103].

Los antecedentes bibliográficos evidencian tanto aumento como disminución de la toxicidad como consecuencia del tratamiento de distintos colorantes sintéticos con distintas metodologías. Se ha expuesto en trabajos previos que no existe una correlación precisa entre decoloración y detoxificación [104–106]. Por lo tanto, se consideró de gran importancia realizar una evaluación ecotoxicológica del tratamiento enzimático propuesto en esta tesis, de potencial aplicación tanto para efluentes de la industria textil así como de la del cuero. Asimismo, se utilizó más de un bioensayo para tener una idea más integral del impacto que produciría al ser introducido el producto de este tratamiento en un ecosistema determinado. Se utilizaron tres bioensayos para la evaluación de toxicidad aguda de colorantes azoicos y de los productos obtenidos en la reacción de degradación de dichos compuestos con la enzima lacasa. En este caso, la

---

<sup>1</sup> Grupo de Estandarización Ambiental en tema AGUA creado por la Comisión Técnica Asesora para la Protección del Medio Ambiente (COTAMA) que trabaja bajo la órbita del MVOTMA.

aplicación de los bioensayos se enfoca principalmente en la comparación de la toxicidad de la solución de colorante previa y posterior al tratamiento enzimático, aunque también se analiza la viabilidad de su potencial aplicación teniendo en cuenta la normativa vigente. El grupo de pruebas utilizadas incluye una especie vegetal (*Lactuca sativa*), un microcrustáceo de agua dulce representante del zooplancton (*Daphnia magna Straus*) y una bacteria bioluminiscente (*Vibrio fischeri*).

Los tres ensayos son de amplia aplicación en la determinación de toxicidad a nivel global y recomendados por distintos organismos de protección del medio ambiente como la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (OECD), la Asociación Americana para la Salud Pública (APHA), la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) y la Agencia Ambiental de Canadá (Environment Canada), así como por el Organismo Internacional de normalización (ISO), con publicaciones donde se pueden encontrar los protocolos de ensayo estandarizados correspondientes (**tabla I-1**).

## 6.2 Bioensayo de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa*

Entre los ensayos con plantas vasculares recomendados para la evaluación de efectos fitotóxicos se encuentran los que utilizan semillas de plantas terrestres, evaluando principalmente el efecto de los contaminantes en el proceso de germinación y en el desarrollo y establecimiento de las plántulas en los primeros días de crecimiento [98].

**Tabla I-1** Protocolos estandarizados para ensayos de toxicidad aguda con *Lactuca sativa*, *Daphnia magna* y *Vibrio fischeri*.

---

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b><i>Lactuca sativa</i></b> | <p><b>OECD TG 208</b> (2006) Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test.</p> <p><b>ISO 11269-1</b> (2012) Soil quality -- Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth,</p> <p><b>US EPA</b> (1989) Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites, US Environmental Protection Agency, 600/3-88/029, Corvallis.</p> |
|------------------------------|---|

---

Tabla I-1. Continuación

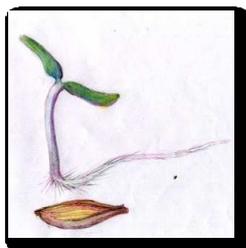
---

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b><i>Daphnia magna</i></b>   | <p><b>OECD 202</b> (2004) <i>Daphnia</i> sp. Acute Immobilisation Test.</p> <p><b>ISO 6341</b> (1996 / 1998) Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test.</p> <p><b>Environment Canada</b> (2000b) Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to <i>Daphnia magna</i>, EPS 1/RM/14, 2nd ed. Environment Canada, Ottawa, Ontario.</p> <p><b>APHA-AWWA-WEF</b> (2011) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 8711 <i>Daphnia</i>. Standard Methods online. (<a href="http://www.standardmethods.org/Store/index.cfm">www.standardmethods.org/Store/index.cfm</a>)</p> <p><b>US EPA</b> (1991) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluent and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, EPA-600/4-90-027. 4th ed, US Environmental Protection Agency Weber.</p> |
| <b><i>Vibrio fischeri</i></b> | <p><b>Environment Canada</b> (1992c) Toxicity Test using Luminescent Bacteria, EPS 1/RM/24. Environment Canada, Ottawa, Ontario.</p> <p><b>ISO 11348</b> (2007) Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Luminescent bacteria test).</p> <p><b>APHA-AWWA-WEF</b> (2011) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 8050 Bacterial Bioluminescence. Standard Methods online (<a href="http://www.standardmethods.org/Store/index.cfm">www.standardmethods.org/Store/index.cfm</a>)</p>  |

---

Estas pruebas de fitotoxicidad consisten en ensayos estáticos, presentando como ventaja que pueden ser usadas con muestras coloreadas o turbias, con una metodología simple y con un mínimo costo ya que no requieren equipamiento sofisticado [107].

La especie *L. sativa* está ampliamente difundida para su aplicación en los diferentes protocolos para evaluar la toxicidad con semillas (**fig. I-9**), tanto por su sensibilidad a diferentes tipos de contaminantes (metales, pesticidas y otros compuestos orgánicos), como por la simplicidad en la ejecución del bioensayo ya que es de fácil y rápida germinación haciendo posible desarrollar la prueba en pocos días [98].



**Figura I-9.** Semilla y plántula de *L. sativa*. (Fuente: *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas* [96])

Se trata de una prueba estática de toxicidad aguda - 120 horas de exposición- en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento.

Es importante destacar que durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos.

Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en otras semillas o plántulas.

La inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación. La evaluación de dichos efectos permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación.

Este bioensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales -lagos, ríos-, aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos o lodos [97].

Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las

márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola.

### 6.3. Bioensayo de toxicidad aguda con el crustáceo *Daphnia magna*

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladóceros de la clase crustácea, y especies como *Daphnia magna* (**fig. I-10**), *Daphnia pulex* y *Daphnia similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos tóxicos [96].

Los ensayos de toxicidad con *Daphnia magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros.



**Figura I-10.** *Daphnia magna* Straus. Fuente: Haney J.F. *et al* [108].

Esta especie es llamada comúnmente pulga de agua, debido a su desplazamiento por saltos originados por las contracciones de sus antenas. Es el crustáceo cladóceros más comúnmente utilizado como organismo de prueba o de referencia en ensayos ecotoxicológicos, ya que presenta algunas características que lo hacen muy apropiado para este fin. Su tamaño es pequeño, no superando los 5 milímetros de largo, por lo que no se requiere un gran espacio para su cultivo, siendo este de fácil implementación en el laboratorio. Con respecto al ciclo de vida, alcanzan temprano la madurez produciendo neonatos en su primera semana de vida. Luego de esta primera camada, los adultos dan lugar a nuevas crías cada dos o tres días por el resto de su vida, que dura aproximadamente 2 meses en un cultivo a 20 °C. En cada camada se obtienen aproximadamente 20 neonatos por hembra, y estos son los individuos utilizados como organismos de prueba en el ensayo de ecotoxicidad. Cada hembra puede dar cuatrocientos hijos o más en todo el ciclo de vida.

Cuando las condiciones son favorables, la población está formada solo por hembras

debido a que se reproducen por partenogénesis, dando nuevas hembras genéticamente idénticas a sus madres sin fecundación. La reproducción sexual se da únicamente en condiciones de estrés. Esta característica representa una ventaja importante para el ensayo ya que asegura que la respuesta sea homogénea en todos los individuos utilizados. Por otro lado, son organismos de amplia distribución geográfica y representativos de la comunidad zooplanctónica de agua dulce que sirve de alimento a muchos peces [109].

Entre los protocolos estandarizados desarrollados para la aplicación de este bioensayo se encuentran los de la norma de referencia para el análisis de sustancias químicas, publicada por la organización internacional OECD "Guidelines for the Testing of Chemicals". El test OECD 202 (Prueba aguda de inmovilización con *Daphnia* sp.) seleccionado para este trabajo, describe el análisis de toxicidad aguda de 48 horas de exposición, donde los neonatos menores de 24 h de edad se exponen a distintas concentraciones de la sustancia a estudiar, y se cuantifica el número de organismos muertos para calcular la concentración letal media (CL50) o concentración de la sustancia que se estima letal para el 50 % de los organismos de ensayo [110].

#### **6.4 Bioensayo de toxicidad aguda con la bacteria *Vibrio fischeri*: Microtox®**

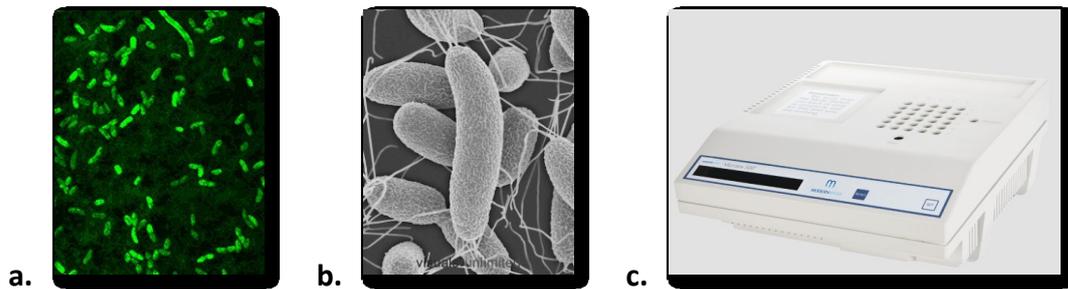
Se trata de un ensayo microbiológico donde se utiliza un organismo procariota para evaluar toxicidad aguda de la muestra en estudio.

El microorganismo utilizado en el ensayo Microtox®, *V. fischeri* (**fig. I-11 a y b**), es una bacteria marina saprofita gram negativa, que presenta la bioluminiscencia como característica más representativa, emitiendo una luz verde-azulada. Este fenómeno se debe a la reacción catalizada por la enzima luciferasa y está ligado al sistema de transporte de electrones en la respiración celular. Es así que una disminución de la bioluminiscencia es indicativa de interrupción de este proceso metabólico, que puede ser causada por agentes físicos, químicos o biológicos en el medio [97].

Microtox® es un ensayo rápido, fácil de realizar y que requiere poco volumen de muestra así como un espacio mínimo de laboratorio. Se destaca la estabilidad en la emisión de luz así como la gran sensibilidad que presenta a una amplia variedad de sustancias tóxicas.

Es ampliamente usado en la determinación de toxicidad en tratamiento de efluentes así como una herramienta de evaluación de toxicidad relativa como parte de una

batería de bioensayos para el monitoreo de cursos de agua y fuentes de agua destinada al consumo humano para detectar contaminación debida a fuentes puntuales o difusas; análisis de suelo y sedimentos; monitoreo de procesos de remediación; etc. El sistema puede detectar contaminantes no conocidos así como efectos sinérgicos de mezclas de compuestos. Por otro lado, el reactivo liofilizado que contiene la cepa de *V. fischeri* proviene de un cultivo clonal, lo que minimiza las diferencias genéticas entre los individuos asegurando la precisión en el ensayo.



**Figura I-11.** Bioensayo Microtox® **a.** Microscopía de fluorescencia de células de *Vibrio fischeri* [111] **b.** Microscopía electrónica de barrido [112] **c.** Analizador Microtox® ModernWater modelo 500 [113].

La emisión de luz se puede detectar inmediatamente luego de la activación por resuspensión del liofilizado en la solución de reconstitución, sin necesidad de realizar un pre-cultivo del microorganismo. Por otro lado, no es necesario trabajar en condiciones asépticas dado el breve período de incubación requerido, obteniéndose las lecturas correspondientes en un tiempo menor a 30 minutos.

La determinación del punto final se basa en la cantidad de luz remanente de la suspensión homogénea de bacterias luego del período de exposición a alícuotas de distinta concentración de la muestra, con lo que se calcula la toxicidad relativa a un control. Con el fin de realizar este ensayo bajo condiciones estandarizadas se han desarrollado analizadores especializados. Estos analizadores funcionan controlando las condiciones del ensayo y como luminómetro, midiendo la luz emitida y cuantificando el efecto tóxico de la muestra (**fig. I-11 c**). Para la expresión del resultado se utiliza un software con un modelo log-lineal con el que se determina la concentración de muestra que causa 50 % de disminución de luz, es decir el valor de concentración efectiva media CE50 [114,115].

## CAPÍTULO II

Producción de lacasa  
por basidiomicetes de  
la podredumbre  
blanca de la madera



# 1. OBJETIVOS

- Selección de cepas de basidiomicetes de la podredumbre blanca de la madera para la producción de lacasa.
- Estudio de condiciones de cultivo para maximizar la producción de lacasa por las cepas seleccionadas.

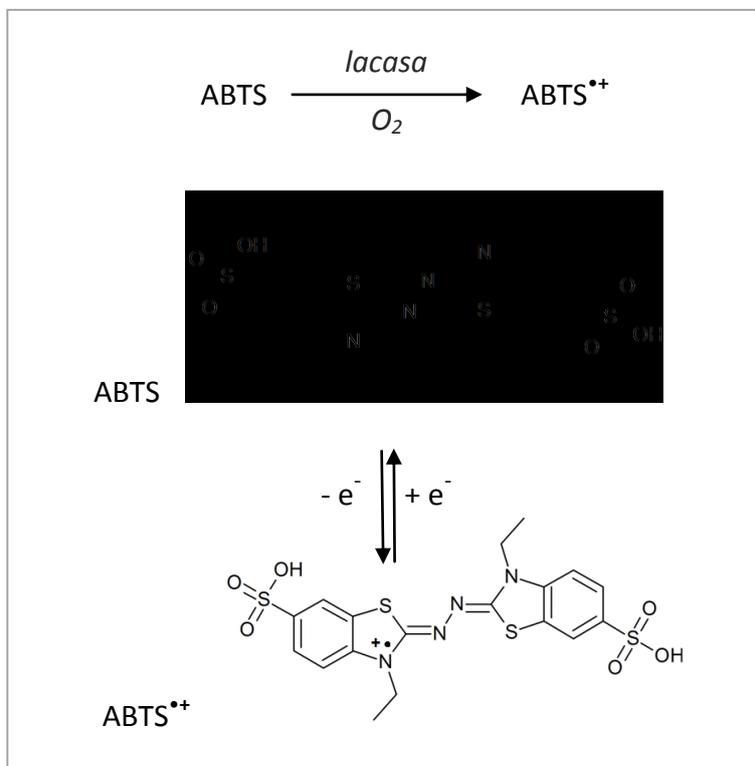
## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Determinación de actividad enzimática

#### 2.1.1. Actividad lacasa

La actividad lacasa se determinó por oxidación del sustrato artificial ABTS (2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6- ácido sulfónico)) [116]. Se registró el aumento de absorbancia por minuto a 436 nm empleando el coeficiente de extinción del catión radical formado (ABTS<sup>•+</sup>, 29300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> [117]) para el cálculo de actividad enzimática (**fig. II-1**).

La mezcla de reacción consistió en 1.0 mL de ABTS 5.5 mM (concentración final 5.0 mM en acetato de sodio 0.1 M, pH 4.8) y 0.1 mL de muestra. La unidad de enzima (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol del sustrato por minuto a pH 4.8 y temperatura ambiente (22 °C). La actividad se expresó en UE/L.



**Figura II-1.** Oxidación del sustrato artificial ABTS por lacasa en el ensayo de actividad [116,118].

Se encontró reportado casos en que *Pycnoporus sanguineus* no expresa las actividades lignina y manganeso peroxidasa, principales enzimas del sistema ligninolítico extracelular junto a la lacasa [119–122]. Ya que en las reacciones de decoloración se utilizó el sobrenadante del cultivo con actividad lacasa de este basidiomicete (Capítulo V-2.2), para descartar la acción superpuesta de las peroxidases y la lacasa se determinaron dichas actividades con los ensayos que se describen a continuación.

### 2.1.2. Actividad lignina peroxidasa (LiP)

La actividad LiP se determinó por oxidación del sustrato alcohol veratrílico 2.0 mM en tartrato 50.0 mM, pH 3.0, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4 mM. Se registró la pendiente midiendo absorbancia a 310 nm durante 3 minutos luego de agregar el peróxido de hidrógeno [123].

La unidad de enzima (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µmol de alcohol veratrílico por minuto a pH 3.0 y temperatura ambiente (22 °C).

### 2.1.3. Actividad manganeso peroxidasa (MnP)

La actividad MnP se determinó por oxidación del sustrato 2,6-dimetoxifenol 1.0 mM en malonato 50.0 mM, pH 4.5, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4 mM. Se registró la pendiente midiendo absorbancia a 468 nm durante 3 minutos luego de agregar el peróxido de hidrógeno [124].

La unidad de enzima (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µmol de 2,6-dimetoxifenol por minuto a pH 4.5 y temperatura ambiente (22 °C).

## 2.2 Selección de cepas de basidiomicetes aislados en Uruguay

Se estudió la producción de lacasa por cepas nativas de basidiomicetes aislados en zonas forestadas con *Eucalyptus globulus* en Uruguay.

Se utilizaron las cepas *Pycnoporus sanguineus* 5050, *Peniophora lycii* 7267, *Phanaerochaete crassa* 7227, *Inocutis jamaicensis* 1467, *Porostereum crassum* 1436, *Trametes versicolor* 1487 y *Trametes villosa* 1449. Las mismas pertenecen a la

colección del Departamento de Micología de Facultad de Ciencias, UdelaR. Se conservaron refrigeradas a 4 °C y fueron sub-cultivadas en Agar Malta (7 días, 28 °C) cada 3 meses.

Se realizó el cultivo mediante fermentación en medio líquido o “cultivo sumergido”. Para ello se colocó 50 mL de medio líquido en matraces de 250 mL y luego de la esterilización (121 °C, 15 min) se inoculó cada uno con un disco de 7 mm de diámetro de agar con micelio (7 días de crecimiento en Agar Malta, 28 °C).

La incubación se realizó a 28 °C con agitación (150 rpm) y aireación pasiva (tapones de algodón) durante 25 días.

Como medio de cultivo se utilizó extracto de malta 5.0 % en agua destilada (EM) y EM suplementado con sulfato de cobre 1.0 mM (EMCu). Los experimentos fueron realizados por duplicado.

Se cuantificó actividad lacasa en alícuotas de medio líquido extraídas en condiciones estériles.

### **2.3 Optimización de la producción de lacasa por *Trametes villosa* y *Pycnoporus sanguineus* en cultivo sumergido**

Utilizando el cultivo sumergido se inició el estudio de algunas variables para las dos cepas de basidiomicetes seleccionadas en el experimento anterior. Para *T. villosa* se analizaron variables de forma individual mientras que para *P. sanguineus* se realizó un diseño factorial.

#### **2.3.1. *Trametes villosa***

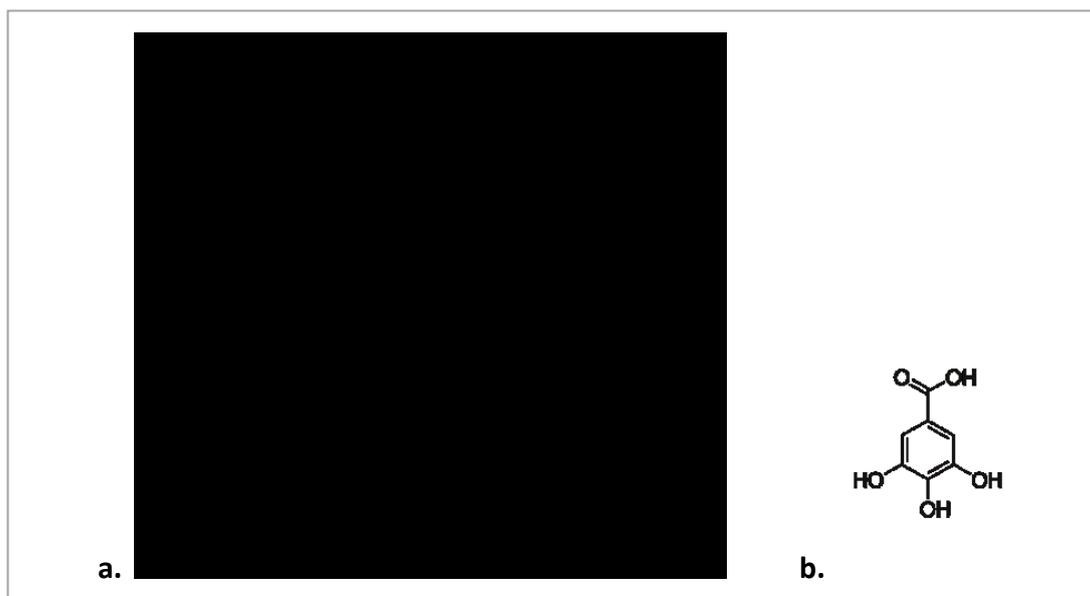
Se estudiaron las variables que se describen a continuación.

- Tiempo de cultivo: se estudió la producción de lacasa durante 25 días en medio EM y EMCu. El inóculo consistió en 1 disco de agar con micelio de 7 mm de diámetro (cultivo de 7 días, 28 °C).

- Tamaño de inóculo: se probaron dos tamaños de inóculo colocando 1 y 3 discos de agar con micelio en el medio EM. Los cultivos se incubaron durante 16 días.

- Efecto de inductores: Se estudió el efecto inductor del sulfato de cobre (1.0 mM y 0.5 mM), de los compuestos fenólicos ácido gálico (30.0 mM) y ácido tánico (1.0 mM) así como de material lignocelulósico de un árbol de *Eucalyptus grandis* (20.0 g/L). De este se utilizó por separado corteza, madera (tejido leñoso interior del tronco) y nudos (zona resultante del rastro dejado por el desarrollo de una rama).

Las concentraciones utilizadas para ambos compuestos fenólicos fueron distintas debido a la diferencia en sus estructuras (**fig. II-2**), ya que el ácido tánico es un polímero comprendido por 10 o más unidades de ácido gálico. Los distintos tipos de material proveniente de *E. grandis* fueron utilizados debido a la diferencia en su composición respecto al contenido de compuestos fenólicos [125]. Los experimentos fueron realizados con agitación a 150 rpm durante 16 días en EM. El inóculo fue 1 disco de agar con micelio (7 días, 28 °C).



**Figura II-2.** Estructura de los compuestos fenólicos utilizados como inductores. **a:** ácido tánico, **b:** ácido gálico.

### 2.3.2. *Pycnoporus sanguineus*

Con la finalidad de realizar un estudio mas exhaustivo de distintas variables que afectan la producción de lacasa, incluyendo componentes del medio como la fuente de carbono o nitrógeno, se utilizó un medio basal en lugar del medio nutriente EM.

La composición del medio líquido basal utilizado fue:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.8 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2 g/L,

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, tiamina 2.0 g/L, extracto de levadura 2.0 g/L. De esta forma, se diseñó un experimento factorial para estudiar de forma simultánea el efecto de distintas variables en la producción de lacasa por *P. sanguineus* en cultivo sumergido. El mismo fue realizado en 2 bloques idénticos con 20 unidades experimentales cada uno. Una unidad experimental corresponde a cada matraz donde el cultivo fue realizado, con los niveles de las variables seleccionadas de acuerdo al diseño **(ANEXO II - 1)**.

Se estudiaron 3 variables, agregando al medio basal la fuente de carbono (glucosa ó glicerol), la de nitrógeno (sulfato de amonio ó urea) y el inductor (nudos de *Eucalyptus dunii*, sulfato de cobre ó ácido gálico) correspondiente a cada tratamiento, en las concentraciones indicadas en la **tabla II-1**.

**Tabla II-1** - Concentraciones de componentes agregados al medio basal para el experimento factorial en cultivo sumergido con *P. sanguineus*.

| Factores    |   | Concentración * |
|-------------|---|-----------------|
| Fuente de C | Glucosa   | 10.0 g/L        |
|             | Glicerol  | 10.0 g/L        |
| Fuente de N | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1.0 g/L         |
|             | Urea  | 1.0 g/L         |
| Inductor    | Nudos de <i>Eucalyptus dunii</i>                | 20.0 g/L        |
|             | CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O            | 1.0 mM          |
|             | Ácido Gálico                                    | 2.0 g/L         |

\* Concentración final en el medio líquido.

El cultivo se realizó en matraces de 250 mL con 50 mL de medio líquido, con agitación (150 rpm) a 28 °C. El inóculo consistió en un disco de 7 mm de diámetro de agar con micelio del hongo con 7 días de crecimiento sobre Agar Malta a 28 °C.

Se midió actividad lacasa en el sobrenadante día por medio desde el día 6 al 14.

Para este experimento y los restantes descritos en el capítulo tanto el diseño experimental como el análisis estadístico de los resultados fueron llevados a cabo con la colaboración del Dr. Juan Burgueño de la Unidad de Biometría y Estadística de CIMMYT (México). Se utilizó el software SAS 9.3 (SAS Institute Inc.).

## 2.4. Optimización de la producción de lacasa por fermentación en estado semi-sólido (FSS)

El inicio de este trabajo se realizó como parte de una pasantía en el Instituto CEIT de San Sebastián en España, bajo la supervisión de la Dra. Susana Rodriguez-Couto.

### 2.4.1. Producción de lacasa por *Pycnoporus sanguineus* por FSS

La optimización de la producción de lacasa por FSS para este hongo se realizó en dos etapas empleando la metodología de diseño de experimentos: se seleccionó primero las variables con efecto significativo mediante un experimento factorial fraccionado y luego se utilizó un experimento factorial completo para buscar los niveles óptimos de las mismas.

Por último, se agregó un experimento para estudiar el efecto de inductores, los cuales no fueron incluidos en los diseños mencionados anteriormente .

Como soporte-sustrato se utilizó corteza de *Eucalyptus grandis* y como medio líquido basal la mezcla:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L y tiamina 5.0 mg/L en Citrato-Fosfato 0.1 M, de pH variable según el tratamiento.

Tanto en estos experimentos como en los realizados para *T. villosa* descritos más adelante, el cultivo en fase semi-sólida se realizó en matraces de 250 mL conteniendo el sustrato sólido y 20.0 mL de medio líquido de composición variable según cada tratamiento.

Los matraces esterilizados (121 °C, 20 min) fueron inoculados con 3 discos de agar de 7 mm de diámetro del cultivo del hongo de 7 días en Agar Malta e incubados a 28 °C de forma estática y con aireación pasiva (**fig. II-3**).

El análisis de actividad enzimática se realizó tomando alícuotas de medio líquido en condiciones estériles y centrifugando a 8000 x g durante 10 minutos para utilizar el sobrenadante en el ensayo correspondiente.



**Figura II-3.** Cultivo en fase semi-sólida de *Pycnoporus sanguineus*.

#### 2.4.1.1 Estudio exploratorio

Se utilizó un Diseño factorial fraccionado  $2^{8-4}$ . Se estudiaron 8 variables en 2 niveles cada una (**tabla II-2**) resultando en 16 tratamientos. Se realizaron 2 repeticiones de cada tratamiento más 4 repeticiones del punto central (36 unidades experimentales) (**ANEXO II - 2**). Los factores o variables y los rangos en los que se utilizaron se eligieron en base a literatura [72,126,127] y a experimentos preliminares.

En este experimento se incluyó peptona y extracto de levadura para analizar el efecto de fuentes de nitrógeno orgánico además de la de urea ya estudiada en cultivo líquido.

**Tabla II-2.** Niveles de las variables independientes del diseño factorial fraccionado  $2^{8-4}$  para *P. sanguineus* (FSS)

| Variables                        | Nivel bajo (-1) | Nivel alto (+1) |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| Glucosa (g/L)                    | 5.0             | 20.0            |
| Glicerol (g/L)                   | 5.0             | 20.0            |
| Peptona de caseína (g/L)         | 5.0             | 20.0            |
| Urea (g/L)                       | 5.0             | 20.0            |
| Extracto de levadura (g/L)       | 5.0             | 20.0            |
| Corteza de <i>E. grandis</i> (g) | 0.72            | 2.00            |
| pH                               | 3.0             | 6.0             |
| Tiempo de incubación (días)      | 7               | 14              |

#### 2.4.1.2 Diseño factorial completo $2^4$

A partir del experimento anterior se seleccionaron como variables para este diseño: glucosa, extracto de levadura, pH y corteza de *Eucalyptus grandis*.

Se evaluaron 3 niveles de estas variables (**tabla II-3**) utilizando un diseño factorial completo  $2^4$  con dos repeticiones y cuatro puntos centrales resultando en 16 tratamientos y 36 unidades experimentales (**ANEXO II – 3 A**).

Como se verá en la sección de resultados, la corteza no fue un factor con efecto significativo en el experimento exploratorio anterior, no obstante, la misma fue seleccionada para el presente diseño dada la función fundamental que cumple el sustrato sólido en este tipo de cultivo. El tiempo de incubación se fijó en 14 días.

**Tabla II-3.** Niveles de variables independientes estudiadas en el diseño factorial completo  $2^4$  para *P. sanguineus* (FSS)

| Variables                     | Niveles |      |      |
|-------------------------------|---------|------|------|
|                               | - 1     | 0    | + 1  |
| Glucosa (g/L)                 | 5.0     | 7.5  | 10.0 |
| Extracto de levadura (g/L)    | 10.0    | 15.0 | 20.0 |
| Corteza <i>E. grandis</i> (g) | 1.0     | 2.0  | 3.0  |
| pH                            | 3.0     | 4.0  | 5.0  |

#### 2.4.1.3 Evaluación del efecto de inductores en la producción de lacasa

Con la composición del medio de cultivo seleccionada a partir de los diseños factoriales se evaluó el efecto de 3 posibles inductores de la producción de lacasa: sulfato de cobre (0.5, 1.0 y 2.0 mM), sulfato de manganeso (0.5, 1.0 y 2.0 mM) y lignina álcali (0.1 %). Se realizaron 3 repeticiones para cada tratamiento y se incluyó un control donde no se agregó ninguno de estos compuestos.

Se estudió el efecto de la adición de cobre en distintos momentos del cultivo. Para ello se agregó sulfato de cobre 0.5 mM los días 0, 3 y 7 del cultivo. Se realizaron 3 repeticiones de los 3 tratamientos. Se midió actividad lacasa en sobrenadante día por medio a partir del día 5 en los 3 cultivos.

#### 2.4.2. Producción de lacasa por *Trametes villosa* por FSS

Siguiendo la misma estrategia empleada para la cepa de *P. sanguineus*, se realizó un estudio exploratorio inicial de variables y luego diseños de optimización para encontrar los niveles de las variables seleccionadas que permitan obtener la mayor producción de actividad enzimática con la cepa de *T. villosa* en el cultivo semi-sólido.

En este caso, el sulfato de cobre se agregó como parte del medio basal en lugar de estudiarlo como variable en los distintos diseños debido a que su efecto inductor fue probado previamente en el cultivo sumergido. Además, se observó el mismo efecto para la cepa de *P. sanguineus* tanto en cultivo sumergido como en fase semi-sólida. Asimismo, el efecto inductor del cobre ha sido reportado extensamente para distintos basidiomicetes [27,128,129] e incluso para una cepa de *T. villosa* se comprobó el aumento de ARN mensajero codificante para la enzima producido por el cobre [130]. La concentración 1.0 mM se seleccionó de acuerdo a estudios preliminares y a la bibliografía relacionada. Se descartó la opción de probar concentraciones mayores ya que las mismas podrían inhibir el crecimiento del hongo [73,131,132].

Composición del medio líquido basal: sulfato de cobre 1.0 mM, tampón Citrato-Fosfato 0.1 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L, extracto de levadura 0.1 g/L, tiamina 5.0 mg/L.

Los matraces con el sustrato sólido y el medio líquido correspondiente al tratamiento (20 mL) fueron esterilizados en autoclave e inoculados con 3 discos de 7 mm de diámetro del cultivo del hongo de 7 días en Agar Malta a 28°C. La incubación se realizó durante 14 días, a 28 °C.

##### 2.4.2.1 Diseño factorial exploratorio

Para este diseño se seleccionaron como variables la fuente de nitrógeno, la de carbono, el pH, el sustrato y se incluyeron compuestos fenólicos como inductores, dado el efecto observado previamente en medio líquido para ácido gálico (**tabla II-4**). Se realizó un diseño factorial fraccionario ( $2^3 \times 3 \times 4$ ) con 32 tratamientos (**ANEXO II - 4**) que permite estimar efectos principales e interacciones de los factores involucrados. En este experimento se evaluó además el efecto del volumen final del sobrenadante

como covariable. Para ello la respuesta (actividad lacasa medida) fue expresada como concentración (UE/L) y como actividad total (unidades totales, UEt).

**Tabla II-4.** Variables estudiadas en el diseño factorial exploratorio para *T. villosa*

| Sustrato <sup>a</sup>       | Fuente de Carbono <sup>b</sup> | Fuente de Nitrógeno <sup>b</sup> | Inductores <sup>c</sup> | pH <sup>d</sup> |
|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Madera de <i>E. dunii</i>   | Glucosa                        | Urea                             | Ácido gálico            | 3.0             |
| Madera de <i>E. grandis</i> | Glicerol                       | Peptona                          | Pirogalol               | 4.5             |
|                             |                                |                                  | Pirocatecol             | 6.0             |
|                             |                                |                                  | 4- metil pirocatecol    |                 |

**a** Se agregó 4.0 g de sustrato sólido. **b** La concentración utilizada fue 10 g/L. **c** Compuestos fenólicos en concentración 1.0 mM. **d** Tampón citrato-fosfato 0.1 M.

#### 2.4.2.2 Primer diseño factorial de optimización

A partir del diseño exploratorio realizado se definieron las variables a considerar en este experimento. El pH se mantuvo en un valor bajo (2.5) y no se agregó compuesto fenólico. Se agregó el uso de corteza de *E. grandis* además de la madera como sustrato y se estudió el efecto del método de procesamiento del material, ya que al ser la corteza más fina puede ser fragmentada en pequeños trozos sin necesidad de ser procesada en molino. Se utilizó madera molida, corteza molida y corteza troceada de forma manual (**tabla II-5**). El diseño consistió en 27 tratamientos realizados por duplicado en dos bloques (**ANEXO II - 5**).

**Tabla II-5.** Factores y niveles utilizados en el primer diseño factorial de optimización para *T. villosa* en FSS.

| Sustrato (3.0 g, <i>E. grandis</i> ) | Glucosa (g/L) | Peptona (g/L) |
|--------------------------------------|---------------|---------------|
|                                      | 2.0           | 2.0           |
| Corteza molida                       | 4.7           | 4.7           |
| Corteza troceada                     | 7.3           | 7.3           |
| Madera molida                        | 10.0          | 10.0          |
|                                      | 12.7          | 12.7          |

#### 2.4.2.3 Segundo diseño factorial de optimización

En este diseño de optimización final se estudió el efecto del contenido de glucosa y peptona utilizando corteza molida de *E. grandis* como sustrato (3 g) y tampón Citrato-Fosfato pH 2.5. Los niveles utilizados se muestran en la **tabla II-6**. Para peptona se incluyó uno adicional (22.5 g/L) debido a que previamente se observó que la respuesta era mayor a mayor concentración de esta fuente de nitrógeno.

Se utilizó un diseño factorial completo, con 12 tratamientos y 3 repeticiones de cada uno (36 unidades experimentales) (**ANEXO II - 6**).

**Tabla II-6.** Concentraciones de glucosa y peptona utilizadas en el diseño factorial completo.

| Glucosa (g/L) | Peptona (g/L) |
|---------------|---------------|
| 0.0           | 0.0           |
| 7.5           | 7.5           |
| 15.0          | 15.0          |
|               | 22.5          |

### 3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

#### 3.1. Selección de cepas de basidiomicetes aislados en Uruguay

Se observó que las cepas de *P. crassa*, *P. lycii* e *I. jamaicensis* no fueron buenas productoras de actividad lacasa en las condiciones de cultivo utilizadas, mientras que para *P. crassum* no se detectó actividad (**tabla II-7**).

**Tabla II-7.** Estudio de la producción de lacasas por cepas nativas de basidiomicetes aisladas en Uruguay

| Cepa |                              | EM <sup>a</sup>    |             | EMCu <sup>b</sup>  |             |
|------|------------------------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|
| N°   | Nombre                       | Act. máxima (UE/L) | Día cultivo | Act. máxima (UE/L) | Día cultivo |
| 5050 | <i>Pycnoporus sanguineus</i> | 236.0              | 10          | <b>2410.0</b>      | 16          |
| 7267 | <i>Peniophora lycii</i>      | 46.0               | 10          | 186.0              | 6           |
| 7227 | <i>Phanaerochaete crassa</i> | 4.0                | 6           | 3.0                | 6           |
| 1467 | <i>Inocutis jamaicensis</i>  | 11.6               | 16          | 30.2               | 13          |
| 1436 | <i>Porostereum crassum</i>   | 0.0                | -           | 0.0                | -           |
| 1487 | <i>Trametes versicolor</i>   | 130.1              | 12          | <b>521.2</b>       | 16          |
| 1449 | <i>Trametes villosa</i>      | 189.0              | 25          | <b>4150.0</b>      | 16          |

**a.** EM: medio extracto de malta 5.0 %. **b.** EMCu: medio extracto de malta 5.0 % suplementado con sulfato de cobre 1.0 mM.

Con las cepas de *Trametes villosa*, *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes versicolor* se observó buena producción de actividad lacasa. Por otro lado, la actividad aumentó en el medio suplementado con sulfato de cobre 1.0 mM, obteniéndose la mayor actividad con *T. villosa*.

➤ *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes villosa* fueron las cepas seleccionadas para continuar con los siguientes estudios. Se descartó *T. versicolor* por tratarse de un basidiomicete cuya lacasa se encontraba ampliamente estudiada.

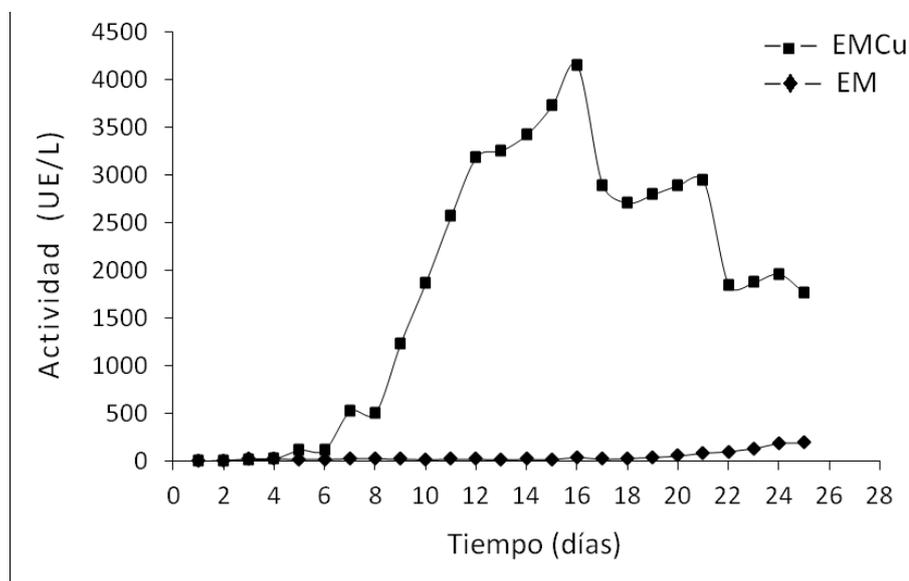
### 3.2. Optimización de la producción de lacasa en cultivo sumergido por cepas de *Trametes villosa* y *Pycnoporus sanguineus*

#### 3.2.1 *Trametes villosa*

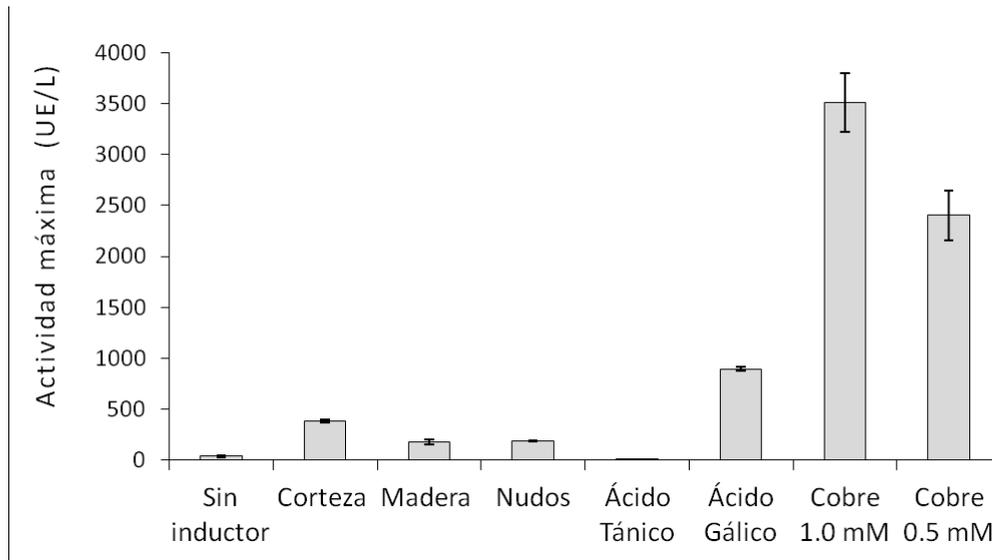
- *Tiempo de cultivo.* Se alcanzó la máxima actividad el día 16 en el medio suplementado con cobre (**fig. II-4**).

- *Efecto del inóculo:* No se observó diferencia en la actividad lacasa máxima obtenida para los cultivos inoculados con uno (151.7 UE/L) o tres discos de agar (112.8 UE/L).

- *Efecto de inductores:* La máxima actividad alcanzada se obtuvo con sulfato de cobre en concentración 1.0 mM (**fig. II-5**). Entre los compuestos distintos al cobre, el ácido gálico fue el de mayor efecto inductor, alcanzando una cuarta parte de la actividad máxima obtenida con cobre 1.0 mM. La corteza fue el material lignocelulósico que mostró mayor efecto inductor.



**Figura II-4.** Producción de lacasa por *T. villosa* en cultivo sumergido. Actividad registrada en cada día del cultivo en los medios EM y EMCu.



**Figura II-5.** Efecto de inductores en la producción de lacasa por *T.villosa* en medio EM. Se representa la actividad máxima registrada.

### 3.2.2 *Pycnoporus sanguineus*

La fuente de nitrógeno tuvo un efecto significativo: de las dos fuentes utilizadas urea fue la que permitió alcanzar mayor actividad. El efecto de la fuente de carbono no fue significativo, siendo equivalente el resultado observado para glucosa o glicerol (**tabla II-8, fig. II-6 a**).

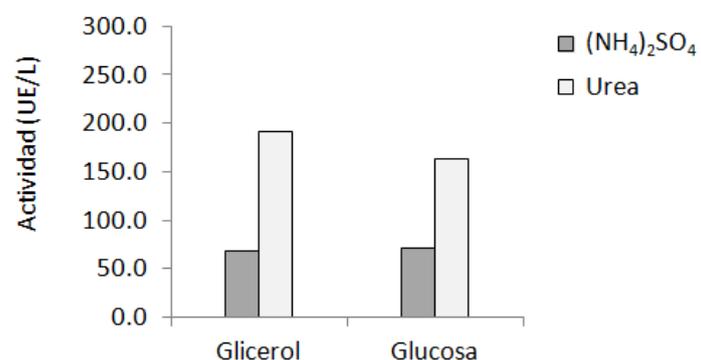
Por otro lado, acorde a lo esperado de acuerdo a la bibliografía disponible y a los resultados obtenidos para *T. villosa*, tanto el cobre como el compuesto fenólico ácido gálico y el material lignocelulósico rico en compuestos aromáticos y fenólicos mostraron un efecto inductor en la producción de lacasa (**tabla II-8, fig. II-6 b**). En base a este resultado no es posible seleccionar alguno de los tres inductores ya que la diferencia en la actividad obtenida no fue significativa (**tabla II-9**).

En este experimento las máximas actividades fueron registradas ente los días 12 y 14 de la incubación en la mayoría de las unidades experimentales (**ANEXO II – 1**).

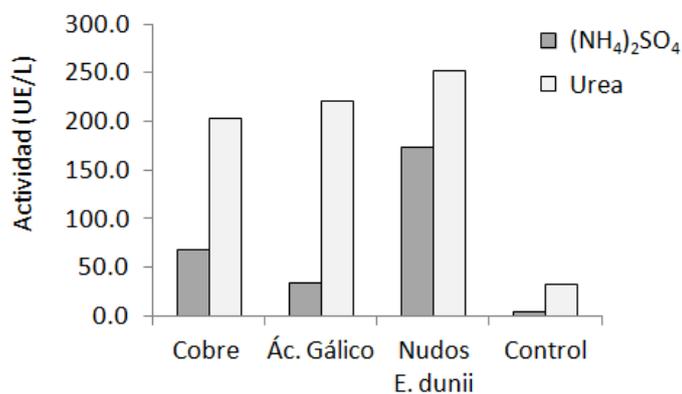
**Tabla II-8.** ANOVA para el diseño factorial de *P. sanguineus* en cultivo sumergido

| Factor               | p-valor |
|----------------------|---------|
| Inductor             | <.0001  |
| FdeC                 | 0,8000  |
| Inductor * FdeC      | 0,5849  |
| FdeN                 | 0,0381  |
| Inductor * FdeN      | 0,3950  |
| FdeC * FdeN          | 0,0561  |
| Inductor * FdeC*FdeN | 0,1351  |
| Varianza residual    | 1,904   |
| Media                | 3,6     |

Notas: El asterisco representa interacción entre los factores. FdeC: fuente de carbono. FdeN: fuente de nitrógeno.



**a.**



**b.**

**Figura II-6.** Producción de lacasa por *P. sanguineus* en cultivo sumergido. **a.** Efecto de la fuente de nitrógeno y de carbono. **b.** Efecto de inductores. Se representa la media de “actividad máxima” de los tratamientos para cada caso.

**Tabla II-9.** Comparación del efecto inductor de los compuestos estudiados.

|                                      | Actividad máxima |                |
|--------------------------------------|------------------|----------------|
|                                      | Media            | Error estándar |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O | 135.3 (a)        | 39.78          |
| Ácido gálico                         | 127.2 (a)        | 39.78          |
| Nudos <i>E. dunii</i>                | 212.7 (a)        | 28.13          |
| Control                              | 18.4 (b)         | 39.78          |

Notas: las medias que comparten la letra entre paréntesis son estadísticamente iguales.

### 3.3. Optimización de la producción de lacasa por fermentación en estado semi-sólido (FSS) por cepas de *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes villosa*

#### 3.3.1. *Pycnoporus sanguineus*

##### 3.3.1.1 Estudio exploratorio (Diseño factorial fraccionado 2<sup>8-4</sup>)

Debido a que no se detectó actividad lacasa en más del 50 % de las unidades experimentales (**ANEXO II – 2**), se utilizó un modelo logístico con respuesta binomial (0 = sin actividad lacasa; 1= con actividad) para analizar los resultados del experimento. Para identificar los factores estadísticamente significativos sobre la actividad lacasa se empleó un modelo de regresión estándar y se transformó la variable actividad con la función logarítmica.

El modelo logístico mostró que la variable urea tuvo un efecto negativo significativo en la producción de lacasa ( $\alpha = 0.05$ , **tabla II-10**). El Modelo de regresión obtenido fue  $\ln(p/(1-p))=1.37(0.623)-0.17(0.054)*Urea$ ; donde p representa el porcentaje de resultados con actividad lacasa.

Dado que no se detectó actividad para el nivel alto de urea (20.0 g/L) se estudiaron los efectos principales de las demás variables para el nivel menor de urea (5.0 g/L).

- Los efectos de extracto de levadura, glucosa, pH y tiempo de incubación fueron significativos. La actividad aumenta en el nivel alto de estas variables a excepción del pH donde la mayor actividad se observó para el pH más bajo, lo que se encuentra representado por un coeficiente de regresión estimado de signo negativo (**tabla II-11**).
- Para este diseño la actividad máxima alcanzada fue 1618 UE/L (**ANEXO II – 2**).

**Tabla II-10.** Coeficientes de regresión del modelo al incluir solo la variable urea

| Efecto       | Estimado | Error estándar | GL | Valor t | Pr >  t |
|--------------|----------|----------------|----|---------|---------|
| Intersección | 1.3661   | 0.6233         | 34 | 2.19    | 0.0354  |
| Urea         | - 0.1728 | 0.0539         | 34 | - 3.21  | 0.0029  |

Notas: Se realizó la transformación de actividad a logaritmo natural. Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . GL: grados de libertad.

**Tabla II-11.** Resultados del modelo para el nivel inferior de la variable urea

| Efecto            | Estimado | Error estándar | GL | Valor t | Pr >  t |
|-------------------|----------|----------------|----|---------|---------|
| Intersección      | 1.2164   | 1.0607         | 8  | 0.76    | 0.4708  |
| Ext. Levadura     | 0.1085   | 0.0315         | 8  | 3.44    | 0.0088  |
| Corteza           | 0.8203   | 0.4435         | 8  | 1.85    | 0.1016  |
| Tiempo incubación | 0.4050   | 0.0811         | 8  | 4.99    | 0.0011  |
| Peptona           | - 0.0456 | 0.0315         | 8  | - 1.45  | 0.1861  |
| Glicerol          | - 0.0358 | 0.0379         | 8  | - 0.95  | 0.3716  |
| Glucosa           | 0.1113   | 0.0379         | 8  | 2.94    | 0.0187  |
| pH                | - 1.1037 | 0.1892         | 8  | - 5.83  | 0.0004  |

Notas: Los valores estimados corresponden a los coeficientes de regresión del modelo. Se realizó la transformación de la actividad a logaritmo natural. Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  (valores de Pr > |t| menores a 0.05 indican un efecto significativo de la variable). GL: grados de libertad.

### 3.3.1.2 Experimento factorial completo 2<sup>4</sup>

La actividad lacasa fue modelada con el siguiente modelo estándar:

$$\ln(Act)_k = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_{1i} x_{ki} + \sum_{i < j} \beta_{2ij} x_{ki} x_{kj} + \beta_3 + \varepsilon_k$$

donde  $\ln(Act)_k$  es la respuesta predicha,  $\beta_0$  la intersección,  $\beta_{1i}$  y  $\beta_{2ij}$  son los coeficientes de regresión para el término lineal y el de interacción de dos factores, respectivamente.  $\beta_3$  es un contraste de curvatura de un grado de libertad entre el punto central y los puntos experimentales factoriales;  $x_{ki}$  y  $x_{kj}$  son las concentraciones de los distintos factores y  $\varepsilon_k$  es el error residual.

El error residual se descompuso en un término de error puro y en uno de falta de ajuste, el error puro se obtuvo de las repeticiones de los tratamientos. Se utilizó una transformación logarítmica debido a que la variable actividad mostró una distribución sesgada a la derecha. El análisis de los residuos mostró que se ajustan a una distribución normal sin ningún valor atípico. Un efecto fue considerado estadísticamente significativo si presentó un p-valor inferior a 0.05.

Se realizó un análisis canónico para obtener la composición de medio de cultivo que produce la mayor actividad lacasa.

En este modelo todas las variables analizadas (extracto de levadura, corteza, pH y glucosa) mostraron tener un efecto significativo en la actividad lacasa expresada. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) se pueden observar en la **tabla II-12**.

El test F de Fisher mostró una significancia elevada ( $p < 0.0001$ ) para el modelo con un coeficiente de determinación (R cuadrado) de 74.52, lo que indica un buen ajuste del mismo. Sin embargo, dado que la falta de ajuste fue estadísticamente significativa fue necesario agregar otros términos, por lo que se incluyeron las interacciones entre 3 factores, resultando el siguiente modelo ajustado:

$$\ln(Act)_k = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_{1i} x_{ki} + \sum_{i < j} \beta_{2ij} x_{ki} x_{kj} + \beta_3 + \sum_{m < i < j} \beta_{4mij} x_{km} x_{ki} x_{kj} + \varepsilon_k$$

donde los coeficientes de regresión  $\beta_{4mij}$  corresponden a los efectos de la interacción de tres factores y los demás términos tienen el mismo significado indicado antes. Se estimaron los valores predichos con este modelo (**ANEXO II – 3 B**).

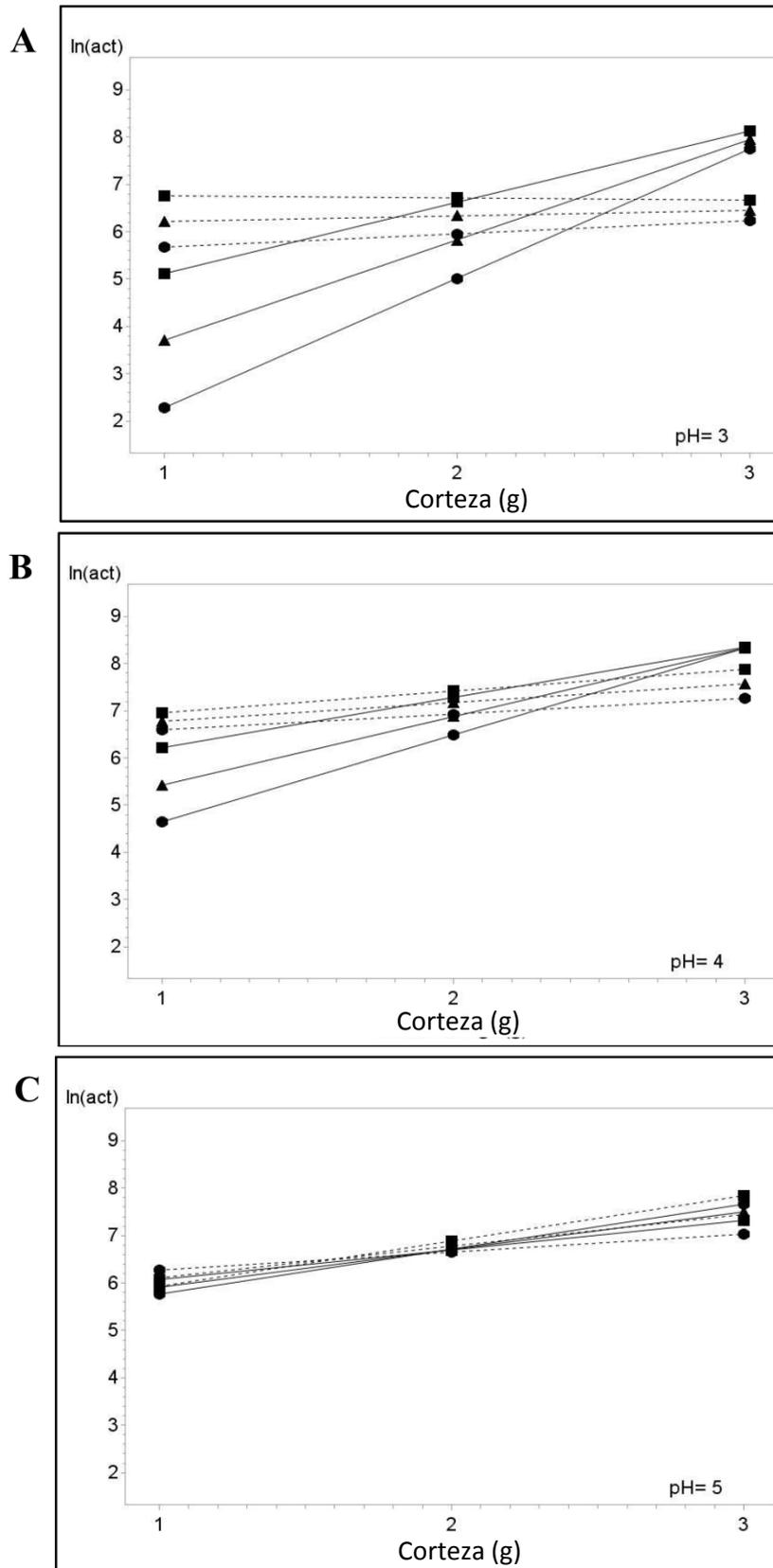
**Tabla II-12.** Resultados del ANOVA del modelo de regresión múltiple.

| Fuente de variabilidad | GL | Suma de cuadrados | Media cuadrática | Valor F | Pr > F | R-Cuadrado |
|------------------------|----|-------------------|------------------|---------|--------|------------|
| Lineal                 | 4  | 32.917            | 8.229            | 31.05   | 0.0000 | 50.32      |
| Cuadrático             | 1  | 1.359             | 1.359            | 5.13    | 0.0354 | 2.08       |
| Interacciones          | 6  | 14.466            | 2.411            | 9.10    | 0.0001 | 22.12      |
| Total del modelo       | 11 | 48.742            | 4.431            | 16.72   | 0.0000 | 74.52      |
| pH                     | 4  | 7.622             | 1.905            | 7.19    | 0.0011 |            |
| Corteza                | 4  | 37.229            | 9.307            | 35.12   | 0.0000 |            |
| Glucosa                | 4  | 6.401             | 1.600            | 6.04    | 0.0026 |            |
| Extracto levadura      | 4  | 10.597            | 2.649            | 10.00   | 0.0002 |            |
| Falta de ajuste        | 5  | 11.633            | 2.327            | 8.78    | 0.0002 |            |
| Error puro             | 19 | 5.036             | 0.265            |         |        |            |
| Error total            | 24 | 16.668            | 0.695            |         |        |            |
| Total corregido        | 35 | 65.411            |                  |         |        |            |

En cuanto a las interacciones, la única interacción triple no significativa fue pH\*ext.lev.\*glucosa (**tabla II-13**). Se debe recordar que cuando las interacciones triples son significativas el análisis de las interacciones dobles y el efecto principal del factor involucrado en la interacción pierde validez. El efecto de las interacciones triples se puede visualizar en la **figura II-7**.

**Tabla II-13.** Coeficientes de regresión y su significancia para el modelo ajustado.

| Parámetro                 | Estimado | Error estándar | Pr >  t |
|---------------------------|----------|----------------|---------|
| Intersección              | - 3.501  | 6.983          | 0.6216  |
| pH                        | 5.405    | 2.613          | 0.0518  |
| Extracto de levadura      | 0.438    | 0.315          | 0.1806  |
| pH*ext. lev.              | - 0.128  | 0.071          | 0.0875  |
| Glucosa                   | - 2.713  | 0.631          | 0.0003  |
| pH*glucosa                | 0.456    | 0.143          | 0.0045  |
| Ext. lev.*glucosa         | 0.086    | 0.035          | 0.0231  |
| pH*ext. lev.*glucosa      | - 0.011  | 0.008          | 0.1718  |
| Corteza                   | 3.702    | 1.915          | 0.0675  |
| pH*corteza                | - 0.925  | 0.415          | 0.0376  |
| Ext. lev.*corteza         | - 0.347  | 0.097          | 0.0019  |
| pH*ext. lev.*corteza      | 0.094    | 0.019          | <.0001  |
| Glucosa*corteza           | 0.699    | 0.194          | 0.0018  |
| pH*glucosa*corteza        | - 0.091  | 0.038          | 0.0264  |
| Ext. lev.*glucosa*corteza | - 0.018  | 0.008          | 0.0293  |
| pH*pH                     | - 0.618  | 0.286          | 0.0428  |



**Figura II-7.** Efecto sobre la producción de lacasa (ln(act)) de interacciones entre 3 factores: **glucosa**, 5.0 g/L (■), 7.5 g/L (▲) y 10.0 g/L (●); **extracto de levadura**, 10.0 g/L (—) y 20.0 g/L (- - -) y **contenido de cortezza** (eje x), a tres pH, 3.0 (A), 4.0 (B) y 5.0 (C).

### Observaciones

Al aumentar el pH el efecto de los otros factores es menor: a pH 3.0 el logaritmo de la actividad lacasa varía de 2.28 a 8.15, mientras que a pH 5.0 este rango va de 5.77 a 7.84. Por otro lado, a pH 3.0, con 10.0 g/L de extracto de levadura la actividad lacasa aumenta en respuesta al aumento del contenido de corteza (**fig. II-7 A**). Sin embargo, para 20.0 g/L de extracto de levadura prácticamente no hay respuesta a dicho aumento.

A pH 3.0 para cualquier combinación de corteza y extracto de levadura se observa una respuesta negativa al aumento de contenido de glucosa.

- En base a dichas observaciones y dado que no fue posible encontrar un punto óptimo para las distintas variables, se seleccionó el tratamiento con el que se obtuvo mayor actividad para continuar con los siguientes estudios:

Se eligió el menor valor de pH (3.0), la menor concentración de extracto de levadura (10.0 g/L) y de glucosa (5.0 g/L) y la mayor cantidad de corteza de *E. grandis* (3.0 g).

La actividad lacasa obtenida para esta combinación fue 2840 UE/L y la predicha por el modelo 3429 UE/L (**ANEXO 3 – B**).

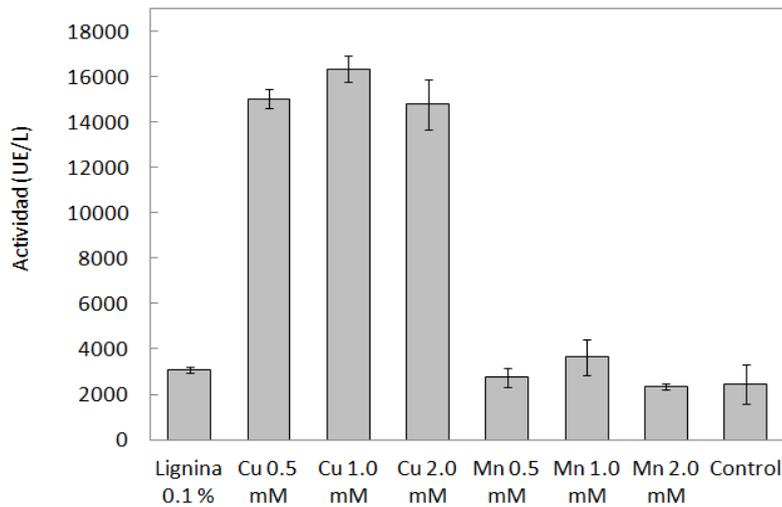
#### 3.3.1.3 Evaluación del efecto de inductores en la producción de lacasa

Los inductores no fueron incluidos en los diseños de optimización de la producción de lacasa por *P. sanguineus* en fase semi-sólida debido a que en este sistema el sustrato sólido constituye una fuente de compuestos fenólicos que podrían actuar como inductores sin necesidad de agregar otros compuestos al medio. Sin embargo el nivel de actividad alcanzado no fue suficiente y en este experimento se observó un mayor nivel de actividad lacasa en los cultivos suplementados con sulfato de cobre. Para este compuesto las tres concentraciones ensayadas fueron equivalentes, mientras que para lignina y sulfato de manganeso no se observó diferencias respecto al control (**fig. II-8**).

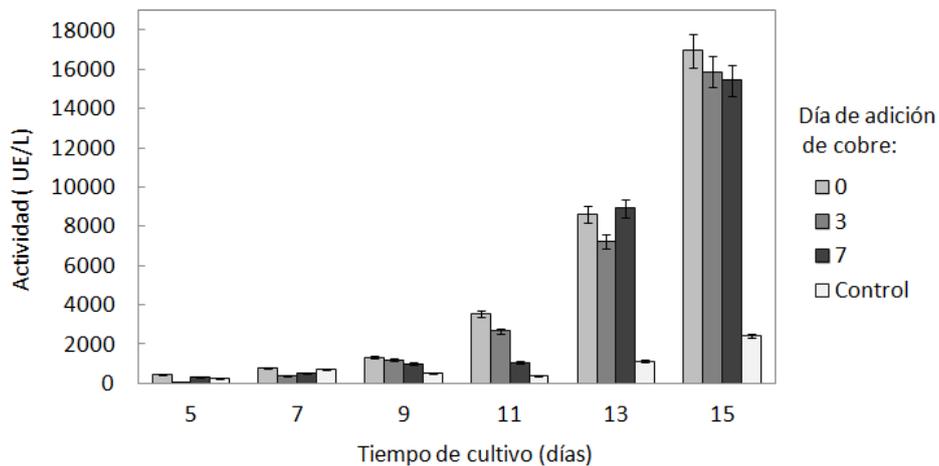
Por otro lado, el agregado de cobre en distintas etapas del cultivo no mostró un efecto en la producción de lacasa considerando el día de máxima detección de actividad (**fig. II-9**) como se había reportado para otras cepas, donde se obtuvo mayor actividad

por ejemplo agregando el inductor en tropofase [133,134]. Por practicidad y para evitar una posible contaminación del cultivo se prefiere el agregado del inductor al inicio, previo a la esterilización del medio.

- La actividad máxima obtenida con el medio optimizado y con sulfato de cobre como inductor fue 16000 UE/L.



**Figura II-8.** Efecto de inductores en la producción de lacasa por *P. sanguineus* en cultivo semisólido.



**Figura II-9.** Efecto del agregado de cobre (0.5 mM) en diferentes etapas del cultivo (días 0, 3 y 7). Las barras verticales corresponden al error estándar calculado.

#### 3.3.1.4 Producción de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa

LiP y MnP junto a la lacasa constituyen las principales enzimas del complejo extracelular ligninolítico de los basidiomicetes de la podredumbre blanca encontrándose habitualmente en el cultivo de la mayoría de estos hongos. Sin embargo, se han encontrado distintas cepas de *P. sanguineus* que no producen LiP y MnP [119–122], así como otras que sí lo hacen aunque en un número menor [135,136]. Se ha propuesto que una misma cepa puede variar la expresión de estas enzimas dependiendo de las condiciones de cultivo [137]. Por ejemplo, una cantidad elevada de nitrógeno en el medio suprime la expresión de ambas peroxidases [120]. Debido a esta variabilidad se consideró relevante estudiar la presencia de ambas peroxidases en el cultivo en estudio para la cepa 5050 de *P. sanguineus* pero no se detectó actividad de ninguna de las dos enzimas en las condiciones optimizadas para la producción de lacasa en el cultivo en fase semi-sólida.

### 3.3.2. *Trametes villosa*

#### 3.3.2.1 Diseño factorial exploratorio

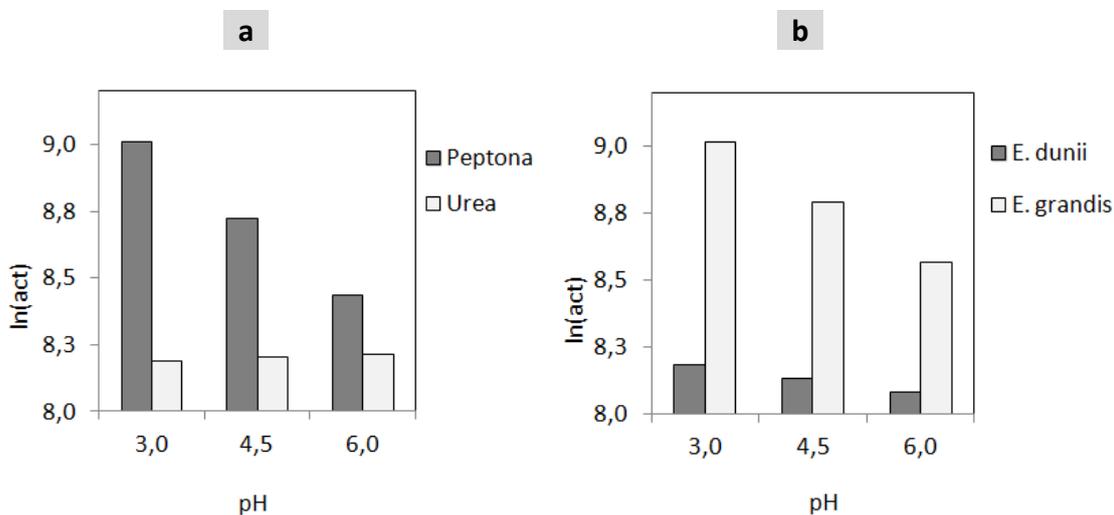
A través del análisis estadístico se concluyó que la variación observada en el volumen de sobrenadante final de cultivo no fue significativa como covariable, por lo que se utilizó la actividad expresada como concentración para estudiar la respuesta. El análisis ANOVA mostró interacciones dobles con efecto significativo: pH\*Sustrato; Sustrato\*Fuente de N; pH\*Fuente de N y Fuente de C\*Fuente de N (**tabla II-14**). El efecto principal del factor “inductor” no fue significativo, al igual que las interacciones de los otros factores con este. Si bien se observó el efecto inductor de ácido gálico en medio líquido previamente, es posible que en este caso el efecto de los compuestos fenólicos utilizados sea anulado por la presencia de cobre en el medio basal y por la liberación de este tipo de compuestos desde el material lignocelulósico utilizado como sustrato.

Dadas las interacciones observadas, se analizó el efecto de cada factor vinculado a la variación del otro con el cual interacciona (**fig. II-10, tabla II-15**).

**Tabla II-14.** ANOVA para el diseño factorial exploratorio (*T. villosa*).

| Efecto        | GL | SC     | CM     | F     | Pr>F   |
|---------------|----|--------|--------|-------|--------|
| Sus           | 1  | 0.8449 | 0.8449 | 35.16 | 0.0010 |
| pH            | 1  | 0.4472 | 0.4472 | 18.61 | 0.0050 |
| pH*Sus        | 1  | 0.1786 | 0.1786 | 7.43  | 0.0344 |
| FdeC          | 1  | 0.0561 | 0.0561 | 2.33  | 0.1776 |
| Sus*FdeC      | 1  | 0.0154 | 0.0154 | 0.64  | 0.4539 |
| pH*FdeC       | 1  | 0.0202 | 0.0202 | 0.84  | 0.3945 |
| FdeN          | 1  | 1.2791 | 1.2791 | 53.22 | 0.0003 |
| Sus*FdeN      | 1  | 0.1873 | 0.1873 | 7.79  | 0.0315 |
| pH*FdeN       | 1  | 0.5583 | 0.5583 | 23.23 | 0.0029 |
| FdeC*FdeN     | 1  | 0.3631 | 0.3631 | 15.11 | 0.0081 |
| Inductor      | 3  | 0.1510 | 0.0503 | 2.09  | 0.2024 |
| Sus*Inductor  | 3  | 0.0225 | 0.0075 | 0.31  | 0.8168 |
| pH*Inductor   | 3  | 0.1811 | 0.0604 | 2.51  | 0.1553 |
| FdeC*Inductor | 3  | 0.0854 | 0.0285 | 1.18  | 0.3917 |
| FdeN*Inductor | 3  | 0.0440 | 0.0147 | 0.61  | 0.6328 |

**Sus:** sustrato. **FdeC:** fuente de carbono. **FdeN:** fuente de nitrógeno. **GL:** grados de libertad. **SC:** Suma de cuadrados. **CM:** Cuadrado medios. **F:** estadístico del test. **Nivel de significancia:**  $\alpha = 0.05$ , Pr>F menor a 0.05 indica un efecto significativo.



**Figura II-10.** Efecto de los factores en las interacciones del experimento factorial exploratorio para *T. villosa*. **a.** Interacción “pH\*Fuente de N”, **b.** Interacción “pH\*sustrato”. Respuesta expresada como logaritmo natural de la actividad (UE/L).

**Tabla II-15.** Comparación de medias para los factores en las interacciones Sustrato\*Fuente de N (A) y Fuente de C\*Fuente de N (B)

| <b>A. Sustrato * Fuente de N</b>    |                 |                   |          |
|-------------------------------------|-----------------|-------------------|----------|
|                                     | <i>E. dunii</i> | <i>E. grandis</i> | p-valor  |
| Peptona                             | 8.32            | 9.13              | < 0.0001 |
| Urea                                | 7.95            | 8.45              | 0.0008   |
| p-valor                             | 0.0046          | 0.0001            |          |
| <b>B. Fuente de C * Fuente de N</b> |                 |                   |          |
|                                     | Glicerol        | Glucosa           | p-valor  |
| Peptona                             | 8.55            | 8.90              | 0.0045   |
| Urea                                | 8.25            | 8.16              | 0.2870   |
| p-valor                             | 0.0097          | <0.0001           |          |

Notas: Se muestran las medias de ln(Act) para cada combinación de factores de la interacción correspondiente. Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  (dos medias son estadísticamente diferentes si p-valor < 0.05).

*Observaciones:*

- La diferencia en las actividades obtenidas con los dos sustratos fue significativa, resultando mejor el de *E. grandis* para las dos fuentes de N (**tabla II-15**). Este resultado podría responder a la diferencia en la estructura química encontrada en el análisis realizado por el grupo de investigación del Lab. de Biocatálisis y Biotransformaciones: menor contenido de lignina y mayor de xilanos en la madera de *Eucalyptus dunii*.
- La diferencia en el efecto de las dos fuentes de nitrógeno también fue significativa, obteniéndose actividades más altas con peptona para ambos sustratos, las dos fuentes de C (**tabla II-15**) y los tres valores de pH (**fig. II- 10 a**).
- La diferencia entre las fuentes de carbono es significativa solo cuando se usa peptona como fuente de N, siendo mayor el efecto obtenido con glucosa (**tabla II-15**).
- El efecto del pH fue significativo en presencia de peptona (**fig. II- 10a**). La actividad lacasa producida fue mayor para el pH más bajo, 3.0. Con urea no se observó influencia del pH, y los valores de actividad observados fueron bajos.
- Se puede observar un aumento de actividad con la disminución del pH para el sustrato de *Eucalyptus dunii*. Sin embargo el efecto es mucho más notorio para

*Eucalyptus grandis*, donde además las actividades alcanzadas son más altas (fig. II- 10 b).

En este experimento entonces se puede concluir:

- La máxima actividad alcanzada fue 16800 UE/L (ANEXO II-4). La misma se obtuvo con peptona como fuente de N, pH ácido (3.0), madera de *E. grandis* como sustrato y glucosa como fuente de C cuando la de nitrógeno es peptona.

### 3.3.2.2 Primer diseño factorial de optimización

Se realizó el análisis de varianza del modelo (ASReml para varianzas heterogéneas) y dado que en el mismo se observó interacción de glucosa y peptona con el sustrato (tabla II-16), se analizó cada sustrato por separado (fig. II- 11 a 13).

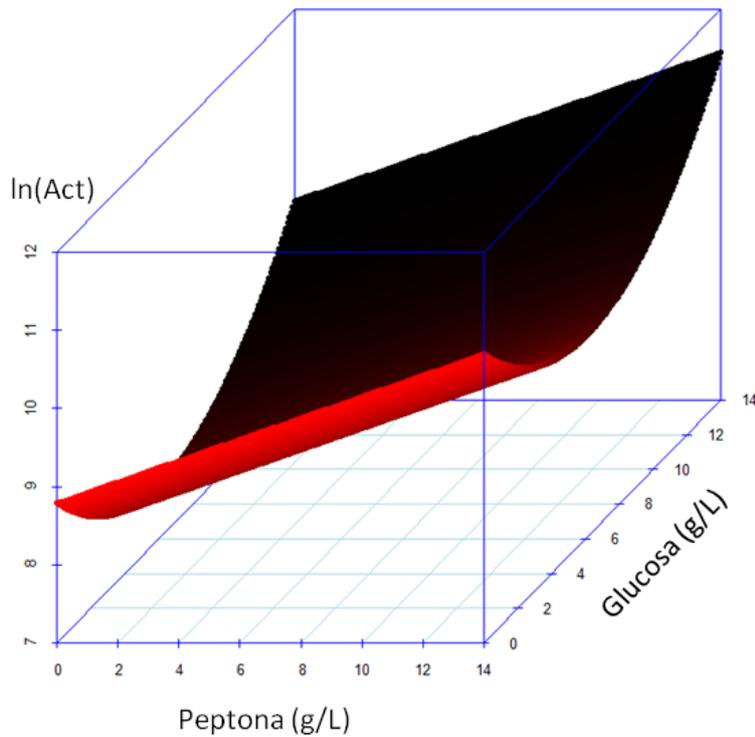
**Tabla II-16.** Análisis de varianza del modelo ASReml para el primer diseño factorial de optimización para *T. villosa* en FSS.

|              | GL | Suma de cuadrados | Estadístico de Wald | Pr( $\chi^2$ ) |
|--------------|----|-------------------|---------------------|----------------|
| Intersección | 1  | 40501.811         | 40501.811           | 0.00000        |
| Sustrato     | 2  | 8.822             | 8.822               | 0.01214        |
| Peptona      | 1  | 74.179            | 74.179              | 0.00000        |
| Glucosa      | 1  | 7.875             | 7.875               | 0.00501        |
| Sust*Pep     | 2  | 11.498            | 11.498              | 0.00319        |
| Sust*Glu     | 2  | 8.785             | 8.785               | 0.01237        |
| Pep*Glu      | 1  | 0.002             | 0.002               | 0.96794        |

GL: grados de libertad. Significancia  $\alpha = 0.05$ .

#### Observaciones:

- Para corteza de *E. grandis* molida se obtiene mayor actividad con los niveles más altos de peptona, mientras que para la glucosa se observa el mismo efecto a nivel alto o bajo y una menor actividad a nivel intermedio. Por otro lado, se observa que para niveles altos de glucosa la respuesta al aumento de peptona es mayor (fig. II-11).



**Figura II- 11.** Efecto de los factores glucosa y peptona para el sustrato **Corteza de *E. grandis* molida**.  $\ln(\text{Act})$ : logaritmo natural de la actividad (UE/L).

- Para corteza de *E. grandis* troceada sólo hay efecto de la concentración de peptona (**fig. II- 12**). Dicho efecto es cuadrático obteniéndose un máximo de actividad con la concentración 11.8 g/L de la fuente de nitrógeno.
- Para madera de *E. grandis* molida se observó un efecto lineal con peptona: dentro del rango utilizado se obtiene mayor actividad con la mayor concentración (12.7 g/L). Además, se observa el mismo comportamiento lineal para todo el rango de concentración de glucosa (**fig. II- 13**).
- El residual error estándar para corteza troceada fue mucho mayor (2.33) que para corteza molida (0.29) o madera molida (0.26). Esto sugiere que la molienda homogeniza el sustrato e influye en la variabilidad de la respuesta disminuyéndola.

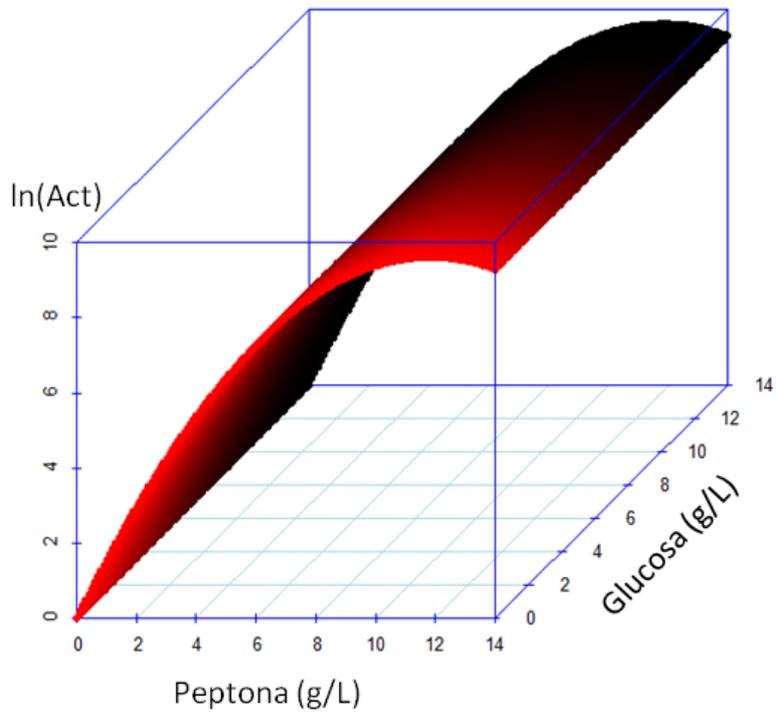


Figura II-12. Efecto de los factores glucosa y peptona para el sustrato **Corteza de *E. grandis* troceada**.  $\ln(\text{Act})$ : logaritmo natural de la actividad (UE/L).

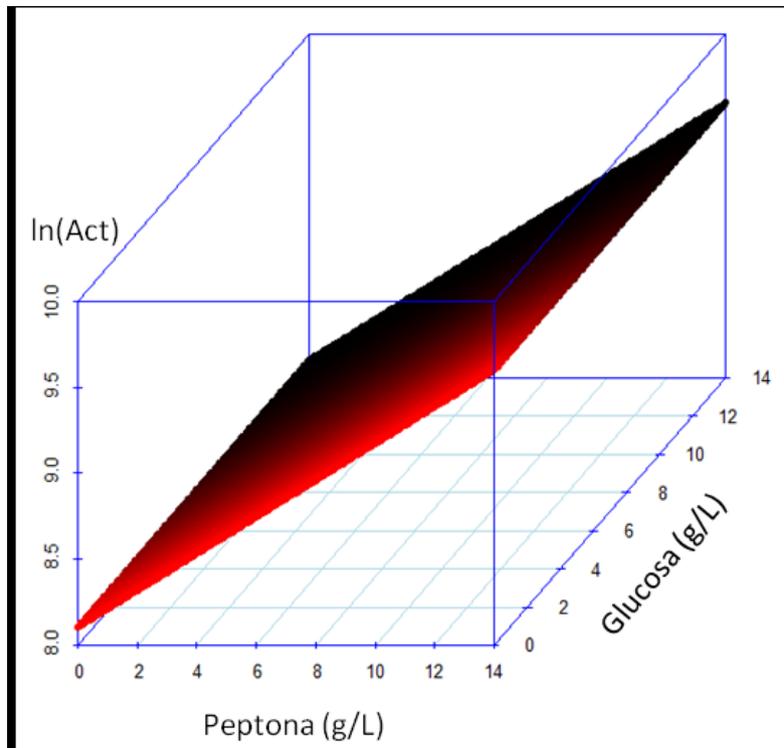


Figura II- 13. Efecto de los factores glucosa y peptona para el sustrato **Madera de *E. grandis* molida**.  $\ln(\text{Act})$ : logaritmo natural de la actividad (UE/L).

- Si bien se observaron efectos significativos para los factores analizados, no fue posible encontrar un modelo con un máximo de respuesta.
- Fue necesario plantear otro experimento para definir el efecto de la glucosa como fuente de carbono y de la peptona como fuente de nitrógeno para el sustrato corteza molida de *E. grandis*, con el que se obtuvo menor variabilidad y la mayor actividad registrada (34700 UE/L,  $\ln(\text{Act})=10.45$  **ANEXO II-5**).

### 3.3.2.3 Segundo diseño factorial de optimización

Se realizó un análisis de varianza global, en el cual se observó que la varianza residual difería entre los tratamientos sin peptona y los que contienen peptona, lo que corresponde a un modelo lineal mixto con varianzas heterogéneas. La varianza con peptona cero es 1.807 y para los tratamientos con peptona es 0.061. Por este motivo, se realizó posteriormente un ANOVA para los tratamientos con peptona, y se estimó los coeficientes de regresión del modelo para obtener los valores de concentración de glucosa y peptona correspondientes al máximo de actividad lacasa alcanzable para este sistema de cultivo.

Según el análisis ANOVA el efecto de la interacción de glucosa con peptona fue significativo, con un efecto de la glucosa para los niveles intermedios de peptona y un efecto de la peptona para todos los niveles de glucosa (**tabla II-17**).

**Tabla II-17.** Pruebas para cada nivel de ambos factores en la interacción GLU\*PEP

| Efecto  | GLU | PEP  | GL num | GL den | Valor F | Pr > F |
|---------|-----|------|--------|--------|---------|--------|
| GLU*PEP | -   | 0    | 2      | 24     | 0.05    | 0.9500 |
| GLU*PEP | -   | 7.5  | 2      | 24     | 24.21   | <.0001 |
| GLU*PEP | -   | 15   | 2      | 24     | 18.14   | <.0001 |
| GLU*PEP | -   | 22.5 | 2      | 24     | 0.81    | 0.4585 |
| GLU*PEP | 0   | -    | 3      | 24     | 27.19   | <.0001 |
| GLU*PEP | 7.5 | -    | 3      | 24     | 45.70   | <.0001 |
| GLU*PEP | 15  | -    | 3      | 24     | 38.10   | <.0001 |

GL num: grados de libertad del numerador. GL den: grados de libertad del denominador. Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

En el análisis de varianza realizado para los tratamientos con peptona, se observó efecto significativo de glucosa, de peptona y de la interacción entre ambos. Además se observaron efectos lineales, cuadráticos, e interacciones con efecto significativo (**tabla II-18**).

**Tabla II-18.** ANOVA para niveles de peptona mayores a cero.

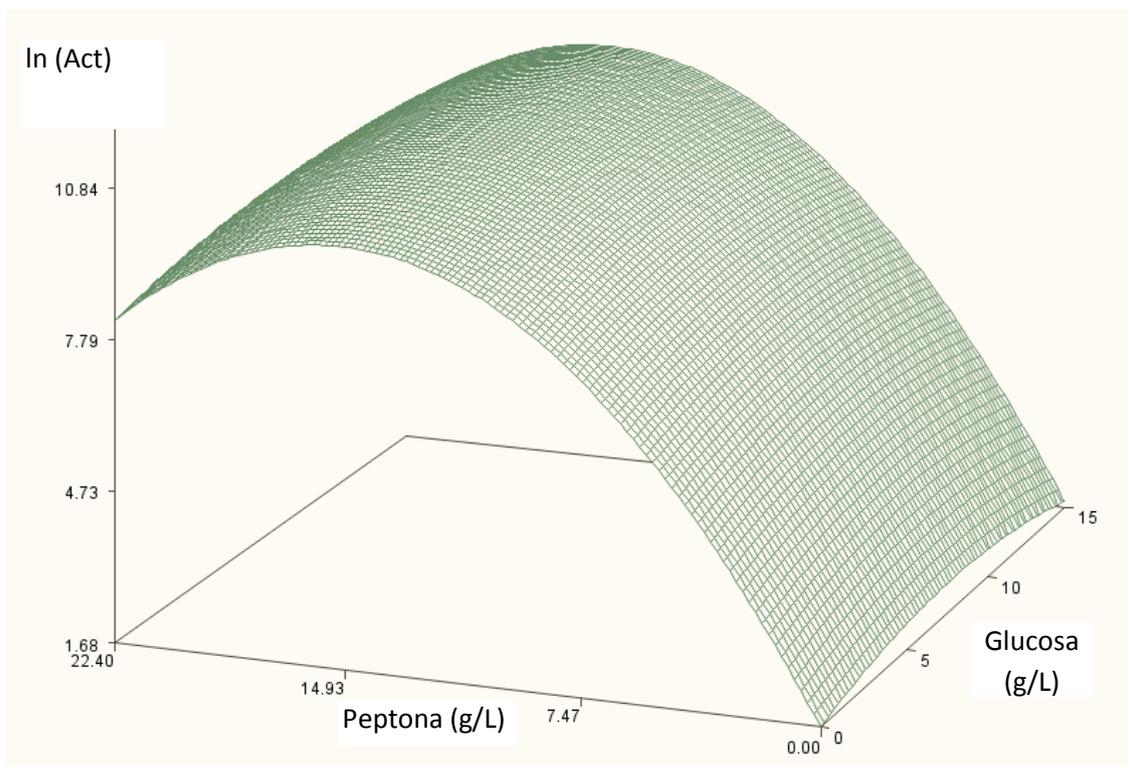
| Parámetros de covarianza |          |                |         |        |
|--------------------------|----------|----------------|---------|--------|
| Parámetro                | Estimado | Error estándar | Valor Z | Pr > Z |
| Residual                 | 0.06085  | 0.02028        | 3       | 0.0013 |
| Prueba de efectos fijos  |          |                |         |        |
| Efecto                   | GL num   | GL den         | Valor F | Pr > F |
| PEP                      | 2        | 18             | 9.62    | 0.0014 |
| GLU                      | 2        | 18             | 32.98   | <.0001 |
| GLU*PEP                  | 4        | 18             | 5.09    | 0.0064 |
| Contrastes de regresión  |          |                |         |        |
|                          | GL num   | GL den         | Valor F | Pr > F |
| LinGLU                   | 1        | 18             | 29.46   | <.0001 |
| CuaGLU                   | 1        | 18             | 36.49   | <.0001 |
| LinPEP                   | 1        | 18             | 14.19   | 0.0014 |
| CuaPEP                   | 1        | 18             | 5.05    | 0.0375 |
| LinGLU*LinPEP            | 1        | 18             | 3.64    | 0.0724 |
| LinGLU*CuaPEP            | 1        | 18             | 2.81    | 0.1110 |
| CuaGLU*LinPEP            | 1        | 18             | 13.5    | 0.0017 |
| CuaPEP*CuaPEP            | 1        | 18             | 0.39    | 0.5383 |

GL num: grados de libertad del numerador. GL den: grados de libertad del denominador. Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

- Se obtuvieron los coeficientes para el modelo de regresión y a partir del mismo el punto de máxima respuesta (**tabla II-19, fig. II-14**).

**Tabla II-19.** Coeficientes estimados para el modelo de regresión

| Parámetro | Intersección | PEP   | GLU   | GLU*GLU | PEP*PEP | PEP*GLU*GLU |
|-----------|--------------|-------|-------|---------|---------|-------------|
| Estimado  | 1.678        | 1.116 | 0.151 | - 0.009 | - 0.037 | 0.0001      |



**Figura II-14.** Superficie de respuesta para el modelo del diseño factorial completo, con variación de concentración de glucosa y peptona para *T. villosa* por FSS.

- El máximo de actividad predicho obtenido fue 51174 UE/L ( $\ln(\text{Act}) = 10.84$ ), para los niveles 9.5 g/L de glucosa y 15.3 g/L de peptona.

### 3.4 Discusión

Con los experimentos realizados se buscó encontrar una metodología para producir lacasa con cepas nativas de basidiomicetes aislados en nuestro país, de forma de obtener un nivel de actividad adecuado para trabajar en etapas posteriores en su caracterización, inmovilización y aplicación en la degradación de colorantes sintéticos.

Las basidiomicetes de la podredumbre blanca producen lacasas en un bajo nivel de forma constitutiva [138] lo que fue comprobado en este trabajo en los experimentos realizados en medio líquido sin inductor. La producción de lacasa por los basidiomicetes está sujeta a una regulación compleja por las condiciones del cultivo y se podrá comprobar que las condiciones óptimas para su expresión no coinciden necesariamente con las más favorables para la producción de biomasa [73].

Entre los factores estudiados más habitualmente para potenciar la producción de lacasa por basidiomicetes se encuentran factores fisicoquímicos relacionados al cultivo como temperatura, pH, aireación y agitación; contenido de nutrientes como fuente de nitrógeno y de carbono, así como el efecto inductor de compuestos fenólicos y de metales, especialmente el cobre. Se ha descrito que la regulación de la expresión por estos compuestos inductores ocurre a nivel transcripcional [73,139–142].

Asimismo, el nivel de expresión es especie y cepa dependiente, por lo cual la selección de la cepa con la cual trabajar fue el primer aspecto considerado en la estrategia empleada en este trabajo [74,138].

Las dos cepas que fueron seleccionadas corresponden a especies reportadas productoras de lacasa: *Trametes villosa* (la cual se puede encontrar en algunas publicaciones como *Polyporus pinsitus*) y *Pycnoporus sanguineus* (también llamado *Trametes sanguinea*). En el caso de *Pycnoporus sanguineus* es posible encontrar numerosos trabajos publicados que estudian la producción de la enzima, así como de diversas aplicaciones de la misma. Los trabajos en los que se emplea la lacasa de *Trametes villosa* sin embargo, se enfocan mayoritariamente en aplicaciones de la enzima, por lo general de origen comercial, siendo considerablemente menor el número de estudios relacionados a la producción de la misma a partir de cepas nativas [130,131,143,144]. Podría ser significativo para explicar este hecho que la producción heteróloga de lacasa de *Trametes villosa* en *Aspergillus* fue patentada en el año 1995 por Yaver *et al.* [145] y fue comercializada por Novozymes aunque actualmente se encuentra discontinuada.

Inicialmente se utilizó el cultivo sumergido con agitación, sin embargo pese a la mayor facilidad que este ofrece para el control de los parámetros del medio líquido, al emplear el cultivo en estado semisólido se pudo comprobar algunas ventajas del mismo. En primer lugar permitió obtener mayor actividad en un menor volumen de

medio líquido facilitando la etapa de recuperación de la enzima producida. Por otro lado, hizo posible prescindir del uso de equipos para agitación, permitiendo diseñar ensayos con mayor número de unidades experimentales y una mayor fiabilidad de los resultados, además de reducir costos por consumo de energía. Por otra parte, la posibilidad de utilizar material lignocelulósico y en particular corteza de *Eucalyptus* como soporte-sustrato del cultivo contribuye a la valorización de un subproducto de la industria forestal de gran importancia actualmente en nuestro país y evita el uso de costosos soportes inertes. Dicho material actúa como soporte para el crecimiento del hongo y además aporta nutrientes e inductores al medio, siendo ideal para el crecimiento de los basidiomicetes de la podredumbre blanca de la madera. La fermentación en fase semisólida entonces fue el sistema de cultivo seleccionado para estudiar otras variables en los diseños experimentales realizados para ambos basidiomicetes.

Para la secuencia de experimentos se aplicó la estrategia usual en la cual primero se realizan estudios preliminares para seleccionar variables con efecto significativo, para luego mediante diseños de optimización encontrar las concentraciones o niveles de estas variables que permitan obtener la máxima repuesta.

Los experimentos exploratorios se efectúan generalmente con diseños estadísticos como el Plackett Burman o como en este caso, un diseño factorial fraccionado. Los mismos permiten abarcar numerosas variables con una cantidad de unidades experimentales menor que la requerida por diseños del tipo factorial completo o central compuesto, utilizados en la optimización posterior.

El nivel de actividad lacasa (medido con ABTS como sustrato) alcanzado con la cepa de *P. sanguineus* en cultivo semisólido en la optimización previa al agregado de cobre se encontró en el orden de los valores obtenidos con otras cepas en cultivo líquido con medios de distintas composiciones [119,121,146–150]. La actividad obtenida con el agregado de cobre fue superior a dichos valores (16000 UE/L) aunque fue inferior a los resultados reportados para cepas como la aislada en México (CS43) cultivada en un medio con jugo de tomate, sulfato de cobre y aceite de soja [151]; la cepa china BRFM6 utilizando etanol como inductor [152] o la cepa G05.10 en un medio con 2,5-xilidina, Tween 80 y salvado de maíz [122]. Por otro lado, se reportó la producción de lacasa de *P. sanguineus* en fase sólida para otra cepa (RP15) con buenos rendimientos,

utilizando salvado de trigo como sustrato del medio y suplementado con mazorca de maíz molida como fuente de carbono [153].

En este trabajo se encontró un medio de cultivo adecuado para la producción de lacasas con las cepas de los dos basidiomicetes empleados, permitiendo el uso de un subproducto de una de las principales industrias de nuestro país. El resultado obtenido es de particular importancia en el caso de *Trametes villosa*, ya que en los estudios publicados encontrados se utiliza únicamente el sistema de cultivo líquido.



## CAPÍTULO III

Purificación y caracterización  
de lacasas producidas por  
*Trametes villosa* y *Pycnoporus*  
*sanguineus*



## 1. OBJETIVOS

- Purificación de lacasas producidas por cepas nativas de *Trametes villosa* y *Pycnoporus sanguineus*.
- Caracterización bioquímica de las enzimas aisladas.

## 2. METODOLOGÍA

Se desarrollaron protocolos para la purificación de las lacasas producidas por *Trametes villosa* y *Pycnoporus sanguineus* para luego llevar a cabo la caracterización de las enzimas purificadas.

El grado de pureza alcanzado se evaluó mediante la determinación de actividad específica y por electroforesis desnaturizante de las fracciones aisladas en cada etapa del proceso.

### 2.1 Control electroforético

Se realizaron electroforesis desnaturizantes en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS) con el sistema automatizado PhastSystem (GE Healthcare Bio-sciences). Debido a la baja concentración proteica de las muestras, se debieron concentrar mediante centrifugación en concentradores de corte 3000 Da (Centricon®).

Se utilizaron geles con gradiente 8 - 25 (PhastGel Gradient) y el revelado fue realizado por el método de tinción con nitrato de plata. Para la estimación del peso molecular se utilizó un marcador de Amersham-Pharmacia Biotech con las proteínas: alfa-lactoalbúmina, 14.4 kDa; inhibidor de tripsina, 20.1 kDa; anhidrasa carbónica, 30 kDa; ovoalbúmina, 43 kDa; albúmina, 67 kDa y fosforilasa b, 94 kDa. Se realizó una curva de calibración con los Rf obtenidos para dichas proteínas.

### 2.2 Purificación de lacasa de *Trametes villosa*

Se utilizó como muestra de partida el sobrenadante del cultivo sumergido (Cap.II–2.3.1) el cual contiene carbohidratos, sales y residuos lignocelulósicos además de los compuestos producidos por el hongo en el medio.

Se ensayaron diferentes protocolos de purificación combinando las técnicas de precipitación salina con sulfato de amonio; diálisis; cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) en Phenyl Sepharose® y cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex®. Para el monitoreo de las cromatografías se estimó la concentración de proteínas por absorbancia a 280 nm. Para el cálculo de actividad específica se

determinó la actividad lacasa con el sustrato ABTS como se describió en Capítulo II-2.1 y la concentración proteica mediante el método del ácido bicinconínico (BCA).

### 2.2.1. Protocolo de purificación I: a- Precipitación salina, b- Cromatografía de interacción hidrofóbica

*a - Precipitación salina (salting out)* - Se realizó la precipitación cuantitativa de las proteínas del sobrenadante con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 80 % para su concentración, permitiendo su almacenamiento en un volumen reducido y preservando la actividad catalítica hasta su uso en la siguiente etapa del proceso. Previamente se centrifugó el sobrenadante para eliminar partículas en suspensión procedentes del medio de cultivo.

La elevada fuerza iónica de la solución que resulta al disolver el precipitado favorece la interacción hidrofóbica en la siguiente etapa del protocolo.

*b - Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)* - El precipitado obtenido fue disuelto en fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0.

La adsorción hidrofóbica se realizó en *batch* empleando como adsorbente Phenyl Sepharose<sup>®</sup> bajo agitación suave en rototorque durante 16 h. Se estudió la influencia de la fuerza iónica y la temperatura en este proceso realizándose tres protocolos (HIC A, HIC B, HIC C). La HIC C se realizó sin suplementar con sulfato de amonio considerando que la cantidad remanente de la precipitación podría ser suficiente para la adsorción. La elución fue realizada en columna (**tabla III – 1**).

**Tabla III-1.** Condiciones ensayadas en la cromatografía de interacción hidrofóbica (purificación de lacasa de *T. villosa*)

|              | Condiciones de adsorción |   | Condiciones de elución <sup>a</sup>                      |
|--------------|--------------------------|---|--|
|              | Temperatura              | Solución tampón   |  |
| <b>HIC A</b> | 4 °C                     | Fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0 suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 M | Isocrática (fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0)               |
| <b>HIC B</b> | 22 °C                    | Fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0 suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 M | Gradiente (1.0 a 0.0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) |
| <b>HIC C</b> | 4 °C                     | Fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0   | ----- <sup>b</sup>                                       |

**a.** Elución realizada a 22 °C. **b.** En HIC C no se produjo adsorción (ver resultados). Para la elución por gradiente en HIC B el tampón utilizado en HIC A se suplementó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### 2.2.2. Protocolo de purificación II: a- Precipitación salina, b- Intercambio Iónico

*a* - La precipitación salina con sulfato de amonio se realizó según lo indicado en el Protocolo I.

*b* - *Cromatografía de Intercambio Iónico* - El precipitado disuelto en fosfato de sodio 0.01 M pH 6.0 y dializado en el mismo tampón (membranas Spectrum™ Spectra/Por™ 4 RC, PM de corte 12-14 kDa) fue aplicado al intercambiador aniónico DEAE-Sephadex®.

El intercambio iónico se realizó en *batch* a temperatura ambiente (22 °C) durante 1 h con agitación en rotatorque. La elución se hizo en columna por aumento de fuerza iónica con el siguiente gradiente:

1. fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0
2. fosfato de sodio 0.2 M pH 6.0
3. fosfato de sodio 0.05 M pH 6.0 + NaCl 0.5 M
4. fosfato de sodio 0.02 M pH 6.0 + NaCl 1.0 M

Se monitoreó la elución con electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE y con electroforesis nativa. Esta última se realizó en gel de poliacrilamida 12.5 % (PhastGel, GE Healthcare) con revelado específico con ABTS. La aparición del color verde azulado correspondiente al radical del ABTS oxidado permitió identificar la banda correspondiente a la enzima en la corrida electroforética.

### 2.2.3. Protocolo de purificación III: a- Precipitación salina, b- Cromatografía de interacción hidrofóbica, c- Cromatografía de intercambio iónico

*a y b* - La precipitación salina con sulfato de amonio así como la cromatografía de interacción hidrofóbica se realizaron como se describió en 2.2.1, utilizándose para la cromatografía las condiciones de HIC A.

*c* - *Cromatografía de intercambio iónico* - El pico de máxima actividad obtenido en la HIC, previamente gel-filtrado para disminuir la fuerza iónica, fue aplicado al intercambiador aniónico DEAE-Sephadex®. La gel-filtración se realizó en la columna pre-empaquetada PD-10 con Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences) empleando como fase móvil fosfato de sodio 0.01 M pH 6.0.

El intercambio se realizó en batch durante 1 h con agitación en rotatorque, a 22 °C. La elución se llevó a cabo en columna por aumento de fuerza iónica:

1. fosfato de sodio 0.1M pH 6.0
2. fosfato de sodio 0.2 M pH 6.0
3. fosfato de sodio 0.05 M pH 6.0 + NaCl 0.5 M

### **2.3 Caracterización de lacasa de *Trametes villosa***

Se utilizó la lacasa purificada según el Protocolo III, se realizaron estudios para la determinación de su punto isoeléctrico, rango de pH óptimo, efecto de la temperatura y del pH en la estabilidad enzimática y de parámetros cinéticos.

- El punto isoeléctrico se estimó mediante isoelectroenfoque (IEF) utilizando un gel con gradiente de pH 3 – 9 (PhastGel, GE healthcare) y una mezcla de proteínas de puntos isoeléctricos conocidos [Broad pI kit, GE Health Care, Biosciences: amilogucosidasa (pI 3.50); inhibidor de tripsina (pI 4.55);  $\beta$ -lactoglobulina A (pI 5.20); anhidrasa carbónica B bovina (pI 5.85); anhidrasa carbónica B humana (pI 6.55); mioglobina, banda ácida (pI 6.85); mioglobina, banda básica (pI 7.35); lentil lectina, ácida (pI 8.15); lentil lectina, media (pI 8.45); lentil lectina, básica (pI 8.65) y tripsinógeno (pI 9.30)].

El IEF se llevó a cabo por duplicado: un gel fue revelado por tinción con plata y con el otro se realizó revelado específico sumergiéndolo en una solución del sustrato ABTS.

- Para determinar el rango de pH óptimo se realizó el ensayo de actividad (según Cap.II-2.1) con soluciones del sustrato ABTS (5 mM) en tampones de distinto pH: acetato de sodio 0.1 M pH 3.0, 3.3, 4.0, 4.5, 4.8, 5.0, 5.5 y fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0.

- Para el estudio del efecto del pH en la estabilidad de la enzima se incubó una alícuota de la misma a cada pH en el rango de 3.3 a 8.0 (acetato de sodio pH 3.3, 4.0 y 4.8, fosfato de sodio pH 6.0, 6.9 y 8.0) durante 24 h a 4 °C, midiéndose la actividad remanente a pH 4.8 (ver Capítulo II-2.1).

- Para el estudio de estabilidad térmica se incubó una alícuota de la enzima durante 1 h (a pH 6.0) a las temperaturas 4, 21, 37, 50, 60 y 70 °C. La actividad remanente fue

cuantificada luego de termostatar las muestras a la temperatura de referencia (22 °C).

- Para la determinación de parámetros cinéticos se realizó el ensayo de actividad con concentraciones finales de ABTS en la mezcla reactiva comprendidas entre 0.2 y 7.0 mM (0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 y 7.0 mM) en acetato de sodio 0.1 M pH 4.8. Para calcular los parámetros velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) y constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) a partir de los datos de velocidad de reacción obtenidos se utilizó el método de linealización de Lineweaver-Burk [154] y el método gráfico directo de Eisenthal y Cornish-Bowden [155].

#### **2.4 Purificación de lacasa de *Pycnoporus sanguineus***

Se utilizó como muestra de partida el sobrenadante del cultivo en fase semisólida (Cap. II-2.4.1). El mismo contiene carbohidratos, sales y residuos lignocelulósicos además de los compuestos producidos por el hongo en el medio.

El procedimiento realizado consistió en dos etapas: a- Precipitación salina y b- Intercambio iónico.

*a - Precipitación salina (salting out)* - Se realizó la precipitación cuantitativa de las proteínas del sobrenadante del cultivo como se describió en 2.2.1.a.

*b - Cromatografía de Intercambio Iónico* - El precipitado obtenido fue disuelto en fosfato de sodio 0.02 M pH 6.0 y dializado contra el mismo tampón 24 h a 4 °C para remover el sulfato de amonio de la solución.

La solución resultante fue aplicada al intercambiador aniónico DEAE-sepharose®. El intercambio se realizó en batch a 22 °C con agitación en rototorque durante 90 minutos. La elución se llevó a cabo en columna por aumento de fuerza iónica utilizando primero fosfato de sodio 0.2 M pH 6.0 y luego fosfato de sodio 0.02 M pH 6.0 + NaCl 0.5 M.

## 2.5 Caracterización de lacasa de *Pycnoporus sanguineus*

Se utilizó la lacasa purificada para realizar los estudios de punto isoeléctrico, pH óptimo, efecto del pH y la temperatura en la estabilidad enzimática así como la determinación de parámetros cinéticos.

- Se realizó un isoelectroenfoque (IEF) como se describió en 2.3, llevando a cabo el revelado específico con el sustrato ABTS.

- Para determinar el rango de pH óptimo de catálisis se realizó el ensayo de actividad con soluciones del sustrato ABTS (5 mM) en tampones de distinto pH: citrato-fosfato pH 1.0, 1.5, 2.2 y 3.0; acetato de sodio pH 4.0 y 4.8 y fosfato de sodio pH 6.0.

- Para el estudio de estabilidad de la enzima con el pH, se realizó la incubación a cada pH en el rango de 1.0 a 10.0 (citrato-fosfato pH 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 4.8, fosfato de sodio pH 6.0, 7.0 y 8.0 y carbonato-bicarbonato pH 10.0) durante 24 h a 4 °C y se midió su actividad remanente con el ensayo de referencia (ver Cap.II-2.1).

El mismo estudio de estabilidad fue realizado con otras soluciones tampón (acetato de sodio pH 4.0 y 4.8 y glicina-HCl pH 2.0) para estudiar el efecto de los iones presentes en las soluciones.

- Para el estudio de estabilidad térmica las temperaturas ensayadas fueron 4, 24, 37, 50, 55, 60, 70 y 80 °C. La actividad remanente fue medida al finalizar la incubación de una hora (a pH 6.0), termostatazando previamente las muestras a 22° C.

- Para la determinación de parámetros cinéticos se realizó el ensayo de actividad con concentraciones finales de ABTS en la mezcla reactiva comprendidas entre 0.2 y 7.0 mM (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 y 7.0 mM) en acetato de sodio 0.1 M pH 4.8. Para calcular los parámetros velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) y constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) a partir de los datos de velocidad de reacción obtenidos se utilizó el método de linealización de Lineweaver-Burk [154] y el método gráfico directo de Eisenthal y Cornish-Bowden [155].

## 3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 3.1. Purificación y caracterización de lacasa de *Trametes villosa*

#### 3.1.1. Protocolo I de purificación de lacasa de *T. villosa* (Precipitación salina – Cromatografía de interacción hidrofóbica)

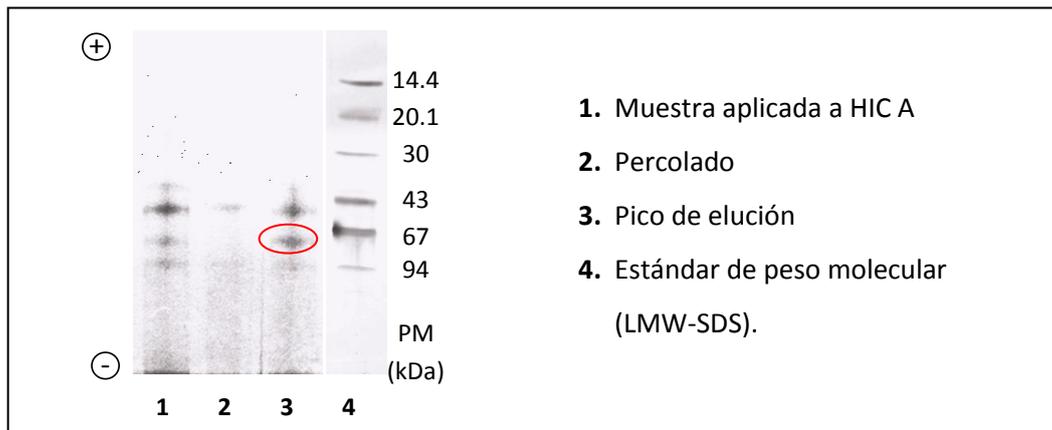
Para la HIC resultó evidente la necesidad de suplementar la muestra con sulfato de amonio ya que en HIC C se recuperó el 100 % de la actividad aplicada en el percolado y lavados. En el caso de HIC A y HIC B la actividad recuperada fue menor al 5 % en percolado y lavados, por lo que el proceso de adsorción fue independiente de la temperatura utilizada. La actividad retenida en la columna fue recuperada posteriormente en la elución por disminución de la fuerza iónica. En HIC A la recuperación de actividad en fracciones eluidas fue mayor que en HIC B y próxima al 100 % de la actividad aplicada. La menor actividad recuperada en HIC B podría deberse a la inactivación de la enzima durante el proceso de adsorción con agitación durante 16 h a temperatura ambiente. Además, es importante destacar que la energía de las uniones hidrofóbicas aumenta con el aumento de temperatura lo que podría justificar la menor recuperación de proteínas observada en HIC B. La elución en HIC A se hizo en forma isocrática lográndose un factor de purificación muy bajo (1.4), por ello en la HIC B se realizó una elución por saltos de fuerza iónica (**tabla III -2**).

**Tabla III -2.** Comparación cromatografías de interacción hidrofóbica (HIC) del Protocolo I para la purificación de lacasa de *T. villosa*

| Muestra                     | Actividad total |     | Proteínas |     | AE<br>(UE/mg) |
|-----------------------------|-----------------|-----|-----------|-----|---------------|
|                             | (UE)            | %   | (mg)      | %   |               |
| Aplicado a HIC              | 2.67            | 100 | 0.90      | 100 | 3.0           |
| <b>HIC A</b>                |                 |     |           |     |               |
| Pico de elución             | 0.80            | 30  | 0.19      | 21  | 4.3           |
| Total recuperado en elución | 2.47            | 92  | 0.86      | 96  | –             |
| <b>HIC B</b>                |                 |     |           |     |               |
| Pico de elución             | 0.47            | 17  | –         | –   | –             |
| Total recuperado en elución | 1.99            | 75  | 0.31      | 34  | –             |

Nota: Para HIC B no se pudo determinar concentración de proteínas por el método BCA en el pico de máxima actividad. AE: actividad específica.

En la electroforesis SDS-PAGE se observa en el pico de elución de HIC A una banda que no aparece en el percolado y puede corresponder a la lacasa o a un monómero de ésta, con un peso molecular estimado de 77 kDa (**fig. III -1**). Se puede observar para dicho pico otras bandas intensas lo cual concuerda con el pequeño aumento de la actividad específica (**tabla III -2**) e indica que no se alcanza un alto grado de pureza con este protocolo.



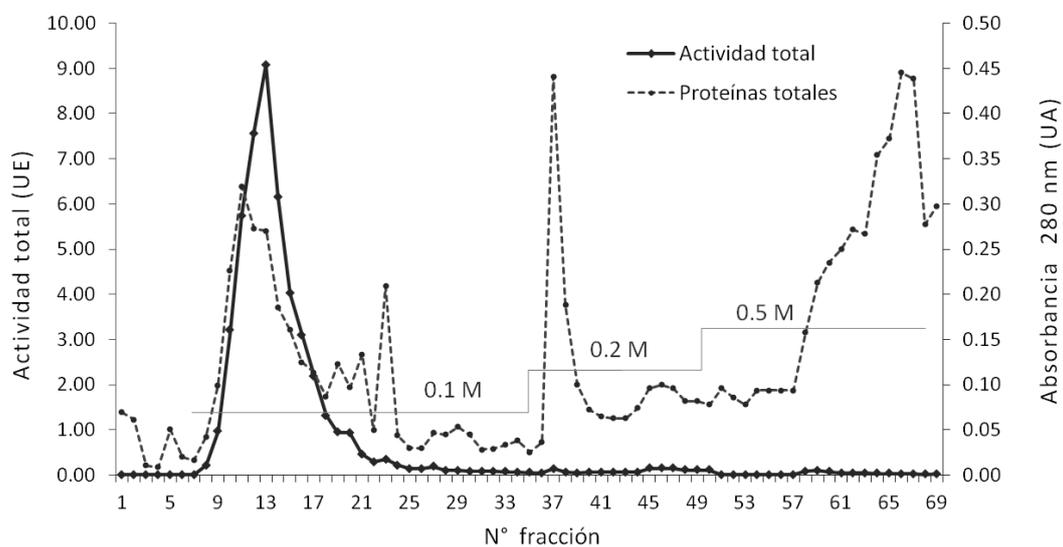
**Figura III -1.** Electroforesis SDS-PAGE: evaluación del Protocolo I – HIC A para la purificación de lacasa de *T. villosa*. Se indica la banda que podría corresponder a la enzima o un monómero de PM 77 kDa.

### 3.1.2. Protocolo II de purificación de lacasa de *T. villosa* (Precipitación salina – Intercambio iónico)

En este procedimiento se aplicó directamente el precipitado disuelto y dializado al intercambiador iónico DEAE-Sephadex®. En el percolado no se detectó actividad lacasa. La mayor parte de la enzima eluyó con fuerza iónica 0.1 M (35 % de la actividad aplicada). De forma similar a lo observado para la HIC, en este caso, la actividad específica aumentó sólo 1.4 veces respecto a la muestra aplicada. Por lo tanto se desarrolló un protocolo de purificación con más etapas, el cual se describe a continuación.

### 3.1.3. Protocolo III de purificación de lacasa de *T. villosa* (Precipitación salina – Cromatografía de interacción hidrofóbica – Intercambio iónico)

En este protocolo se combinaron ambas cromatografías. En la HIC se recuperó el 100 % de la actividad aplicada a Phenyl Sepharose® igual que en HIC A del protocolo I. En el intercambio iónico al igual que en el protocolo II la lacasa eluyó a fuerza iónica 0.1 M, logrando la separación de otras proteínas que eluyeron a fuerzas iónicas mayores (**fig. III-2**). Se eluyó el 70 % de la actividad aplicada con fuerza iónica 0.1 M.



**Figura III- 2.** Perfil de elución de cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex (purificación de lacasa de *T. villosa*, Protocolo III). Se indica el gradiente escalonado de incremento de fuerza iónica.

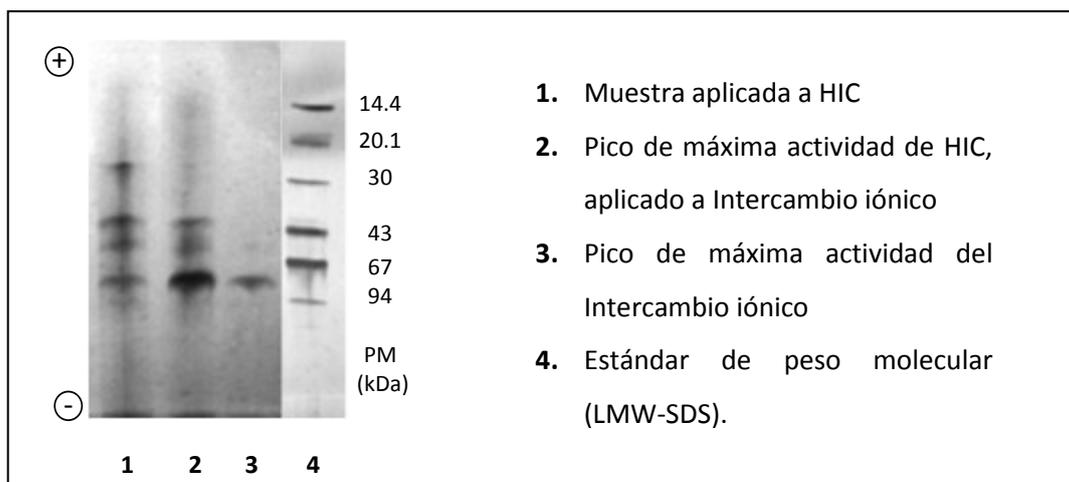
Este protocolo resultó el más efectivo con un factor de purificación total de 24 (**tabla III-3**). El rendimiento global del proceso fue 32 %.

La electroforesis confirma el alto grado de pureza alcanzado y el PM estimado de la banda de la proteína purificada concuerda con el observado en las electroforesis anteriores (**fig. III-3**).

**Tabla III-3.** Cuadro de purificación de lacasa de *T. villosa* (Protocolo III)

|  | Rendimiento (%)* | AE (UE/mg) | Fp |
|--|------------------|------------|----|
| Pool de sobrenadantes de cultivo         | -                | 2.7        | -  |
| Precipitación salina                     | 50               | 5          | 2  |
| Cromatografía de interacción hidrofóbica | 47               | 26.4       | 10 |
| Cromatografía de Intercambio Iónico      | 32               | 64.4       | 24 |

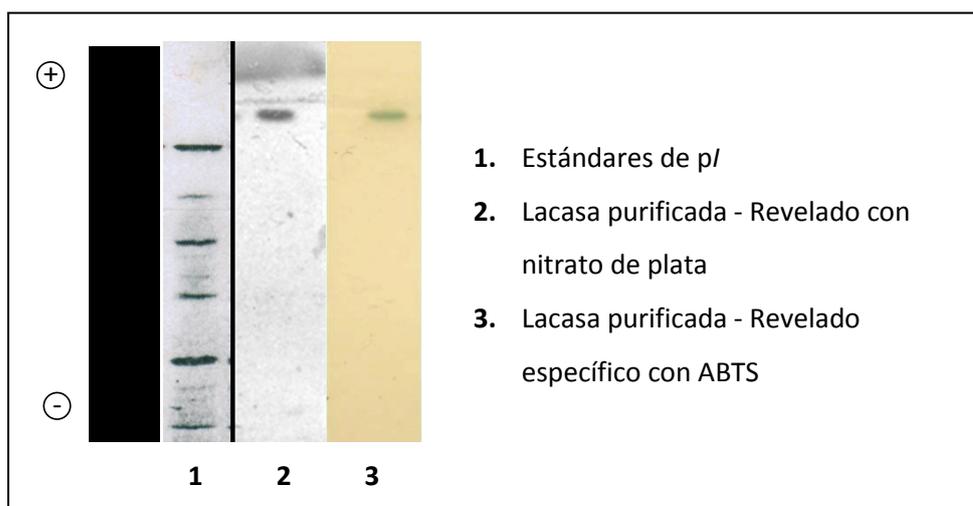
\* Actividad recuperada en cada etapa. AE: actividad específica. Fp: factor de purificación.



**Figura III-3.** Electroforesis SDS-PAGE: evaluación de Protocolo III para la purificación de lacasa de *T. villosa*.

#### 3.1.4. Caracterización de lacasa de *Trametes villosa*

En el revelado con nitrato de plata del isoelectroenfoque se observa una única banda y la misma coincide con la que muestra actividad frente al sustrato ABTS en el revelado específico (de color verde), confirmando su identidad como lacasa (**fig. III-4**). El punto isoeléctrico resultó ser inferior a 3.5.



**Figura III - 4.** Isoelectroenfoque para la determinación del punto isoeléctrico (pI) de lacasa de *T. villosa* purificada.

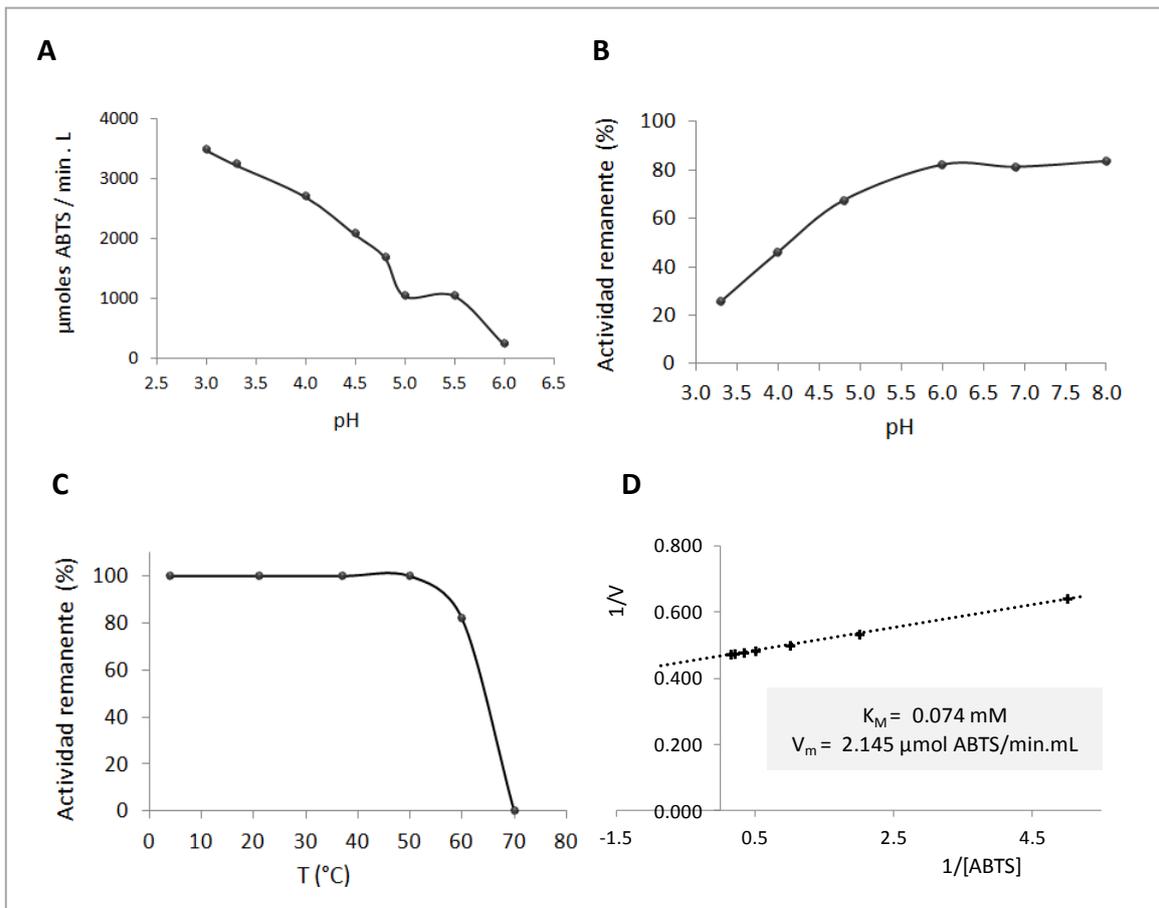
La mayor actividad fue registrada para el límite inferior del rango de pH del ensayo: pH 3.0 (**fig. III-5 A**). El porcentaje de actividad remanente después de 24 h de incubación (4 °C) fue aproximadamente 80 % para pHs mayores a 5.0, mientras que a valores de pH próximos al de máxima actividad registrada la enzima mostró una importante pérdida de actividad (**fig. III-5 B**).

Respecto a su estabilidad térmica, la enzima conservó 100 % de actividad luego de 1 h de incubación a temperaturas en el rango de 4 a 50 °C (a pH 6.0). A 70 °C perdió toda la actividad al cabo de 1 h (**fig. III-5 C**).

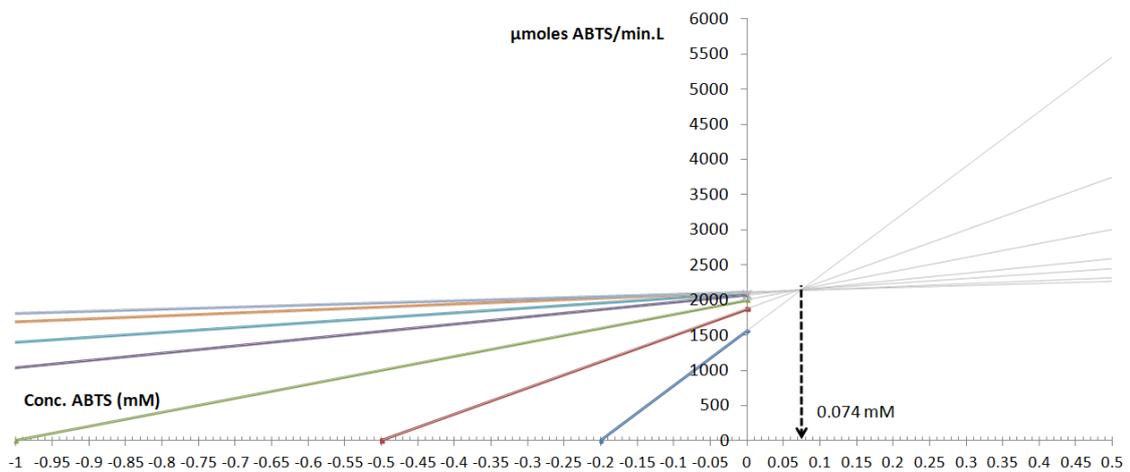
La enzima se ajustó al modelo de Michaelis-Menten obteniéndose los siguientes valores para los parámetros cinéticos (**fig. III-5 D**):

$$K_M = 0.074 \text{ mM} \quad - \quad V_{m\acute{a}x} = 2.15 \text{ } \mu\text{moles ABTS}/\text{min.mL}$$

Ambos valores coincidieron para los dos métodos de cálculo utilizados (**fig. III-6**).



**Figura III-5.** Caracterización de lacasa de *T. villosa*. **A.** Determinación del rango de pH óptimo. **B.** Estabilidad frente a pH (24 h, 4.0 °C). **C.** Estabilidad térmica (1 h, pH 6.0). **D.** Determinación de constantes cinéticas (linealización de Lineweaver-Burk). Estudios realizados con el sustrato ABTS.



**Figura III-6.** Caracterización de lacasa de *T. villosa*. Determinación de la constante  $K_M$  para ABTS por el método gráfico directo de Eisenthal y Cornish-Bowden.

### 3.2. Purificación y caracterización de lacasa de *Pycnoporus sanguineus*

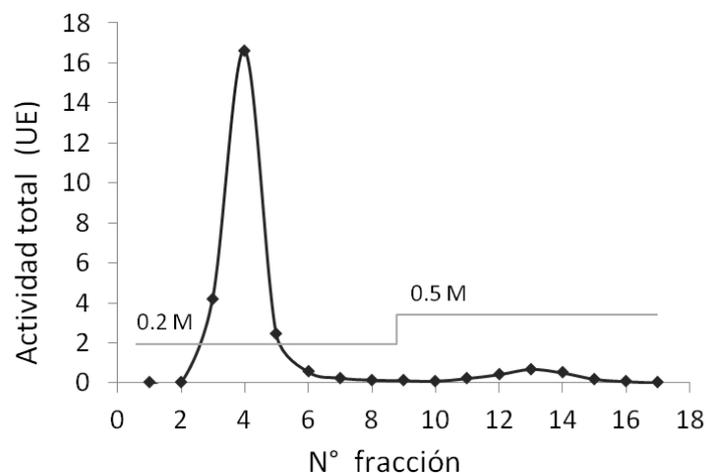
#### 3.2.1. Purificación de lacasa de *Pycnoporus sanguineus*

La actividad específica de la enzima eluida en el intercambio iónico fue 26 veces superior a la del extracto de partida (**tabla III-4**). Se recuperó en total 67 % de la actividad aplicada al intercambiador (en sobrenadante, lavados y eluidos) y 58 % se encontró en el pico de máxima actividad (**fig. III-7**). El rendimiento global de la purificación considerando la precipitación con sulfato de amonio fue 43 % (**tabla III-4**).

**Tabla III-4.** Purificación de lacasa de *P. sanguineus*

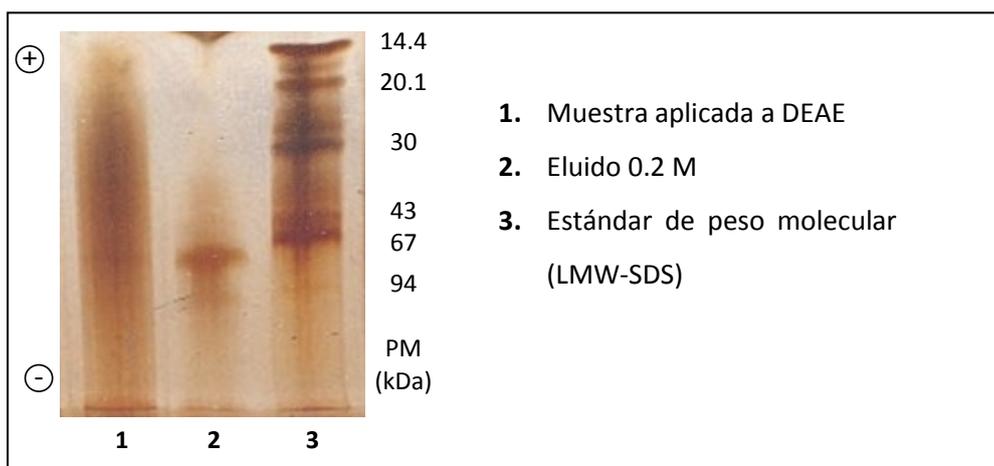
|                      | AE (UE/mg) | Fp | R (%) |
|----------------------|------------|----|-------|
| Precipitación salina | 3.4        | -  | 74    |
| Intercambio iónico   | 87.5       | 26 | 43    |

AE: actividad específica. Fp: factor de purificación. R: rendimiento de actividad.



**Figura III-7.** Perfil de elución por aumento de fuerza iónica en Intercambio Iónico.

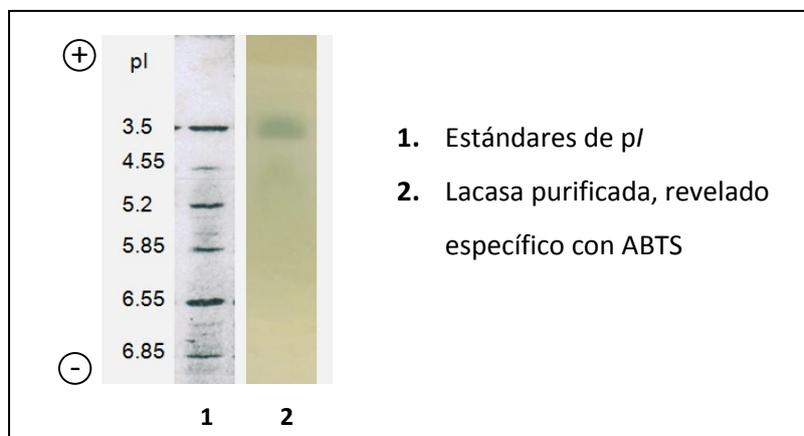
En la electroforesis desnaturizante SDS-PAGE se pudo comprobar el grado de pureza alcanzado, observándose en el patrón electroforético correspondiente al pico de elución del DEAE una sola banda de buena intensidad en concordancia con un PM = 77 kDa (**fig. III-8**).



**Figura III-8.** Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE. Evaluación de la purificación de lacasa de *P. sanguineus*.

### 3.2.2. Caracterización de lacasa de *Pycnoporus sanguineus*

El punto isoeléctrico de la lacasa aislada de *P. sanguineus* estimado mediante IEF fue 3.9 y por revelado específico con ABTS se confirmó la identidad de la enzima (**fig. III-9**).



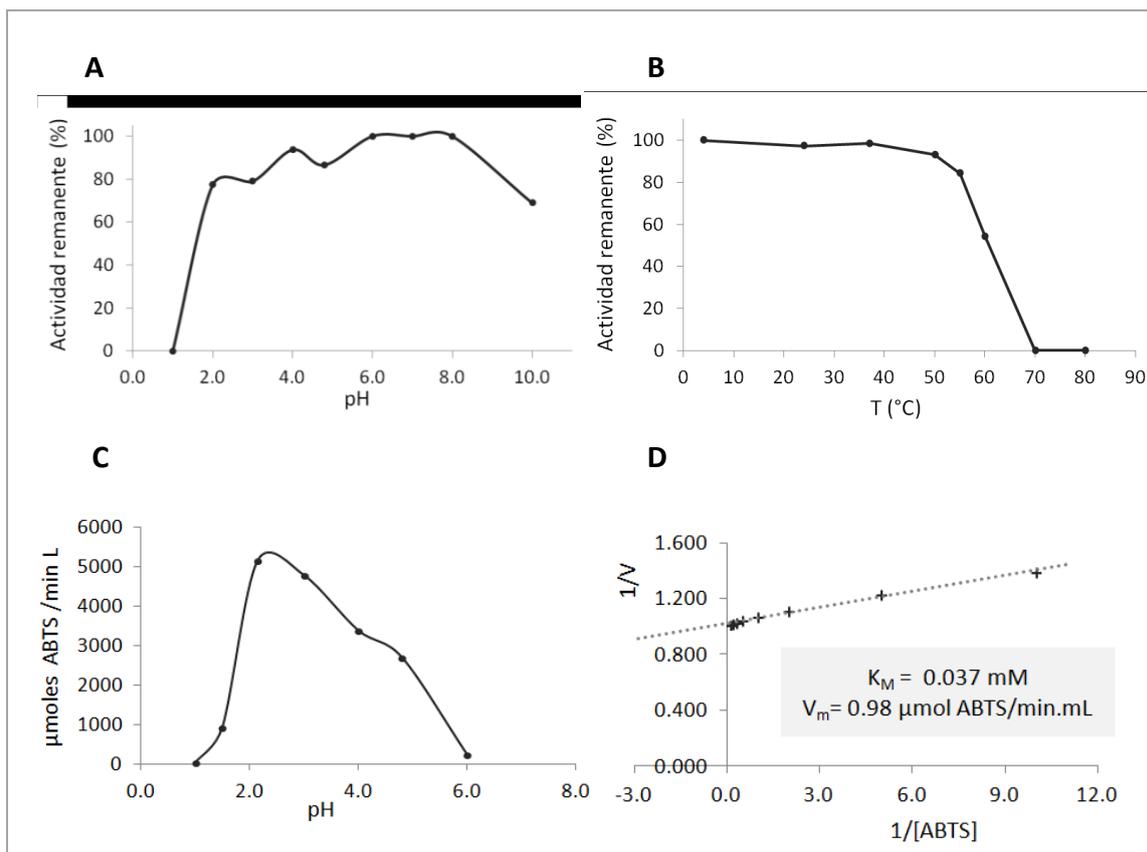
**Figura III-9.** Isoelectroenfoque para la determinación del punto isoeléctrico (pI) de la lacasa de *P. sanguineus*.

La enzima purificada conservó 80 a 100 % de su actividad a valores de pH entre 4.0 y 8.0 luego de 24 h de incubación. El rango de pH óptimo observado se encuentra entre 1.5 y 3.0. La actividad residual luego de 1 hora de incubación fue de 100 % en un rango de temperatura entre 4 y 50 °C (este estudio fue realizado a pH 6.0 para estar en el rango de estabilidad de la enzima con el pH). Por último, la enzima se ajustó al modelo

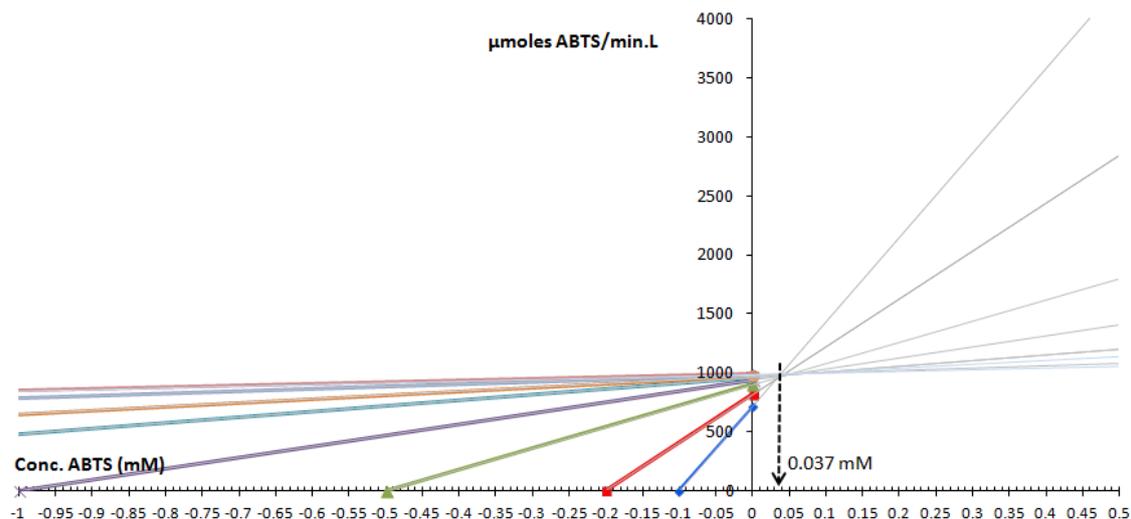
de Michaelis-Menten, obteniéndose los siguientes valores para los parámetros cinéticos (**fig. III-10**):

$$K_M = 0.037 \text{ mM} \quad - \quad V_{m\acute{a}x} = 0.098 \text{ } \mu\text{moles ABTS/min.mL}$$

Ambos valores coincidieron para los dos métodos de cálculo utilizados (**fig. III-11**).



**Figura III-10.** Caracterización de lacasa de *P. sanguineus*. **A.** Estabilidad frente a pH (24 h, 4.0 °C). **B.** Estabilidad térmica (1 h, pH 6.0). **C.** Determinación del rango de pH óptimo. **D.** Determinación de constantes cinéticas (linealización de Lineweaver-Burk). Estudios realizados con el sustrato ABTS.



**Figura III-11.** Caracterización de lacasa de *P. sanguineus*. Determinación de la constante  $K_M$  para ABTS mediante el método gráfico directo de Eisenthal y Cornish-Bowden.

Se demostró la influencia de los iones constituyentes de los tampones en la estabilidad de la lacasa ya que la misma fue menor con acetato de sodio y glicina-HCl que con citrato-fosfato para los mismos valores de pH (**tabla III-5**). Si bien se debe tener en cuenta que el límite inferior del rango de amortiguación del sistema citrato-fosfato es 2.6, el pH informado es el registrado en la mezcla de incubación.

**Tabla III-5.** Efecto del sistema tampón en la estabilidad (24 h, 4°C) de la lacasa de *P. sanguineus* a distintos pH.

| Sistema          | pH | Actividad remanente (%) |     |     |
|------------------|----|-------------------------|-----|-----|
|                  |    | 2.0                     | 4.0 | 4.8 |
| Citrato-fosfato  |    | 77                      | 94  | 87  |
| Acetato de sodio |    | -                       | 40  | 47  |
| Glicina-HCl      |    | 31                      | -   | -   |

### 3.3. Discusión

El nivel de pureza requerido para una proteína varía de acuerdo a las aplicaciones a las que la misma se destine. Uno de los objetivos en esta etapa de la Tesis fue obtener las enzimas parcialmente purificadas de los dos basidiomicetes seleccionados para realizar el estudio de sus propiedades bioquímicas así como para utilizarlas en la posterior etapa de inmovilización.

Las lacasas fúngicas son proteínas extracelulares liberadas al medio de cultivo, por lo que su purificación resulta más simple que la de otras proteínas intracelulares, debiendo ser separadas de los componentes del medio así como de otras proteínas y metabolitos producidos por el hongo [22]. Para la purificación de estas enzimas se han empleado con frecuencia técnicas bioquímicas tales como precipitación salina, cromatografía de intercambio iónico, de exclusión molecular y de interacción hidrofóbica, así como otras más específicas como la cromatografía de afinidad utilizando por ejemplo grupos fenólicos como ligando [156]. Además, dichas técnicas se complementan con diálisis, concentración por precipitación o ultrafiltración [22,74]. En este trabajo se logró purificar 24 veces la enzima aislada de *T. villosa* y 26 veces la de *P. sanguineus*, con rendimientos de 32 % y 43 %, respectivamente.

El protocolo empleado en el caso de *P. sanguineus* resultó más sencillo que el seleccionado para *T. villosa* ya que contó con un paso menos, lo que implica menor consumo de tiempo y materiales. En la bibliografía se reportan diversos procedimientos de distinta complejidad para la purificación de lacasas de *P. sanguineus* con resultados variables en eficiencia [121,146–148,152,153,157–161]. El resultado obtenido en este estudio es comparable a los publicados por Trovaslet *et al.* (2007)[147] y Zimbardi *et al.* (2016) [153], en los que se obtuvo factores de purificación de 20 y 25 y rendimientos de 37 y 30 %, respectivamente. En el primer trabajo citado se realizó una cromatografía de intercambio aniónico, mientras que en el segundo el procedimiento incluyó una etapa de precipitación salina y otra de cromatografía de interacción hidrofóbica.

A diferencia de lo que sucede con la lacasa de *P. sanguineus*, y de igual forma a lo señalado para los experimentos de producción de la enzima, se encuentran pocos estudios de purificación y/o caracterización de lacasas de cepas nativas de *Trametes*

*villosa*, exceptuando publicaciones como la de Yaver *et al.* en 1996 [162] y la de Levin, Melignani y Ramos en 2010 [144]. Puede ser significativo el hecho de que la producción heteróloga de la lacasa de *T. villosa* en *Aspergillus* fue patentada en el año 1995 [145].

La caracterización de las enzimas purificadas de los dos basidiomicetes mostró que a pesar de tratarse de cepas de hongos provenientes de especies y géneros distintos, ambas presentan características similares tales como condiciones óptimas de catálisis y estabilidad frente a la temperatura y pH. No obstante, diferencias menores en estas propiedades pueden ser relevantes al momento de su aplicación biotecnológica.

En relación al rango de pH óptimo, para ambas enzimas se encontró próximo a 3.0 coincidiendo con lo observado típicamente para lacasas con el sustrato ABTS [160] y con lo reportado para estos dos basidiomicetes [121,158,162]. Por otro lado, el rango de pH óptimo no coincide con el de mayor estabilidad, lo cual ya ha sido observado para otras lacasas [129] y representa una desventaja por no permitir utilizar los biocatalizadores al máximo de su rendimiento. En consecuencia, en este trabajo se continuó utilizando el acetato de sodio pH 4.8 para el ensayo de actividad con ABTS y se seleccionó fosfato de sodio pH 6.0 para trabajar en condiciones de estabilidad de las enzimas.

Ambas enzimas presentaron buena estabilidad térmica de forma similar a otras lacasas estudiadas, conservando su actividad durante 1 h, hasta una temperatura de 50 °C [129]. Sin embargo, la lacasa aislada de *T. villosa* mostró mayor resistencia al efecto de la temperatura, conservando 80 % de actividad a 60 °C, mientras que la de *P. sanguineus* retuvo 50 % de la actividad a esta temperatura, tras 1 hora de incubación.

Con un valor de  $K_M$  igual a la mitad del obtenido para *T. villosa*, la lacasa de *P. sanguineus* mostró mayor afinidad por el sustrato ABTS. Otras cepas de *P. sanguineus* presentan valores superiores para esta constante con ABTS: 0.106 [159], 0.077 [121] y 0.058 [158].

La mayor parte de lacasas fúngicas que se han estudiado presentan un valor bajo de punto isoeléctrico [29,163]. Tanto la enzima aislada de *T. villosa* como la de *P. sanguineus* presentaron esta característica, siendo la de *T. villosa* más ácida con un

pI inferior a 3.5. Yaver *et al.* reportaron una lacasa para este hongo con pI = 3.5 y otras isoenzimas con valores de pI hasta 6.8 [162]. Para *P. sanguineus* se han encontrado lacasas de pI entre 3.5 y 7.0 [157,159,160].

De acuerdo a lo observado en las electroforesis desnaturalizantes en gel de poliacrilamida el peso molecular estimado para los dos polipéptidos es 77 kDa, encontrándose en el rango de PM reportado generalmente a partir de SDS-PAGE de lacasas fúngicas [163,164]. Este puede corresponder al PM de las enzimas dado que la estructura monomérica es encontrada con mayor frecuencia [27,29,163]. En el caso de *P. sanguineus* se ha descrito esta estructura para lacasas de otras cepas con PM en el entorno de 70 kDa [153,158,159]. Para *T. villosa* se encuentra descrita una proteína dimérica de 130 kDa y otras isoformas de las cuales no se reportó la estructura cuaternaria [162,165] así como dos isoenzimas de 150 y 75 kDa producidas por una cepa aislada en Argentina, con la cual es posible que la cepa uruguaya presente similitud [144].

Aparte de la variabilidad entre cepas existen otros factores responsables de la gran variación observada en resultados para lacasas aisladas de un determinado basidiomicete, tanto en la purificación como en la caracterización. En un gran número de basidiomicetes se ha reportado la presencia de múltiples genes que codifican para la expresión de isoenzimas de la lacasa, como es el caso de los que son objeto de este estudio, *P. sanguineus* y *T. villosa* [27,162,166]. Por otro lado, existen diferentes isoformas debidas a diferencias en el patrón de glicosilación [164]. Las lacasas de basidiomicetes presentan un grado variable de N-glicosilación que afecta las propiedades catalíticas y de estabilidad y puede constituir hasta el 30 % del peso molecular de las mismas [20,22,151,159]. Asimismo, se puede encontrar isoformas originadas por modificaciones post-traduccionales como las escisiones proteolíticas [147]. En este trabajo con los procedimientos de producción y purificación utilizados se obtuvo una isoforma para cada una de las lacasas estudiadas, lo cual se puede deducir a partir de las electroforesis en las que por revelado específico con el sustrato de la enzima se detecta una sola banda con actividad. La proteína aislada de *T. villosa* presentó un punto isoeléctrico similar a la isoforma 1 descrita por Yaver *et al.* (1996) si bien no coincide el PM de la cadena polipeptídica obtenido a partir de la SDS-PAGE [162]. Por otro lado, las isoformas 2 y 3 en dicho trabajo presentaron puntos

isoeléctricos mayores, entre 5.0 y 7.0. Por último, la lacasa encontrada de *P. sanguineus* presentó cierto grado de similitud con las enzimas descritas por Lomascolo *et al.* (2002) [122], Zimbardi *et al.* (2016) [153], Vite-Vallejo *et al.* (2009) [159], Ramírez-Cavazos *et al.* (2014) [160], Nishizawa *et al.* (1995) [157] o García *et al.* (2006) [164].



# CAPÍTULO IV

Inmovilización de lacasas  
fúngicas mediante el método  
covalente reversible



# 1. OBJETIVO

- Obtención de biocatalizadores en fase sólida en base a lacasas de los basidiomicetes *Trametes villosa* y *Pycnoporus sanguineus* inmovilizadas mediante el método covalente reversible.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Determinación de actividad enzimática

La actividad lacasa se determinó a temperatura ambiente (22 °C) por oxidación del sustrato ABTS, de acuerdo al método descrito por Niku-Paavola *et al.* [116].

- *Enzima en solución*: el ensayo se realizó como se describió en Capítulo II-2.1.1.

- *Actividad en fase sólida*: Se realizó una suspensión de derivado en fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0. Se incubó una alícuota de la suspensión (0.2 mL, correspondiente a 10 mg de derivado escurrido) con ABTS 5.0 mM en acetato de sodio 0.1 M pH 4.8 (2.0 mL) a 22 °C. Se utilizó agitación magnética para mantener una suspensión homogénea durante la lectura espectrofotométrica. Se monitoreó la oxidación del sustrato por incremento de la absorbancia a 436 nm ( $\epsilon_{436} = 29300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

La unidad de enzima (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto en las condiciones del ensayo.

### 2.2 Determinación de concentración de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó con el método del ácido bicinonínico (BCA) [167] y se utilizó seroalbúmina bovina como estándar. La cantidad de proteína inmovilizada se estimó como la diferencia entre la cantidad de proteína aplicada al gel y la recuperada en sobrenadante y lavados.

### 2.3 Síntesis de tiolsulfonato-agarosa (TSI-agarosa)

La síntesis de agarosa activada con grupos TSI se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Batista-Viera *et al.* [168,169] como se detalla a continuación.

#### 2.3.1 Síntesis de tiol-agarosa

El gel mercaptohidroxipropil eter agarosa se preparó en 3 etapas. Primero se activó agarosa 4B con epíclorhidrina en medio básico. En la segunda etapa la epoxi-agarosa obtenida reacciona con tiosulfato de sodio para dar grupos S-alkil-tiosulfato unidos al gel (derivado Bunte Salt). Finalmente, los grupos S-alkil-tiosulfato fueron reducidos

con ditioneitol (DTT) originando los grupos tiol.

El contenido de grupos tiol del derivado está determinado por la cantidad de epíclorhidrina empleada en esta etapa. Se utilizó 15 mL de epíclorhidrina y 100 mL de NaOH 1.0 M cada 100 g de gel escurrido, con lo que se obtuvieron entre 400 y 600  $\mu\text{mol}$  de grupos tiol por gramo de gel seco.

El contenido de grupos tiol se verificó por titulación con 2,2'-dipiridil disulfuro 1.5 mM (2-PDS,  $\epsilon_{343} = 8.02 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) disuelto en fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0.

Se incubó una alícuota de gel escurrido (0.1 g) con solución de 2-PDS (10 mL) durante 1 h bajo agitación a 22 °C. Se midió absorbancia a 343 nm en el sobrenadante para calcular los micromoles de -SH por gramo de gel seco.

### 2.3.2 Preparación de tiolsulfinato-agarosa

Se realizó una suspensión de 50.0 g de gel tiol-agarosa escurrido en 100 mL de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 y bajo agitación se agregaron alícuotas de 1.0 mL de una solución de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , hasta la aparición y persistencia de color amarillo. El gel disulfuro-agarosa obtenido se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y NaCl 1.0 M.

El gel TSI-agarosa se preparó por oxidación de los grupos disulfuro del gel con MMPP utilizando la relación: 0.5 moles MMPP por mol de grupos S-S. Se incubó una suspensión del gel (en acetato de sodio 0.2 M pH 5.0) con MMPP bajo agitación durante 2 h a 22°C.

Luego el gel TSI-agarosa se lavó con acetato de sodio 50 mM pH 5.0 y ácido acético 0.1 M. El gel tiol-reactivo se conservó a 4 °C equilibrado en acetato de sodio 0.2 M pH 5.0.

### 2.3.3 Título de estructuras reactivas en el derivado TSI-agarosa

Se realizó una suspensión con una alícuota de gel escurrido (1.0 g) en fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0 (3.0 mL). A esta suspensión se adicionó glutatión 15 mM disuelto en la misma solución tampón (3.0 mL). La mezcla obtenida fue agitada en Vortex cada 5 minutos durante media hora. El exceso de glutatión se tituló con una solución de 2-PDS 1.5 mM en fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0.

Se analizó la muestra por triplicado mezclando 2.5 mL de fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0, 0.5 mL de 2-PDS y 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante. Se midió absorbancia a 343 nm.

Debido a la posible oxidación espontánea del glutatión se realizó un control colocando tampón fosfato en lugar de la alícuota de gel. Se calculó la cantidad de glutatión unido al gel oxidado a partir de la diferencia de lecturas de absorbancia obtenidas para el control y las alícuotas de sobrenadante.

Se obtuvo un gel TSI-agarosa con 15  $\mu\text{mol}$  de grupos tiolsulfonato por mililitro de derivado.

➤ **Estudios realizados para la lacasa de *Trametes villosa***

**2.4 Metodologías para la obtención de grupos tiol expuestos en la lacasa de *T. villosa* semi-purificada ( $E_{sp}$ )**

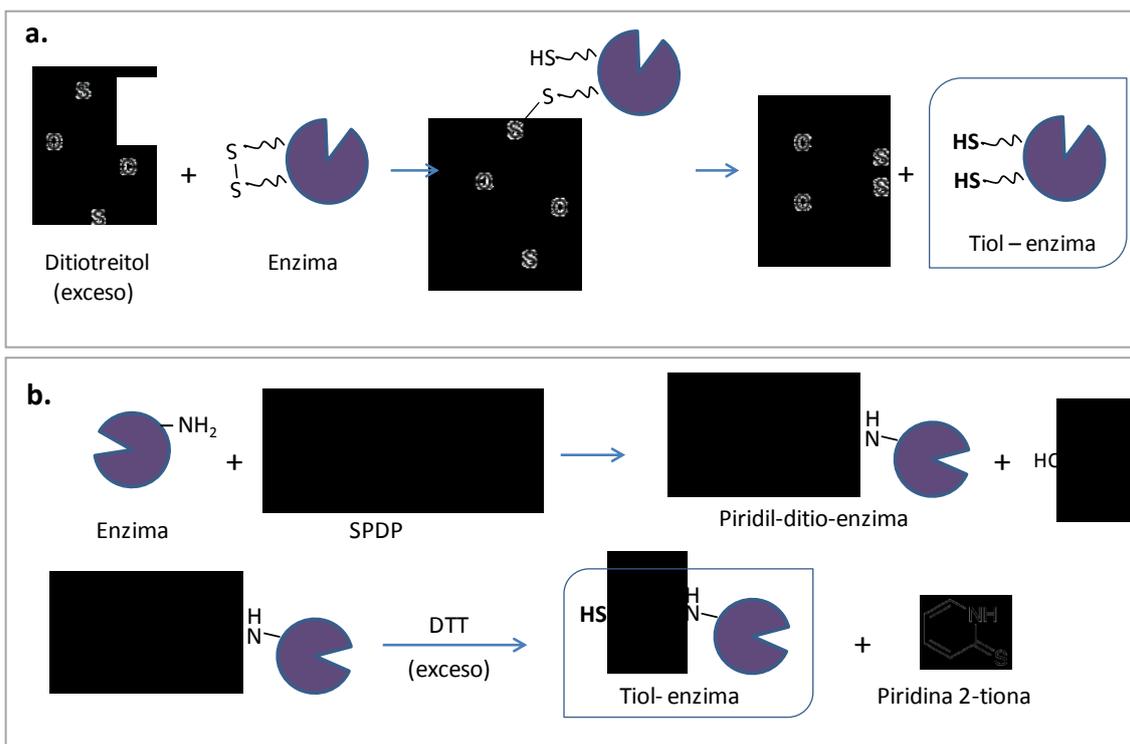
Se trabajó con una muestra de enzima parcialmente purificada mediante precipitación salina y diálisis (enzima semi-purificada o “ $E_{sp}$ ”).

Dado que la enzima nativa no se inmovilizó en TSI-agarosa se realizaron las modificaciones químicas descritas a continuación para generar los grupos tiol necesarios.

**2.4.1 Reducción de enlaces disulfuro con ditioneitol**

Se incubó una alícuota de enzima con DTT 100 mM (conc. final) en tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0 durante 30 minutos a 22 °C. El exceso del agente reductor fue eliminado por gel-filtración en una columna de Sephadex<sup>TM</sup> G-25 (PD-10) equilibrada en fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5 suplementado con NaCl 0.15 M.

Se titularon grupos –SH en la solución antes y después del proceso de reducción para cuantificar la formación de tiol-enzima a partir de la ruptura de los enlaces disulfuro nativos (**fig. IV-1 a**). Para ello se utilizó el método de Ellman, que se describe en 2.4.3.



**Figura IV-1.** Tratamientos para la generación de grupos tiol en la enzima. **a.** Reducción con DTT de enlaces disulfuro nativos. **B.** Tiolación por reacción del compuesto heterobifuncional SPDP con los grupos ε-amino de los residuos de lisina superficiales de la proteína.

#### 2.4.2 Introducción de grupos tiol *de novo*

Para esta reacción se utilizó el reactivo heterobifuncional N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (**fig. IV-1 b**). Se incubó una alícuota de solución de lacasa parcialmente purificada con SPDP (1.0 mM conc. final) en fosfato de sodio 50 mM pH 6.8 y NaCl 0.15 M, durante 30 minutos, con agitación magnética suave a 22 °C.

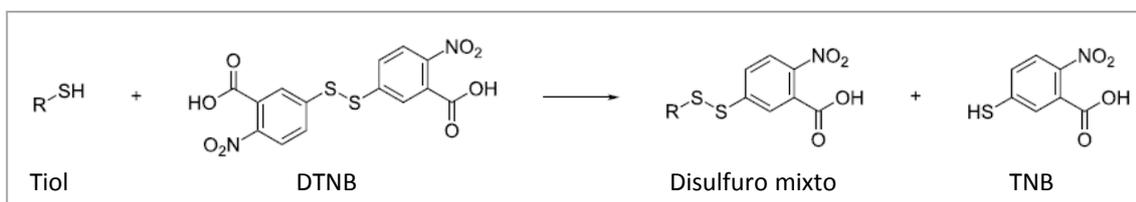
A continuación se agregó un exceso molar de DTT 1.5 veces mayor a la cantidad de SPDP utilizada y se incubó durante una hora para eliminar el compuesto piridina 2-tiona a partir del SPDP unido a la enzima y así generar la tiol-enzima.

Se separó la proteína de la reacción por gel-filtración con una columna de Sephadex™ G-25 (PD-10) y fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5 con NaCl 0.15 M.

El contenido de grupos tiol resultante se cuantificó como se describe a continuación.

### 2.4.3 Título de grupos tiol

La cuantificación de grupos tiol se realizó según el método de Ellman [170] en base a un intercambio tiol-disulfuro (**fig. IV-2**). Para ello se incubaron durante 15 minutos alícuotas de la muestra en fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0 con una solución de ácido ditionitrobenzoico (DTNB) 4 mg/mL preparada en el mismo tampón y se midió absorbancia a 412 nm. Esta es la longitud de onda de máxima absorbancia del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), el compuesto formado por reacción de los grupos –SH con DTNB. Dado que la estequiometría de la reacción es 1:1 se calculó el número de tioles presentes a partir de la cantidad de TNB formado. Se analizaron las muestras por duplicado.



**Figura IV-2.** Reacción de intercambio tiol-disulfuro.

### 2.5 Inmovilización de lacasa de *T. villosa* semi-purificada ( $E_{sp}$ ) en TSI-agarosa

Se realizaron suspensiones con alícuotas de la enzima nativa, reducida y tiolada (ver 2.4), y TSI-agarosa equilibrada en tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5 suplementado con NaCl 0.15 M. Las tres suspensiones fueron incubadas durante 24 h con agitación en rotatorque a 4 °C.

Los derivados insolubles obtenidos se lavaron con el tampón utilizado en la inmovilización, luego con fosfato de sodio 20 mM pH 7.5 suplementado con NaCl 0.5 M, a continuación con fosfato de sodio 20 mM pH 7.5 y por último con fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0.

Se cuantificó actividad lacasa y proteínas según lo descrito en 2.1 y 2.2.

Se estudió el efecto de la carga de proteína en el proceso de inmovilización con la enzima tiolada, en el rango de 0.3 a 2.6 mg de proteína aplicada por gramo de gel TSI escurrido. Los derivados obtenidos se conservaron a 4 °C hasta su uso.

### 2.5.1 Reversibilidad de la unión

Para verificar la reversibilidad de la unión de la enzima al soporte se incubaron alícuotas de derivado escurrido (300 mg) con 3.0 ml de DTT 100 mM en fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0. Se utilizó el derivado obtenido con la menor carga de enzima tiolada. La mezcla se incubó con agitación en rotatorque durante 30 minutos a 22 °C, luego el gel se filtró y lavó con el mismo tampón.

Se cuantificó la proteína liberada en el sobrenadante luego de eliminar el agente reductor por gel-filtración. Además se determinó actividad en sobrenadante y en el gel después de la elución.

## 2.6 Inmovilización de lacasa de *T. villosa* purificada ( $E_p$ )

Se realizó el estudio de condiciones de tiolación y de inmovilización en TSI-agarosa utilizando para ello la enzima purificada según el protocolo optimizado informado en el Capítulo III.

**2.6.1 Efecto del SPDP en la tiolación** – Se utilizaron las siguientes relaciones de moles de SPDP respecto a moles de proteína: 0:1, 50:1, 100:1, 200:1 y 400:1. La tiolación se realizó como se describió en 2.4.2.

La inmovilización se realizó a pH 7.5 en fosfato de sodio 50 mM con NaCl 0.15 M con una carga aplicada de  $3.1 \pm 0.3$  UE por gramo de TSI-agarosa (16 h, agitación en rotatorque, 4 °C).

Se verificó la reversibilidad de la unión enzima-soporte incubando alícuotas de derivado (obtenido con la relación 200:1) con una solución 100 mM del agente reductor DTT, como se describió en 2.5.1. Se cuantificó la actividad en sobrenadante y en el gel después de la elución.

**2.6.2 Efecto del pH en la inmovilización** – Se realizó la inmovilización de la enzima tiolada a pH 7.5 y al pH de tiolación (6.8). En primer lugar se llevó a cabo la tiolación con SPDP utilizando la relación molar 200:1 (SPDP : proteína). A continuación se eliminó mediante gel filtración el exceso de SPDP y DTT. Para ello se utilizó el tampón fosfato de sodio 50 mM con NaCl 0.15 M de pH 6.8 en un caso y la misma solución pero a pH 7.5 en el otro, de forma de obtener la enzima tiolada en las dos condiciones de inmovilización a ensayar. Por último se realizó la inmovilización incubando alícuotas

de ambas muestras con TSI-agarosa (16 h, agitación en rototorque, 4 °C). La carga enzimática utilizada fue  $5.9 \pm 0.3$  UE/g de TSI-agarosa.

## 2.7 Caracterización de la enzima inmovilizada de *Trametes villosa* ( $E_{sp}$ )

Se caracterizó el derivado obtenido por inmovilización en TSI-agarosa (según 2.5) de la lacasa tiolada de *T. villosa* semi-purificada, empleando como control enzima soluble ( $E_{sp}$ ).

A partir de los resultados obtenidos para la enzima soluble y el derivado insoluble se evaluó el efecto de la inmovilización en la actividad y estabilidad de la enzima utilizando el test de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

### 2.7.1 Determinación de pH óptimo

Se realizó el ensayo de actividad con una suspensión del derivado enzimático en tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0 (39 mg derivado/mL de suspensión) y soluciones de ABTS de pH entre 2.0 y 8.0 (en citrato-fosfato de sodio pH 2.0 y 2.9; acetato de sodio pH 4.0 y 4.8; fosfato de sodio pH 6.0, 6.8, 7.5 y 8.0).

### 2.7.2 Efecto del pH en la estabilidad enzimática

Se realizaron suspensiones de enzima inmovilizada (30 mg derivado/mL de suspensión) a diferentes valores de pH, entre 2.4 y 9.6 (en citrato-fosfato de sodio pH 2.4 y 3.0; acetato de sodio pH 4.2; fosfato de sodio pH 6.1, 7.2, 8.0 y 9.6). Las mismas fueron incubadas durante 24 h a 4 °C. Se determinó actividad residual con el ensayo de actividad descrito en 2.1.

### 2.7.3. Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática

Se preparó una suspensión de enzima inmovilizada en tampón fosfato 0.1 M pH 6.0. Se tomaron alícuotas de la misma y se incubaron a diferentes temperaturas entre 4 y 70 °C durante 1 h. Luego de termostatar las muestras a 22 °C se determinó actividad residual mediante el ensayo de actividad previamente descrito (ver 2.1).

#### 2.7.4. Determinación de parámetros cinéticos

Se realizó el ensayo de actividad con concentraciones finales de ABTS en la mezcla reactiva comprendidas entre 0.2 y 7.0 mM (0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mM) en acetato de sodio 0.1 M pH 4.8.

A partir de los datos de velocidad de reacción obtenidos se calculó la Velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) y Constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) utilizando el método de linealización de Lineweaver-Burk [154].

#### 2.7.5. Evaluación de la capacidad de reutilización del biocatalizador

La reacción de decoloración del colorante antraquinónico Remazol brilliant Blue R (RBBR) fue empleada como modelo de un sistema para decolorar soluciones acuosas. Alícuotas de enzima soluble e inmovilizada (100 UE / L de mezcla reactiva) fueron incubadas con una solución del colorante (130 mg/L) en acetato de sodio 0.1 M pH 4.8. La concentración del colorante fue seleccionada de forma que la absorbancia máxima en el espectro visible ( $\lambda = 595$  nm) no superara 1.5 unidades. Se incubó la mezcla reactiva (1.5 mL) con agitación magnética a 22 °C durante 24 h.

Se cuantificó la decoloración registrando el espectro visible de la solución tratada enzimáticamente. En el caso del derivado insoluble se determinó en la solución obtenida luego de su remoción por filtración. Se calculó el área bajo el pico a 595 nm y el resultado de decoloración se expresó como porcentaje del área medida para la solución inicial de colorante.

Se realizaron controles con lacasa desnaturalizada por calor y con agarosa (para evaluar la posible adsorción del colorante a la matriz).

Después de cada reacción el biocatalizador insoluble fue separado y reutilizado con nueva solución de colorante iniciando un nuevo ciclo. Se realizaron cuatro ciclos consecutivos y los resultados se compararon con el obtenido para la enzima soluble.

➤ **Estudios realizados para la lacasa de *Pycnoporus sanguineus***

**2.8 Inmovilización de lacasa de *Pycnoporus sanguineus***

Tal como ocurrió para la lacasa de *T. villosa*, en ensayos preliminares se comprobó que la enzima nativa de *P. sanguineus* no se inmovilizó en TSI-agarosa. Por consiguiente se procedió a realizar las modificaciones químicas de la proteína para generar grupos tiol y se realizó la inmovilización de la enzima modificada.

**2.8.1. Reducción de la enzima nativa de *P. sanguineus* e inmovilización en TSI-agarosa**

Se trabajó con la enzima purificada por intercambio aniónico mediante el procedimiento descrito en el Capítulo III.

- *Reducción*: Se realizó el proceso de reducción de enlaces disulfuro con DTT 100 mM, en las condiciones descritas en 2.4.1. Se cuantificó la actividad inicial de la muestra y al final de este proceso.

- *Inmovilización*: Se incubaron alícuotas de la enzima reducida ( $E_{red}$ ) con TSI-agarosa (16 h, 4 °C, en rotatorque) utilizando dos cargas enzimáticas: 4.5 UE y 1.5 UE por gramo de gel escurrido.

Se agregaron controles en la inmovilización incubando alícuotas de enzima nativa con TSI-agarosa en las mismas condiciones utilizadas para la enzima reducida. Se realizó la elución de la actividad inmovilizada como se describió en 2.5.1 para verificar la reversibilidad de la unión y se cuantificó actividad en el sobrenadante obtenido. Se utilizó para esto el derivado obtenido con la menor carga de  $E_{red}$ .

**2.8.2. Introducción de grupos tiol *de novo* e inmovilización de lacasa de *P. sanguineus***

- *Tiolación*: En el proceso de tiolación de la enzima purificada se emplearon distintas relaciones molares SPDP: proteína (100:1, 200:1 y 400:1).

- *Inmovilización*: Se incubaron 2.0 UE de las muestras de enzima tiolada por gramo de gel escurrido durante 16 h, a 4 °C.

Al igual que en 2.8.1 se realizaron diferentes controles para evaluar la estabilidad de la enzima tiolada en el proceso de inmovilización, así como para comprobar la no adsorción de la enzima nativa al gel.

## 3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 3.1 Inmovilización de lacasa de *Trametes villosa* semi-purificada (E<sub>sp</sub>)

#### 3.1.1 Inmovilización de lacasa nativa

Considerando que la enzima nativa podría poseer 5 residuos cisteína [162,171,172] se probó la inmovilización covalente reversible de la misma en TSI-agarosa (según lo reportado en 2.5). Sin embargo, se recuperó toda la actividad aplicada en el sobrenadante

**(tabla IV-1)**. Se dedujo entonces que los grupos tiol de la enzima nativa no se encontraban expuestos en la proteína ó que los mismos podrían encontrarse formando parte de enlaces disulfuro.

#### 3.1.2 Inmovilización de lacasa reducida con DTT

Mediante la reducción de la enzima (según 2.4.1) se logró cuadruplicar el contenido de SH respecto a la enzima nativa, sin embargo, la enzima reducida no se unió al soporte TSI-agarosa **(tabla IV-1)**. Por lo tanto, se comprobó que los –SH generados por reducción de los dos enlaces disulfuro que presenta la lacasa [166] se localizan en el interior de la molécula proteica no resultando accesibles a los grupos TSI. Por otro lado, debido a que la enzima conservó su actividad luego de este tratamiento químico se concluyó que los grupos tiol implicados no afectan la actividad catalítica de esta lacasa.

#### 3.1.3 Introducción de grupos tiol *de novo* e inmovilización

La tiolación con SPDP se llevó a cabo (según 2.4.2) teniendo en cuenta que las secuencias reportadas de lacasas de *T. villosa* contienen de 4 a 12 residuos de lisina [162,171]. Con esta modificación química se consiguió incrementar la actividad expresada en el gel hasta 62 % **(tabla IV-1)**. Por otro lado, se comprobó que la actividad enzimática se conservó en el proceso de tiolación.

### 3.1.3.1. Efecto de la carga enzimática en el rendimiento de inmovilización

El porcentaje de actividad expresada en el derivado disminuyó a medida que aumentó la carga de enzima tiolada desde 62 a 7 % (**tabla IV-1**). Dado que la eficiencia de unión fue máxima en los tres casos (100 %) se puede concluir que no ocurrió inactivación de la enzima en el proceso y que la disminución de actividad expresada se podría deber a que se excedió la capacidad del gel TSI.

**Tabla IV-1.** Inmovilización de lacasa de *T. villosa* en TSI-agarosa <sup>a</sup>

| Enzima   | Carga enzimática aplicada (UE/g de gel escurrido) | Proteína inmovilizada (%) <sup>b</sup> | Actividad expresada en el derivado (%) <sup>c</sup> | Eficiencia de unión (%) <sup>d</sup> |
|----------|---|--|---|--------------------------------------|
| Nativa   | 15.0 ± 0.2  | 0.0                                    | 0   | -                                    |
| Reducida | 15.0 ± 0.2  | 0.0                                    | 0   | -                                    |
| Tiolada  | 3.0 ± 0.2   | 77.0 ± 0.5                             | 62 ± 3  | 100 ± 1                              |
|          | 12.0 ± 0.2  | 62.0 ± 0.5                             | 36 ± 3  | 100 ± 1                              |
|          | 26.0 ± 0.2  | 11.0 ± 0.5                             | 7 ± 2   | 98 ± 1                               |

**a.** Realizada en fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5 suplementado con NaCl 0.15 M

**b.** Diferencia entre la cantidad de proteína aplicada y la medida en sobrenadante y lavados

**c.** (UE expresadas en el gel) × 100 / (UE aplicadas)

**d.** (UE expresadas en el gel) × 100 / (UE aplicadas – UE recuperadas en sobrenadante y lavados)

### 3.1.3.2. Reversibilidad de la unión proteína-soporte

Se logró eluir toda la proteína inmovilizada con DTT 100 mM y 53 % de la actividad expresada en el gel. Con este resultado se comprobó que los enlaces formados entre la proteína y el soporte eran de tipo disulfuro (**fig. IV-1 b**) y que por tratarse de una unión reversible el método de inmovilización permite la reutilización del soporte una vez que la enzima perdió su actividad. Los grupos reactivos TSI pueden ser regenerados en su totalidad a partir del soporte tiol-agarosa obtenido tras la desorción de la proteína [168]. Para ello se realiza la oxidación controlada con ferricianuro de potasio y MMPP, tal como se describió en 2.3.2.

### 3.2 Inmovilización de lacasa de *Trametes villosa* purificada (E<sub>p</sub>)

#### 3.2.1 Efecto de la cantidad de SPDP utilizada en la tiolación

Se obtuvo un 100 % de eficiencia de unión en la inmovilización para las cuatro cantidades de SPDP utilizadas, lo cual indica que no ocurrió inactivación de la enzima durante la inmovilización en ningún caso. En el control con enzima nativa (0:1) en cambio, sí se observó inactivación enzimática, ya que la eficiencia de unión fue 30 %. Además, la actividad expresada en el gel en este caso fue despreciable.

Se observó un aumento de la actividad inmovilizada (expresada en el gel) a medida que aumentó la cantidad del reactivo tiolante, alcanzando cerca del 100 % con la relación 200:1, mientras que no se observó diferencia entre las relaciones 200:1 y 400:1, obteniéndose en los dos casos un derivado con 3.3 UE/g (**Tabla IV-2**).

**Tabla IV- 2.** Inmovilización de lacasa de *Trametes villosa* (E<sub>p</sub>) tiolada con distintas cantidades de SPDP.

| Relación molar<br>SPDP : proteína | Actividad expresada en el derivado |                      | Eficiencia de unión<br>(%) <sup>b</sup> |
|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------|---|
|                                   | (%) <sup>a</sup>                   | (UE/g gel escurrido) |   |
| 0 : 1                             | 5 ± 2                              | 0.1 ± 0.4            | 32                                      |
| 50 : 1                            | 57 ± 2                             | 1.4 ± 0.4            | 100                                     |
| 100 : 1                           | 88 ± 2                             | 2.5 ± 0.4            | 100                                     |
| 200 : 1                           | 95 ± 2                             | 3.3 ± 0.4            | 100                                     |
| 400 : 1                           | 92 ± 2                             | 3.3 ± 0.4            | 100                                     |

**a** (UE expresada en gel) x 100/ (UE aplicada)

**b** (UE expresada en gel) x 100/ (UE aplicada – UE recuperada en sobrenadante y lavados)

Por otro lado, en el proceso de tiolación no ocurrió pérdida de actividad, para ninguna de las condiciones ensayadas.

En este caso también fue posible comprobar la reversibilidad de la unión de la enzima al soporte por reducción del derivado: se recuperó en el sobrenadante 60 % de la actividad expresada, y no se detectó actividad en el gel resultante del proceso de elución.

### 3.2.2. Efecto del pH de inmovilización

Se obtuvo el mismo resultado para las dos condiciones ensayadas (pH 6.8 y 7.5). La actividad expresada en los derivados fue próxima al 100 % de la actividad aplicada, con 100 % de eficiencia de unión en ambos casos (**tabla IV-3**). Por lo tanto en este ensayo toda la enzima aplicada se unió al gel tiol-reactivo en una orientación adecuada para que se exprese toda su actividad, tal como se observó en el ensayo anterior con las relaciones molares 200:1 y 400:1 de SPDP: proteína (**tabla IV-2**).

**Tabla IV- 3.** Efecto del pH en la inmovilización de lacasa de *T. villosa* en TSI-agarosa

| pH <sup>a</sup> | Actividad expresada en el derivado |                                   | Eficiencia de unión (%) |
|-----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
|                 | (%) <sup>b</sup>                   | (UE/g gel escurrido) <sup>c</sup> |                         |
| 6.8             | 92 ± 2                             | 5.7 ± 0.4                         | 100                     |
| 7.5             | 93 ± 2                             | 5.6 ± 0.4                         | 100                     |

**a** Solución tampón: fosfato de sodio 50 mM con NaCl 0.15 M

**b** (UE expresada en gel) x 100/ (UE aplicada)

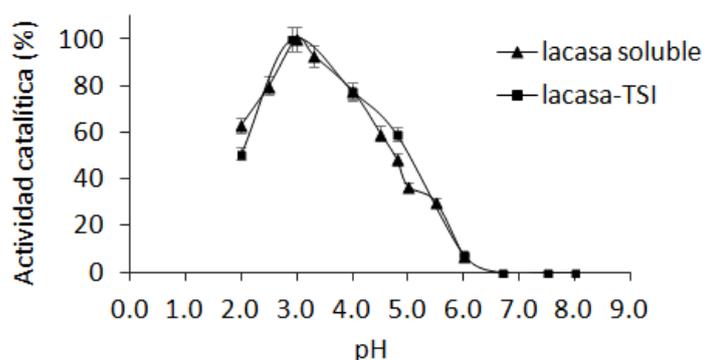
**c** (UE expresada en gel) x 100/ (UE aplicada – UE recuperada en sobrenadante y lavados)

Se observó una diferencia en los rendimientos de inmovilización para las enzimas con distinto grado de purificación, siendo superior el de la enzima con mayor pureza. Esto puede explicarse por la posibilidad de controlar la cantidad del reactivo tiolante en el caso en que la principal proteína en la muestra es la enzima a inmovilizar. Sin embargo, es necesario evaluar la relación costo-beneficio de la purificación previa a la inmovilización. Así, se debe tener en cuenta que la purificación además de demandar tiempo y recursos extra en el proceso completo de producción-inmovilización de la enzima, ocasiona una pérdida importante de actividad (en el caso de la lacasa de *T. villosa* el rendimiento de la purificación fue 32 %). Por otro lado, el uso de una muestra de menor pureza requerirá mayor cantidad del reactivo tiolante ó reducirá el rendimiento de inmovilización. Por último, dependiendo del uso que se dará al derivado obtenido puede variar el grado de pureza requerido, como se explicó en el Capítulo I y será un factor determinante.

### 3.3 Caracterización de la lacasa inmovilizada de *T. villosa* ( $E_{sp}$ tiolada) y comparación con la correspondiente enzima en solución

#### 3.3.1 Rango de pH óptimo

La oxidación de ABTS fue máxima en el entorno de pH 3.0 tanto para el derivado lacasa-TSI como para la enzima en forma soluble  $E_{sp}$  (**fig. IV-3**). Esto sugiere que la sustitución de grupos amino por grupos tiol y la unión covalente de los mismos al TSI-agarosa no afectó la actividad catalítica de la lacasa de *T. villosa*.



**Figura IV-3.** Efecto del pH en la actividad catalítica de la lacasa. Los resultados representan promedios de por lo menos 3 experimentos.

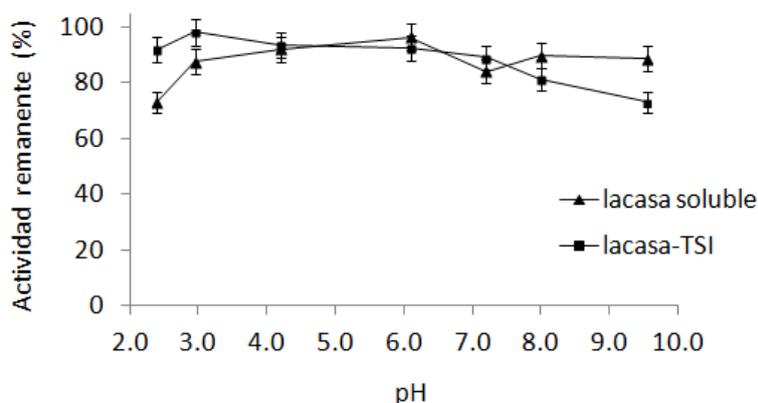
#### 3.3.2 Efecto del pH en la estabilidad del derivado enzimático

No se observaron diferencias significativas en el efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima soluble y la inmovilizada en el rango de pH entre 4.2 y 7.2, conservando en ambos casos entre 85 y 100 % de la actividad catalítica. Para los pH extremos ensayados sí existió diferencia significativa entre las dos enzimas, siendo la lacasa soluble más estable a pH mayor a 7.0 y la inmovilizada más estable a pH inferior a 4.0 (**fig. IV-4**).

Una posible explicación de este resultado puede estar dada por el valor de pKa de los grupos amino y los grupos tiol. A pH ácido los grupos amino se encuentran fuertemente protonados mientras que en la enzima tiolada e inmovilizada varios de estos grupos se encuentran químicamente modificados y los que no participan en la unión a TSI permanecen como tioles residuales. A pH elevado sin embargo, estos grupos tiol libres se encuentran ionizados como tiolatos con los que se pueden generar

nuevas uniones multipuntuales al TSI-agarosa, determinando que la conformación estable de la proteína sea distorsionada.

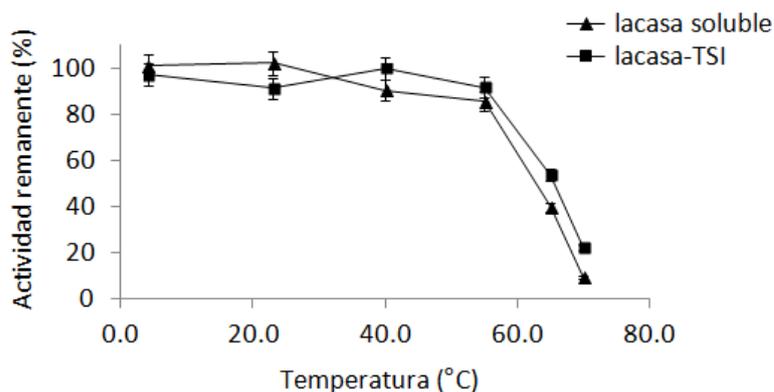
La disminución de estabilidad a pH próximo al óptimo de catálisis fue observada previamente en otros estudios [173]. Para la forma soluble purificada de esta enzima el efecto fue mucho más marcado (**ver Cap. III**) lo que indica que los compuestos presentes en la muestra de partida provenientes del cultivo tienen un efecto estabilizador de la proteína en condiciones ácidas.



**Figura IV-4.** Efecto del pH en la estabilidad de la lacasa. Los resultados representan promedios de por lo menos 3 experimentos.

### 3.3.3 Efecto de la temperatura en la estabilidad del derivado enzimático

La estabilidad térmica de la lacasa no se vio afectada por el proceso de inmovilización ya que el biocatalizador insoluble presentó un perfil muy semejante al de la enzima libre. En ambos casos la actividad remanente disminuyó drásticamente a 70 °C, sin embargo, a dicha temperatura la lacasa inmovilizada conservó 20 % de la actividad inicial (**fig. IV- 5**). Esto puede atribuirse a que la misma presenta una conformación más rígida, por lo que es menos afectada por la entropía a alta temperatura.



**Figura IV- 5.** Efecto de la temperatura en la estabilidad de la lacasa. Los resultados representan promedios de por lo menos 3 experimentos.

### 3.3.4 Determinación de parámetros cinéticos

Se pudo observar una diferencia en la constante de Michaelis-Menten obtenida con el sustrato ABTS para la enzima inmovilizada (fue mayor) respecto a la de la enzima en solución (**tabla IV-4**).

**Tabla IV - 4.** Parámetros cinéticos para la enzima nativa e inmovilizada

| Enzima              | $K_M$ ( $\mu\text{M}$ ) | $V_m$ ( $\mu\text{mol ABTS}/\text{min.mg proteína}$ ) |
|---------------------|-------------------------|---|
| Lacasa soluble      | $68.8 \pm 3.2$          | $2.85 \pm 0.02$                                       |
| Lacasa inmovilizada | $89.7 \pm 3.0$          | $2.80 \pm 0.10$                                       |

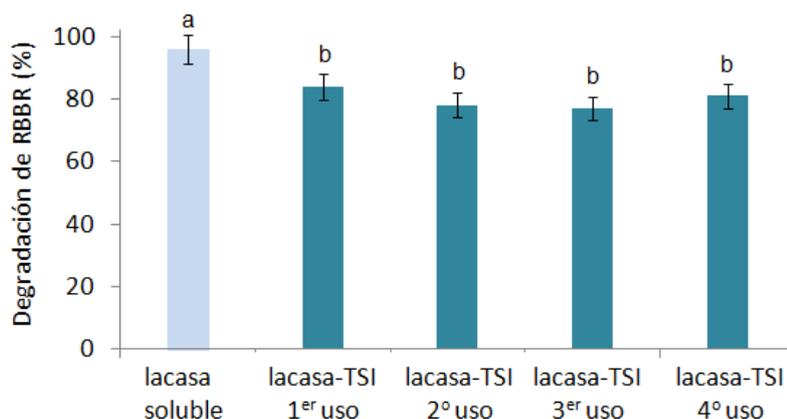
Notas: Valores obtenidos mediante linealización de Lineweaver-Burk para el sustrato ABTS. Los resultados representan promedios de por lo menos 3 experimentos.

Esto podría significar que el proceso de inmovilización afectó la afinidad de la lacasa por dicho sustrato. Sumado a esto, es frecuente el aumento de  $K_M$  en los derivados insolubles debido a problemas de difusión del sustrato en los mismos.

Por otro lado, el valor de  $V_{\text{max}}$  se mantuvo igual, indicando que bajo condiciones de saturación es posible obtener el mismo máximo de velocidad de reacción con ambos biocatalizadores.

### 3.3.5 Estudio de la estabilidad operacional (reutilización) del derivado

Se comprobó la capacidad del derivado para degradar el colorante RBBR. Se llevaron a cabo 4 ciclos consecutivos, en los cuales el derivado conservó la capacidad de decoloración como se puede observar en la **figura IV-6** (en el entorno del 80 %).



**Figura IV-6.** Estabilidad operacional del derivado insoluble lacasa-TSI. Se muestran 4 ciclos de uso del biocatalizador en la decoloración de RBBR. Los resultados representan promedios de por lo menos 3 experimentos. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a test de Tukey.

## 3.4 Inmovilización de lacasa de *Pycnoporus sanguineus*

### 3.4.1 Inmovilización de la enzima nativa

No se logró la inmovilización de la enzima nativa en el soporte TSI-agarosa, recuperándose 90 % de la actividad aplicada en sobrenadante y lavados. Se comprobó que si bien la lacasa de *P. sanguineus* podría presentar al igual que la de *T. villosa* 5 residuos de cisteína en su estructura [152,159,166], los mismos no se encuentran expuestos en la superficie, siendo probable además que 4 de ellos se encuentren formando parte de enlaces disulfuro tal como se propone en bibliografía [152,166].

### 3.4.2 Reducción e inmovilización

La enzima fue estable en el proceso de reducción, conservando toda la actividad al finalizar el mismo. El rendimiento de inmovilización de la enzima reducida fue bajo,

obteniéndose el mismo porcentaje de actividad expresada en el gel para las dos cargas enzimáticas aplicadas (21 %), mientras que la actividad medida en los derivados mantuvo la relación existente entre las dos cantidades de actividad aplicadas (4.5/1.5 UE = 0.9/0.3 UE) (**tabla IV-5**).

En los dos controles realizados con enzima nativa se encontró la misma cantidad de actividad expresada en el gel (0.07 UE/g gel escurrido), la cual se puede considerar despreciable (2 y 5 %). Por otro lado, para estos controles se perdió entre 25 y 47 % de la actividad aplicada, mientras que para la enzima reducida la actividad no recuperada en sobrenadante, lavados y derivado fue 14 y 39 % para las cargas 1.5 y 4.5 UE/g de gel, respectivamente. Por lo tanto, es posible que se haya producido una inactivación de esta última en solución durante la incubación con el gel TSI-agarosa. Estas observaciones se ven reflejadas en los valores bajos de eficiencia de unión obtenidos.

**Tabla IV- 5.** Inmovilización de lacasa reducida de *P. sanguineus* en TSI-agarosa

| Carga enzimática aplicada (UE/g gel escurrido) | Actividad perdida (%) <sup>a</sup> |         | Actividad inmovilizada            |                                       | Eficiencia de unión E <sub>Red</sub> (%) <sup>c</sup> |
|--|------------------------------------|---------|-----------------------------------|---------------------------------------|---|
|  | E <sub>Red</sub>                   | Control | E <sub>Red</sub> (%) <sup>b</sup> | E <sub>Red</sub> (UE/g gel escurrido) |   |
| 4.5  | 39                                 | 25      | 21                                | 0.9                                   | 35  |
| 1.5  | 14                                 | 47      | 21                                | 0.3                                   | 58  |

E<sub>Red</sub> : enzima reducida

**a** (UE aplicada – UE expresada en gel – UE recuperada en sobrenadante y lavados)

**b** (UE expresada en gel) x 100/ (UE aplicada)

**c** (UE expresada en gel) x 100/ (UE aplicada – UE recuperada en sobrenadante y lavados)

Por otro lado, se verificó la reversibilidad de la unión de la enzima al gel TSI en el derivado obtenido con la menor carga enzimática, recuperándose en el sobrenadante el 84 % de la actividad expresada en el gel.

### 3.4.3 Introducción de grupos tiol *de novo* e inmovilización de lacasa de *P. sanguineus*

Dado que la lacasa de *P. sanguineus* contiene residuos de lisina se realizó la tiolación con SPDP como se describió para la lacasa de *T. villosa*. Sin embargo, no fue posible inmovilizar la enzima de este hongo en TSI-agarosa tras su tiolación, en ninguna de las condiciones ensayadas. La pérdida de actividad en este proceso fue inferior a 10 %.

Se pudo comprobar además que no ocurrió pérdida de actividad durante el proceso de inmovilización. Esto puede deberse a cambios estructurales en la proteína que hayan contribuido a su estabilización (sustitución de aminos por –SH), en comparación con lo observado para la enzima nativa (3.4.1) y reducida (3.4.2). Por otra parte, tampoco ocurrió adsorción inespecífica de la proteína al soporte utilizado, ya que se recuperó la totalidad de la actividad aplicada en sobrenadante y lavados.

### 3.5 Discusión

Las lacasas han sido inmovilizadas por numerosos métodos tales como entrapamiento, encapsulación, adsorción, entrecruzamiento, unión covalente, y sobre diversos soportes como por ejemplo Eupergit C, Granocel, carbón activado, bagazo, fibra de coco, perlas de alginato, quitosano y nanopartículas magnéticas entre otros [174–182,53,183–189], en muchos casos con rendimientos bajos de inmovilización [188–191]. Esta reducción de la actividad inmovilizada puede deberse a diversas razones, incluyendo el uso de pH elevado durante la etapa de acoplamiento, así como cambios en la conformación de la enzima generados por uniones multi-puntuales al soporte a través de los grupos amino superficiales de la proteína. Entre los diferentes métodos, la inmovilización covalente suele seleccionarse para aumentar la estabilidad tanto térmica como operativa [189,192]. Los principales inconvenientes asociados a la inmovilización covalente (irreversible) pueden deberse a cambios en la conformación de la lacasa con pérdida de actividad y a la imposibilidad de reutilizar el soporte después de que la enzima inmovilizada se vuelva inactiva [193]. Así, la inmovilización covalente reversible de lacasas resulta una alternativa para superar estos problemas, reduciendo la tensión de la estructura nativa inmovilizada, ya que sólo participan los grupos SH expuestos y permitiendo la reutilización del soporte.

La inmovilización covalente reversible no ha sido utilizada previamente para lacasas. En el caso de la lacasa de *Trametes villosa*, el alto rendimiento de inmovilización alcanzado en TSI-agarosa (95 %) podría explicarse esencialmente por el uso de condiciones de pH suaves (los grupos tiol son nucleófilos muy reactivos incluso a pH neutro) y por el tipo de unión de la proteína al gel basada en la cantidad de grupos tiol. El número de los mismos es reducido en el caso de lacasas nativas. Como se mencionó antes, una alternativa para superar este inconveniente es tiolar la enzima. Si bien esta

técnica implica utilizar grupos amino de la superficie al igual que en otros métodos covalentes, el número de dichos grupos involucrados en el proceso se puede regular por las condiciones de tiolación. En relación a esto, una importante ventaja del método covalente reversible reside en que no es imprescindible que la proteína presente grupos tiol en su estructura nativa, por lo cual es aplicable a cualquier proteína. La posibilidad de regular los grupos tiol generados en la proteína permite optimizar el rendimiento de inmovilización. Así, fue posible incrementar el rendimiento a más de un 90 % para la lacasa de *T. villosa* tiolada.

El aumento de actividad expresada observado para cargas bajas podría sugerir que la inmovilización ocurre por un aumento de interacciones con el soporte, lo que podría estabilizar la estructura proteica exponiendo el sitio activo. Sin embargo, para cargas elevadas, habría menos interacción entre las moléculas de enzima y los grupos reactivos del soporte, por lo cual la misma sería libre de adoptar una conformación que oculte su sitio activo.

La inmovilización fue realizada en presencia de NaCl, en base a reportes previos para este método. En el trabajo de Viera *et al.* (2012) se comprobó que la adición de NaCl aumentó el rendimiento de inmovilización para la enzima ciclodextrina-glucanotransferasa [194]. Esto podría explicarse por la neutralización de cargas en la superficie y/o dentro de la proteína, así como de las que se pueden generar en el soporte por los grupos ácido sulfénico (ver Cap. I, fig. I-1). Dicha neutralización podría mejorar la interacción proteína-soporte, ya sea consiguiendo una mejor conformación de la proteína o mediante la disminución de repulsiones entre proteína y soporte. El pH de inmovilización (7.5) fue seleccionado en base al pKa de los grupos tiol, la estabilidad de los grupos tiolsulfinato [195] y la estabilidad de la lacasa de *T. villosa*.

En resumen, las condiciones optimizadas para la inmovilización covalente reversible de lacasa de *Trametes villosa* sobre TSI-agarosa fueron: carga baja de enzima tiolada (3 UE por gramo de gel escurrido) en fosfato 0.1 M pH 7.5 y NaCl 0.15 M, durante 16 h, a 22 °C.

Las propiedades del biocatalizador insoluble resultante, tales como la estabilidad térmica y estabilidad frente al pH así como la elevada capacidad de decoloración de un colorante antraquinónico y la posibilidad de ser reutilizado en este proceso, hacen del

derivado una herramienta muy prometedora para ser aplicada en la reducción de la contaminación causada por efluentes que contienen colorantes sintéticos.

En cuanto a la lacasa de *Pycnoporus sanguineus* la enzima nativa no pudo ser inmovilizada en TSI-agarosa, confirmando que los residuos cisteína forman parte de enlaces disulfuro o se encuentran en el interior de la estructura proteica. Por otro lado, si bien se logró la inmovilización de la enzima reducida, tanto el rendimiento como la eficiencia de unión fueron bajos, lo que indica que la enzima se pudo haber inmovilizado en una conformación de menor actividad. Por último, no fue posible inmovilizar la enzima mediante su tiolación con SPDP.

Dado que no fue posible realizar el título de grupos -SH, probablemente debido a una concentración insuficiente de proteínas, no se puede precisar si la causa de este resultado está relacionada con el proceso de tiolación o con el de inmovilización de la enzima tiolada. Por lo tanto, es posible que la tiolación no fuera efectiva para inmovilizar la enzima debido a que los grupos tiol introducidos quedaron inaccesibles al soporte.

En base a los resultados presentados en el Capítulo III, una alternativa para la inmovilización de esta lacasa podría ser su adsorción en DEAE-sepharose®. La lacasa de *P. sanguineus* se adsorbió casi en su totalidad a dicho intercambiador (> 95 %) recuperándose en la elución por aumento de fuerza iónica 63 % de la actividad adsorbida. Sin embargo, es importante destacar que el derivado insoluble resultante no tendría las ventajas descritas para la inmovilización covalente reversible.

# **CAPÍTULO V**

Degradación de colorantes  
sintéticos mediante lacasas  
fúngicas solubles e  
inmovilizadas



## 1. OBJETIVO

- Optimización de la degradación enzimática de colorantes sintéticos utilizados en la industria textil utilizando lacasas de los basidiomicetes *Trametes villosa* y *Pycnoporus sanguineus*.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Cuantificación de la degradación de colorantes sintéticos

Se registró el espectro de absorción en el rango visible de las soluciones de colorantes antes y después del tratamiento enzimático.

Se calculó el área bajo la curva en el pico de máxima absorbancia y se expresó el grado de decoloración como porcentaje a partir de la relación entre el área final y la inicial. En la **tabla V-1** se informa el valor de longitud de onda de máxima absorción característico de los colorantes utilizados en los distintos ensayos. La concentración de colorante utilizada en las reacciones de decoloración fue seleccionada de forma que la absorbancia máxima en el espectro visible no superara 1.5 unidades.

### 2.2 Degradación de colorantes sintéticos con lacasa de *Pycnoporus sanguineus*

Se realizaron ensayos de decoloración con la lacasa obtenida en el cultivo en fase semisólida de *Pycnoporus sanguineus*, utilizando el sobrenadante del medio de cultivo (ver Capítulo II sección 3.3.1). Los colorantes utilizados fueron Acid Red 88 (36.0 mg/L), Reactive Black 5 (66.7 mg/L) y Lanaset Grey G (100 mg/L) (**tabla V-1**) y los mediadores redox: hidroxibenzotriazol (HBT), ácido violúrico (AVi), acetovainillona (AcV) y metil siringato (MS) (**fig. V-1**).

Las reacciones se realizaron en cubetas espectrofotométricas colocando solución acuosa del colorante, solución de enzima (1000 UE/L o 500 UE/L), mediador redox (1.0, 0.5 o 0.1 mM) y tampón acetato 0.1 M pH 4.8. Al mismo tiempo se realizaron ensayos sin mediador redox con 1000 UE/L de enzima. La mezcla reactiva (1.5 mL) fue incubada sin agitación a 22 °C.

La reacción de decoloración de AR88 además fue realizada con concentraciones variables de lacasa entre 50 y 1000 UE/L, utilizando la concentración 1.0 mM del mediador MS, manteniendo las demás condiciones incambiadas.

Se tomaron muestras a distinto tiempo (0, 5 minutos, 2 h y 24 h), se centrifugaron (8000×g, 5 min) y se realizó la lectura del espectro de absorción en la región visible para calcular porcentaje de decoloración como se describió en 2.1.

Los ensayos fueron realizados por duplicado y se verificó que los colorantes no reaccionaran con los mediadores redox en presencia de enzima desnaturalizada por calor.

### 2.3 Degradación de colorantes sintéticos con lacasa de *Trametes villosa*

#### 2.3.1. Degradación de un colorante antraquinónico con lacasa inmovilizada de *Trametes villosa*

La reacción de decoloración fue llevada a cabo con el derivado enzimático desarrollado en base a la lacasa de *Trametes villosa* inmovilizada en tiolsulfonato-agarosa como se describió en el Capítulo IV. Se incubaron alícuotas del derivado (100 UE/L) con solución del colorante Remazol Brilliant Blue R (130 mg/L) bajo agitación magnética a 22 °C en tampón acetato de sodio 0.1 M pH 4.8.

Se tomaron muestras de la mezcla reactiva a diferentes tiempos y se detuvo la reacción a las 123 h separando el derivado por filtración. Se registró el espectro en el rango visible de cada muestra y se calculó el porcentaje de decoloración según lo descrito en 2.1. Se realizó un control con agarosa para sustraer el efecto de adsorción del colorante a la matriz.

Se realizó el análisis de los productos de degradación de RBBR por HPLC analítico. Se empleó un HPLC Shimadzu Prominence LC 20AT con detector de arreglo de diodos (DAD) y una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies) de 250 mm, 4.6 mm d.i y tamaño de partícula de 5 µm, con una pre-columna Ultra-C18 de 10 mm y 4 mm de diámetro interno. La velocidad de flujo de fase móvil utilizada fue 0.5 mL/min, la temperatura del horno de la columna 25 °C y el volumen de inyección 20 µL.

El programa de elución utilizado, con ácido acético 50 mM pH 4.0 como solvente-A y acetonitrilo como solvente-B, fue: 0 – 0.5 min, 20 % B; 0.5 – 15 min, 20 – 70 % B; 15 – 20 min, 70 – 20 % B; 20 – 21 min, 20 % B.

#### 2.3.2 Degradación de colorantes azoicos con lacasa de *Trametes villosa*

Los colorantes utilizados en este estudio fueron el monoazoico Acid Red 88 y el diazoico Acid Black 172, (**tabla V-1**).

#### 2.3.2.1 Selección del sistema lacasa-mediador para la decoloración de AR88 y AB172

Se realizó la reacción de decoloración de ambos colorantes azoicos (100 mg/L) con la enzima de *T. villosa* purificada en forma soluble (100 UE/L), en ausencia y presencia de cuatro mediadores redox (1.0 mM): ácido violúrico, vainillina, acetosiringona y acetovainillona (**fig. V-1**). El mediador MS no fue utilizado debido a su costo elevado.

La reacción se llevó a cabo en acetato de sodio 0.1 M pH 4.8, con agitación durante 24 horas a 22 °C. Se calculó el porcentaje de decoloración para cada muestra al finalizar la reacción como se describió en 2.1.

Previamente se verificó que los colorantes no reaccionaran con los mediadores redox en ausencia de enzima.

#### 2.3.2.2. Decoloración de AR88 y AB172 con el derivado lacasa-TSI-agarosa

Se incubaron alícuotas del derivado enzimático (100.0 U/L) bajo agitación durante 24 horas con una solución de cada colorante (100 mg/L) a temperatura ambiente (22°C), en acetato de sodio 0.1 M pH 4.8, en un volumen final de 2.0 mL de mezcla reactiva.

Las reacciones se realizaron en presencia y ausencia de ácido violúrico y vainillina, en una concentración final 1.0 mM de cada mediador redox.

Se cuantificó la decoloración en las soluciones como se describió en 2.1, separando previamente el derivado por filtración.

Se realizaron controles para evaluar el efecto de adsorción del colorante a la matriz sustituyendo el derivado por agarosa, TSI-agarosa y TSI-agarosa bloqueado mediante tratamiento con glutatión.

#### 2.3.2.3. Estabilidad operacional del derivado TSI-lacasa de *Trametes villosa* en la degradación de colorantes azoicos

Se realizaron 3 decoloraciones de AR88 y de AB172 en presencia de mediador redox como se describió en 2.3.2.2. Para ello al derivado separado de la reacción anterior por filtración se le agregó nueva solución de colorante y mediador redox.

#### 2.3.2.4 Estudio del efecto de la concentración de mediador redox en la reacción de decoloración con enzima inmovilizada de *T. villosa*

Se realizó la reacción de decoloración de AB172 y AR88 utilizando distintas concentraciones de los mediadores ácido violúrico y vainillina (1.0 mM a 0.1 mM). Las reacciones se llevaron a cabo como se describió en 2.3.2.2. En el caso de AB172 se registró la decoloración a dos tiempos de reacción (24 y 40 h).

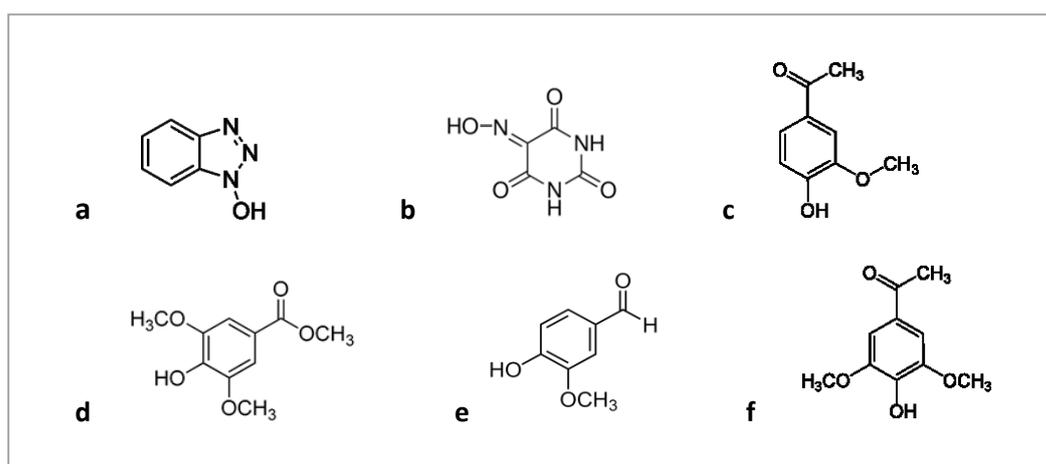
#### 2.3.2.5. Análisis de las reacciones de decoloración de AR88 y AB172 por HPLC

Para el estudio de los productos de decoloración de ambos colorantes por el sistema lacasa-TSI-mediador se empleó el sistema HPLC-DAD y columna descritos en 2.3.1.

La fase móvil utilizada fue acetato de amonio 30 mM, pH 4.6 como solvente-A y metanol como solvente-B. La velocidad de flujo de fase móvil utilizada fue 0.5 mL/min, la temperatura del horno de la columna 30 °C y el volumen de inyección 20 µL.

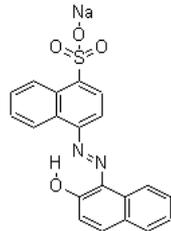
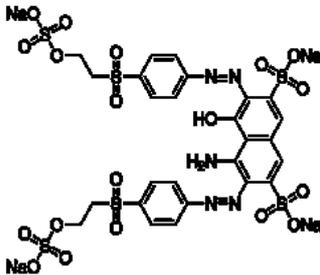
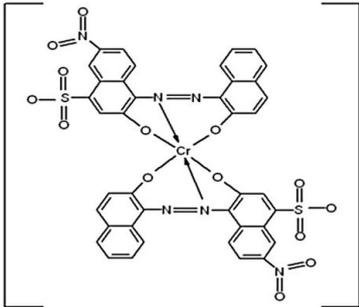
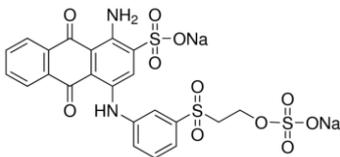
Los programas de elución utilizados fueron:

- 1) Para AR88 y Vai: 0 – 15 min, 70 - 90 % B.
- 2) Para Vai y productos de reacción de decoloración de AR88: 20 min, 60 % B.
- 3) Para AB172, AVi y la mezcla de productos de reacción: 0 – 15 min, 40 – 80 % B; 15 – 30 min, 80 % B.



**Figura V-1.** Mediadores redox utilizados en las reacciones de degradación de colorantes. Mediadores de origen sintético: **a.** hidroxibenzotriazol (HBT) **b.** ácido violúrico (AVi). Mediadores origen natural: **c.** acetovainillona (AcV) **d.** metil siringato (MS), **e.** vainillina (Vai), **f.** acetosiringona (AcS).

**Tabla V-1.** Colorantes utilizados en los distintos ensayos realizados.

| Nombre y número C.I. <sup>a</sup>                       | Procedencia             | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | Clase  | Estructura  |
|---|-------------------------|-----------------------------|--|---|
| <b>Acid Red 88</b><br>(AR88)<br>15620                   | Sigma-Aldrich<br>(USA)  | 504                         | Monoazo<br>aniónico                            |    |
| <b>Reactive Black 5</b><br>(RB5)<br>20505               | Sigma-Aldrich<br>(USA)  | 597                         | Diazo<br>aniónico                              |    |
| <b>Acid Black 172</b><br>(AB172)<br>15711:1             | Huntsman<br>(Argentina) | 572                         | Complejo<br>diazo-metálico<br>con cromo        |   |
| <b>Reactive Blue 19</b><br>(RBRR) <sup>b</sup><br>61200 | Sigma-Aldrich<br>(USA)  | 595                         | Antraquinónico                                 |  |
| <b>Lanaset Grey G</b><br>(LG)<br>-                      | Dyestar<br>(Portugal)   | 590                         | Mezcla de<br>complejos<br>órgano-<br>metálicos | El fabricante no lo especifica  |

a. CI = Colour Index

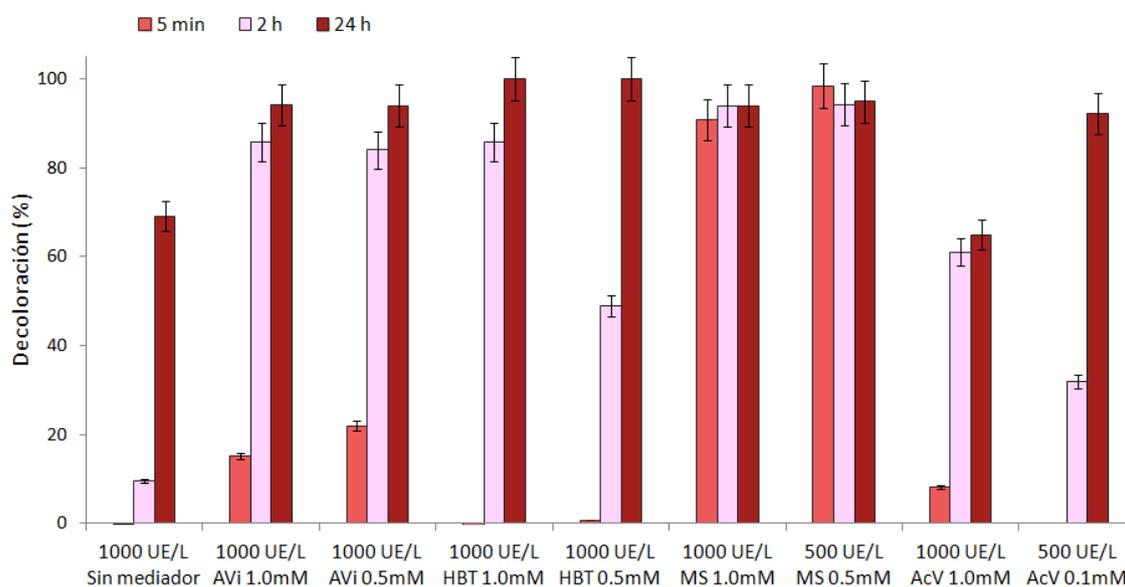
b. El nombre comercial es Remazol Brilliant Blue R (RBRR).

## 3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 3.1. Degradación de colorantes sintéticos con lacasa de *Pycnoporus sanguineus*

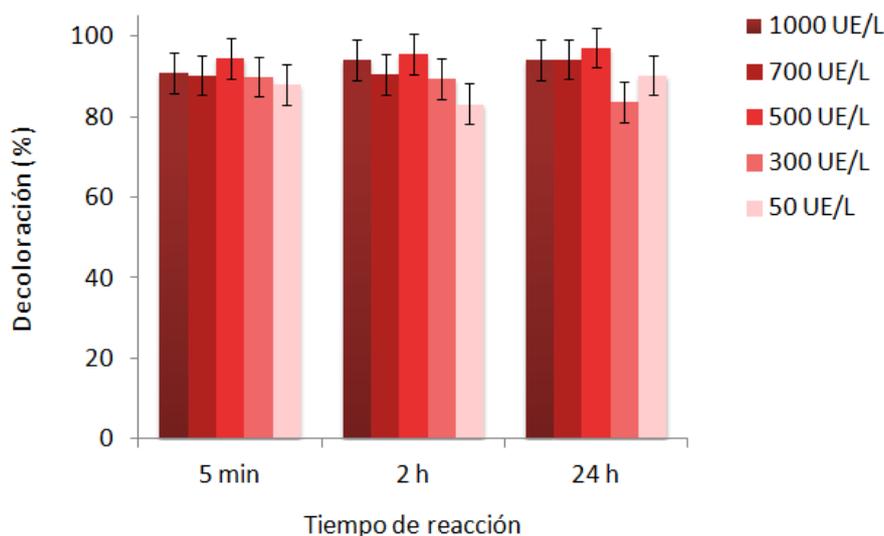
El sobrenadante del cultivo de *P. sanguineus* con actividad lacasa fue efectivo en la degradación del colorante AR88, alcanzando 70 % de decoloración en 24 h con 1000 UE/L sin el agregado de un mediador redox, lo cual concuerda con resultados obtenidos con lacasas de otros basidiomicetes [196,197] (**fig. V-2**).

Por otro lado, se observó un aumento importante en la velocidad de reacción por efecto de mediadores redox, superando además el valor máximo de decoloración alcanzado sin mediador a 24 h (**fig. V-2**). El aumento de velocidad fue especialmente significativo para metil siringato, alcanzando 91 % de decoloración en solo 5 minutos con 1000 UE/L y MS 1.0 mM. Además, la reducción a la mitad de la concentración de enzima así como de la del mediador no modificó el resultado observado.



**Figura V-2.** Estudio de la decoloración de AR88 con lacasa de *P. sanguineus* y distintos mediadores redox (1.0 y 0.5 mM). AVi: ácido violúrico, HBT: hidroxibenzotriazol, MS: metil siringato, AcV: acetovainillona. Se representa el promedio de dos medidas.

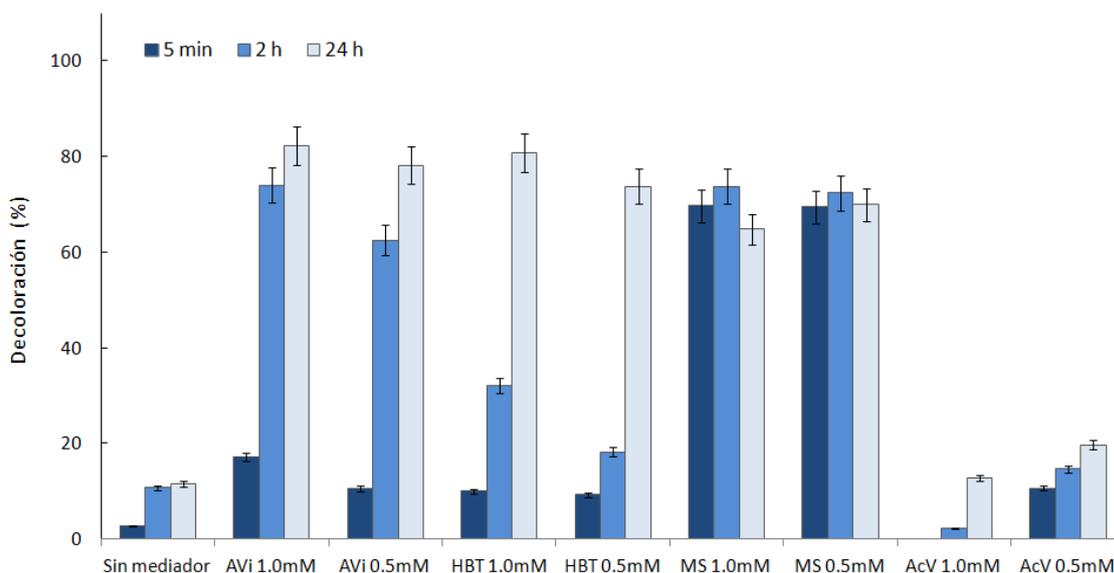
Por otro lado, la variación de concentración de enzima entre 1000 y 50 UE/L en el sistema lacasa-mediador con MS 1.0 mM no afectó la decoloración máxima de Acid Red 88 así como tampoco afectó la velocidad de reacción, observándose el mismo nivel de decoloración a los 5 minutos de reacción para las 5 concentraciones ensayadas (**fig. V-3**).



**Figura V-3.** Efecto de la concentración de lacasa de *P. sanguineus* en la decoloración de AR88 con MS (1.0 mM) como mediador. Se representa el promedio de dos medidas.

En el caso del colorante RB5 se alcanzó solo un 10 % de decoloración en 24 h de reacción sin el agregado de mediadores redox (**fig. V-4**). Sin embargo, a excepción de AcV, estos compuestos permitieron aumentar considerablemente el nivel de decoloración así como la velocidad de reacción. En el caso de metilsiringato en particular, de forma similar a lo observado para el colorante AR88, se alcanzó un elevado nivel de decoloración a los 5 minutos de reacción y el resultado tampoco se vio afectado por la disminución de la concentración de mediador a la mitad. Este colorante es uno de los más empleados en la industria textil, lo que explica la existencia de una gran cantidad de estudios sobre su degradación mediante diversos métodos. Entre los estudios de biodecoloración, son numerosos los basados en la degradación enzimática con lacasas [152,174,198–217]. Dicha degradación requirió en muchos casos el uso de sistemas lacasa-mediador como en este caso. La resistencia a la degradación puede deberse a un impedimento estérico para el contacto de los

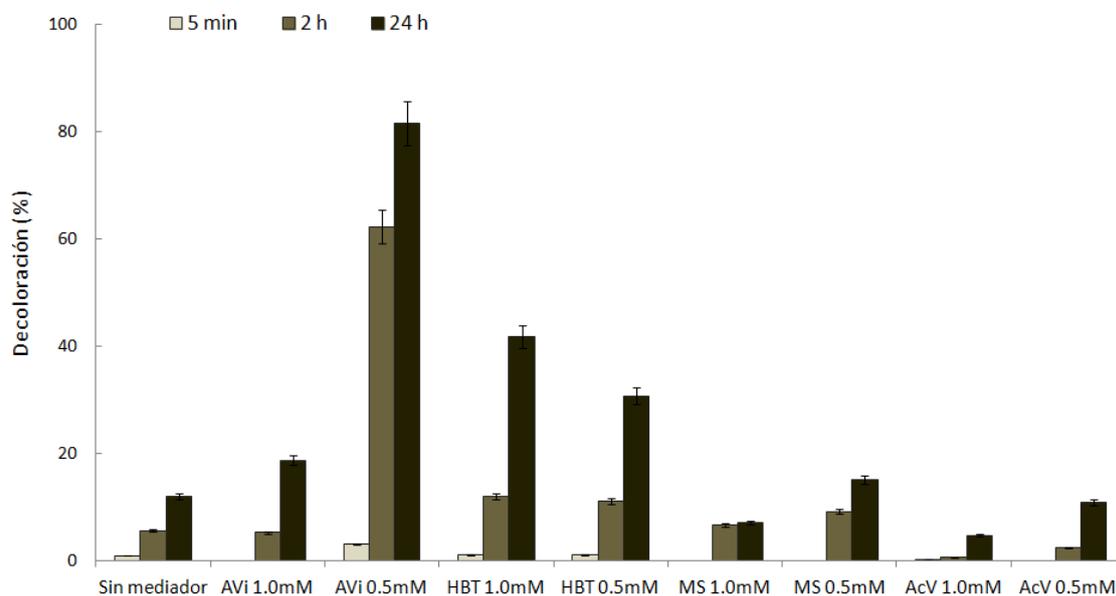
grupos –OH y –NH<sub>2</sub> presentes en la molécula del colorante con el sitio activo de la lacasa, ó al potencial redox elevado del colorante respecto al de la enzima [205,214,216]. El mediador redox empleado con mayor frecuencia ha sido el HBT [152,174,198,203,204,209–213]. Sin embargo, en algunos trabajos como el de Wang *et al.* (2011) [205] y el de Bibi y Bhatti (2012) [206] este mediador no tuvo efecto y se obtuvo más de 90 % de decoloración en 30 minutos, con los mediadores naturales acetosiringona y siringaldehído, respectivamente. En el presente trabajo, si bien la decoloración obtenida en 24 h fue superior con AVi y HBT, la velocidad de reacción fue mayor con MS, un mediador de origen natural, alcanzándose cerca de 70 % de decoloración en 5 minutos.



**Figura V-4.** Estudio de la decoloración de RB5 con lacasa de *P. sanguineus* (1000 UE/L) y distintos mediadores redox (1.0 y 0.5 mM). AVi: ácido violúrico, HBT: hidroxibenzotriazol, MS: metil siringato, AcV: acetovainillona. Se representa el promedio de dos medidas.

Lanaset Grey G fue de los tres colorantes estudiados el más recalcitrante a la decoloración con lacasa de *P. sanguineus* y con los sistemas lacasa-mediador empleados. Solamente con ácido violúrico se superó el 50 % de decoloración, alcanzando 82 % a las 24 horas para la concentración 0.5 mM, mientras que con el doble de concentración el efecto del mediador fue considerablemente menor. Ocurrió lo opuesto para el mediador HBT, con el cual se obtuvo 42 % de decoloración a las 24 h

en concentración 1.0 mM pero disminuyó a 30 % con la concentración 0.5 mM (fig. V-5).



**Figura V-5.** Estudio de la decoloración de LG con lacasa de *P. sanguineus* (1000 UE/L) y distintos mediadores redox (1.0 y 0.5 mM). AVi: ácido violúrico, HBT: hidroxibenzotriazol, MS: metil siringato, AcV: acetovainillona. Se representa el promedio de dos medidas.

Para este colorante la mayor parte de los estudios de biodecoloración publicados utilizan hongos en lugar de enzimas aisladas [218–221]. En los que se empleó lacasas producidas por distintos hongos se observó como aquí una mayor resistencia a la degradación y la necesidad de emplear el sistema lacasa-mediador. Por ejemplo, se alcanzó 50 % de decoloración de una solución de LG (75 mg/L) con la lacasa cruda de *Cerrena unicolor* sin mediador en 20 h [222]; 30 % para una solución 100 mg/L con lacasa soluble y 50 % con la inmovilizada del hongo *Corioloopsis gallica* sin mediador redox en 24 h [212]; 30 % de una solución 150 mg/L con la lacasa de *Trametes versicolor* en 24 h sin mediador [218]; mientras que con la lacasa de *Trametes hirsuta* no se obtuvo decoloración de LG (75 mg/L) [222]. Por otro lado, en presencia del mediador redox HBT (1.0 mM) fue posible obtener 86 % de decoloración de la solución 100 mg/L de LG en 24 h con la lacasa de *C. gallica* inmovilizada en esferas de alginato de calcio [212].

### 3.1.1 Discusión

El género *Pycnoporus* es conocido por expresar lacasas de alto potencial redox y baja especificidad las cuales son capaces de degradar colorantes sintéticos recalcitrantes de estructura variada [137]. Es así que se ha reportado la aplicación de lacasas aisladas de *Pycnoporus sanguineus* en algunos procesos de decoloración [121,147,152,223–226].

En este trabajo se estudió el efecto de distintos sistemas-lacasa mediador, con mediadores de tipo natural y sintético y se probaron distintas concentraciones de enzima y mediador con el objetivo de encontrar las menores concentraciones que permitan la degradación de cada colorante en un tiempo razonable. Esto es importante considerando la posible reducción de costos del proceso, además de que los compuestos utilizados como mediadores pueden presentar toxicidad o generar especies tóxicas, y dicha toxicidad dependerá de la concentración de los mismos en la solución resultante luego del tratamiento enzimático. En este estudio, para dos de los colorantes se obtuvo la mayor velocidad de reacción con el mediador de origen natural metil siringato. En presencia de MS a temperatura ambiente fue posible decolorar AR88 90 % y RB5 80 % a los 5 minutos. Esto se podría explicar por la estructura del compuesto fenólico ya que MS posee en posición *para* un grupo ester con baja capacidad para atraer electrones, lo cual aumentaría la vida media de la forma oxidada (radical fenoxi) y con ello la capacidad para promover las oxidaciones radicalarias de los colorantes [41].

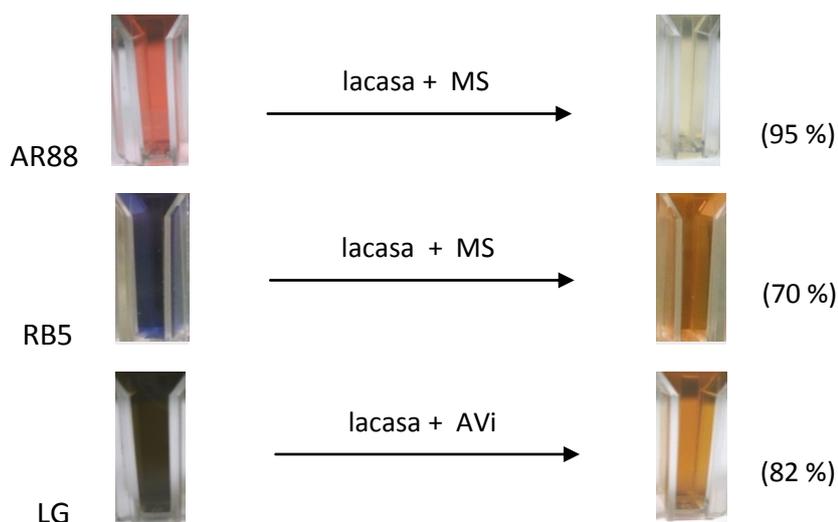
Por otro lado, en relación a las concentraciones de mediador y enzima utilizadas, se observó que la reducción de la concentración de mediador en muchos casos no afectó la decoloración obtenida o incluso mejoró el resultado. Esto se observó por ejemplo para Reactive Black 5 con AcV o para Lanaset Grey G con AVi.

La eficiencia menor en la decoloración para concentraciones crecientes de mediador redox ha sido descrita por ejemplo para hidroxibenzotriazol y ácido violúrico y se ha relacionado con la generación de especies reactivas en la oxidación del mediador, las cuales actúan inhibiendo la enzima [34,42,227]. Si bien esto se ha atribuido exclusivamente a los mediadores artificiales [228], en el trabajo de Camarero *et al.* (2005) se observó el mismo resultado en la decoloración de RB5 con acetosiringona [35]. Por otro lado, aunque todos los mediadores utilizados en dicho trabajo fueron de

tipo natural, se pudo observar distintos comportamientos. Por ejemplo, en el caso de ácido p-cumárico se obtuvo una relación directamente proporcional de la decoloración con la concentración del mismo, mientras que en otros casos se alcanzó una meseta. Por lo tanto, se puede concluir que no es posible predecir la concentración de mediador (ya sea de tipo natural o artificial) que resultará eficiente en una reacción de decoloración con lacasa.

En cuanto a la actividad lacasa utilizada, se comprobó con el colorante AR88 que el aumento de la misma no está asociado necesariamente a un aumento en la decoloración obtenida. Por lo tanto, estas observaciones indican que para cada reacción en particular se debería optimizar las concentraciones empleadas. Resultarían apropiados para este fin los diseños experimentales de superficie de respuesta, tal como se ha realizado en otros estudios reportados [203,209].

➤ En este estudio, los 3 colorantes fueron degradados con el sobrenadante del cultivo de *P. sanguineus* que contenía lacasa como única enzima del sistema ligninolítico. La enzima fue capaz de degradar el monoazo AR88 sin requerir de la adición de un mediador redox (si bien en presencia de MS la decoloración fue mayor). Para los otros dos colorantes fue necesario el sistema lacasa-mediador, en concordancia con un aumento en la complejidad de sus estructuras químicas (**fig. V-6**).



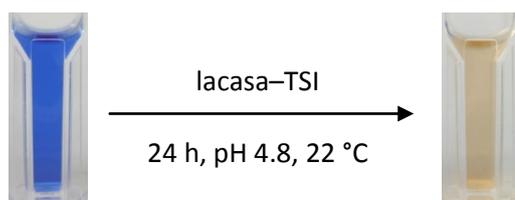
**Figura V-6.** Decoloración de Acid Red 88, Reactive Black 5 y Lanaset Grey G con lacasa no purificada de *P. sanguineus* y mediadores redox (0.5 mM) en 24 h a pH 4.8 y 22 °C. Se indica el porcentaje de decoloración obtenido en cada reacción.

### 3.2 Degradación de colorantes sintéticos con lacasa de *Trametes villosa*

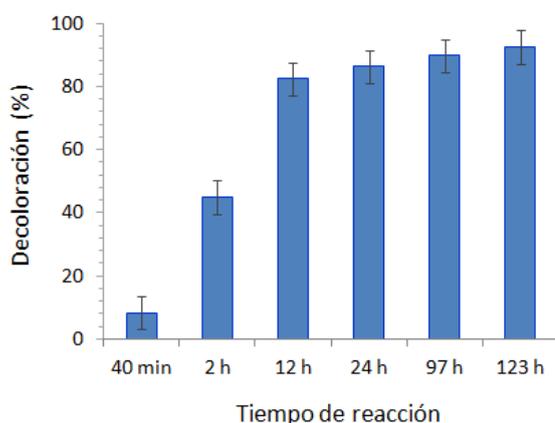
#### 3.2.1 Degradación de un colorante antraquinónico con lacasa inmovilizada de *Trametes villosa*

Se pudo probar la capacidad de la lacasa de *T. villosa* inmovilizada en TSI para degradar el colorante RBBR. El tratamiento enzimático modificó el color de la solución de azul a naranja claro (**fig. V-7**).

Como se puede observar en la **figura V-8**, el proceso de decoloración fue casi completo luego de 24 horas de reacción. Se alcanzó un porcentaje de decoloración del orden de 90 % en este tiempo. Dicho resultado indica que el biocatalizador insoluble no presentó problemas de difusión para este sustrato.

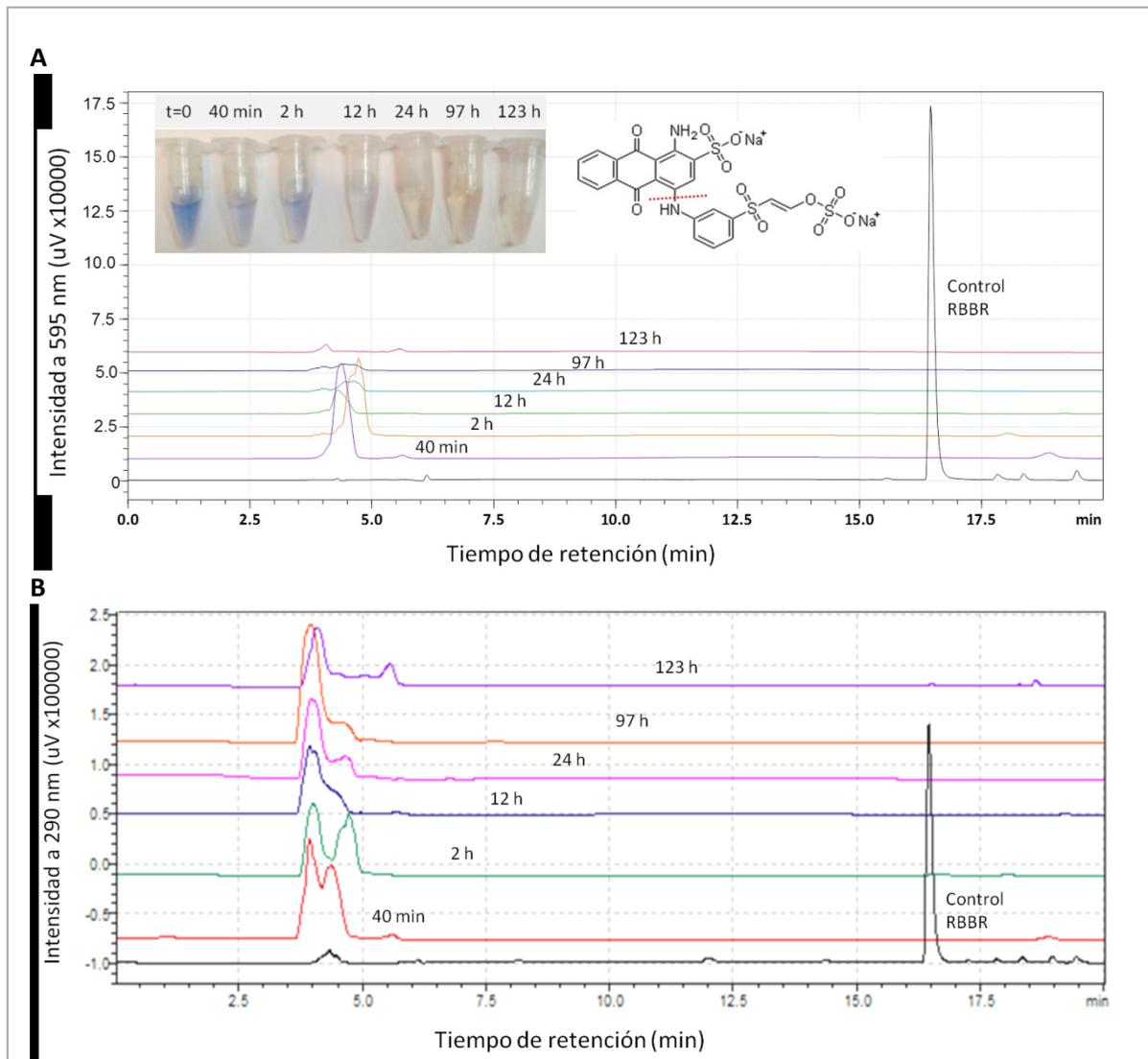


**Figura V-7.** Reacción de decoloración de RBBR con lacasa de *T. villosa* parcialmente purificada inmovilizada en TSI-agarosa.



**Figura V-8.** Cinética de decoloración de RBBR con el derivado lacasa-TSI.

En la **figura V-9 A** se muestran los cromatogramas de HPLC de las muestras correspondientes a distintos tiempos de reacción registrados a 595 nm, donde absorbe el cromóforo antraquinónico. Se pudo observar que la estructura del colorante fue modificada en un tiempo menor o igual a 40 minutos ya que desapareció el pico con tiempo de retención ( $t_R$ ) 16.5 min, mientras que apareció otro con menor  $t_R$  a 4.5 min. Sin embargo, la estructura del cromóforo antraquinónico se mantuvo en los productos de reacción hasta las 12 horas inclusive.



**Figura V-9.** Análisis de la reacción de decoloración de RBBR por HPLC-DAD. **A.** Cromatogramas de muestras tomadas a distinto tiempo de reacción registrados a 595 nm; fotografía de las soluciones y ruptura inicial propuesta para la molécula de colorante [229,230]. **B.** Los mismos cromatogramas registrados a 290 nm.

Este resultado coincide con el color azul que presentaron las alícuotas de la mezcla de reacción, lo que se puede ver en la fotografía de la **figura V-9 A**. Además, concuerda con lo reportado en bibliografía, donde se propone la ruptura de la molécula originando dos productos (como se indica en **fig. V-9 A**), uno de los cuales conserva dicho cromóforo [229,230]. Los productos formados hasta las 123 h de reacción se pudieron observar al registrar los mismos cromatogramas a 290 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  del colorante en región UV), indicando la presencia de enlaces conjugados en los mismos. Dichos compuestos eluyeron sin ser resueltos en las condiciones de corrida utilizadas, con tiempos de retención de entre 3 y 5 minutos (**fig. V-9 B**).

#### 3.2.1.1 Discusión

Este colorante sintético pertenece a la segunda clase más importante de colorantes textiles [88]. A nivel industrial se utiliza como material de partida en la producción de colorantes poliméricos y como colorante textil para el teñido de fibras de celulosa como el algodón. Dado que se fija a las fibras a través de enlaces covalentes se lo clasifica como colorante reactivo. Dichos enlaces se forman entre el grupo vinilo activado del colorante y los grupos OH de las fibras de celulosa [231].

Al igual que el colorante diazoico RB5, RBBR es uno de los más utilizados en estudios de biodecoloración con lacasas en los cuales es empleado como modelo de colorante antraquinónico [152,153,204,207,208,212–214,222,227,229,230,232–247].

En general, este tipo de colorante presenta menor resistencia a la oxidación enzimática por lacasas que los colorantes azoicos [204]. En particular, el RBBR ha sido efectivamente decolorado sin necesidad de mediadores redox por lacasas de distintos hongos como por ejemplo *Trametes versicolor* [207,214,247], *Coriolopsis gallica* [212], *Echinodontium taxodii* [243], *Cerrena sp.* [245] o *Pycnoporus sanguineus* [152,223] y también en presencia de mediadores redox como en el caso de la lacasa de *Ganoderma lucidum* [235] o de *Trametes trogii* [246]. El colorante es utilizado en algunos casos como sustrato para identificar hongos productores de lacasa, dada la relativa facilidad con la que es oxidado por la enzima [248]. Al igual que *Pycnoporus sp.*, el género *Trametes* se caracteriza por expresar lacasas de elevado potencial redox [20]. Por otro lado, se reportó la decoloración de RBBR (90 % en 16 h) con una lacasa

de *Trametes villosa* sin mediadores redox [198]. Por lo tanto, era de esperar que la enzima producida por la cepa nativa de *T. villosa* utilizada en este estudio fuera capaz de degradar el colorante tal como fue observado.

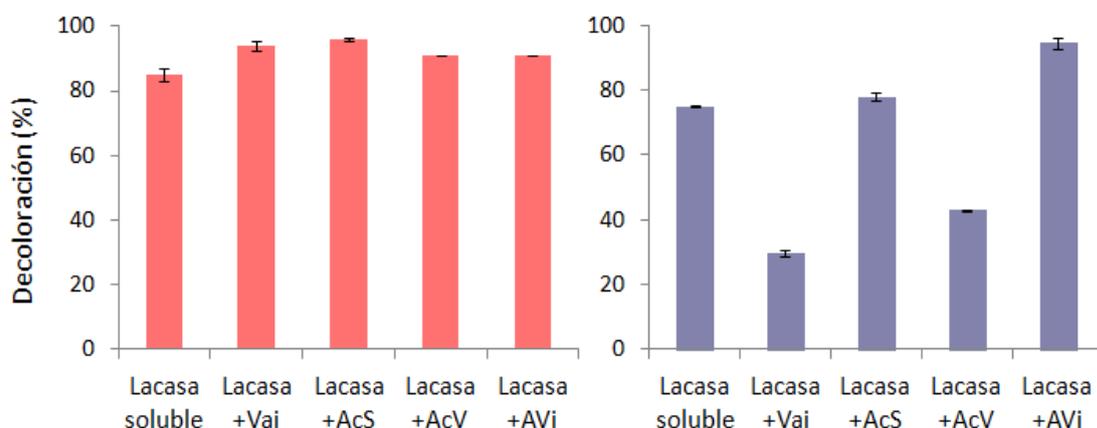
El uso de RBRR en este ensayo permitió comprobar la eficacia del biocatalizador en fase sólida obtenido en base a la lacasa inmovilizada en TSI-agarosa en la degradación de un colorante antraquinónico. Además, como fue informado en el Capítulo IV, se demostró que el derivado fue eficiente en 4 ciclos de uso consecutivos, lo cual por otro lado indica su potencial para ser aplicado en procesos continuos.

### 3.2.2 Degradación de colorantes azoicos con lacasa de *Trametes villosa*

#### 3.2.2.1 Decoloración de AB172 y AR88 con lacasa soluble de *Trametes villosa* y mediadores redox

El objetivo de este experimento fue estudiar el efecto de distintos mediadores redox en las reacciones de decoloración con lacasa de *Trametes villosa* y seleccionar el más adecuado para proseguir con el estudio.

Para AR88 se obtuvo resultados similares con los 4 mediadores utilizados (**fig. V-10**), superando en 10 % la decoloración obtenida con el control de lacasa sin mediador. Se seleccionó vainillina entre los mediadores “naturales” (Vai, AcS y AcV) considerando su menor costo.



**Figura V-10.** Decoloración de Acid Red 88 (*izq*) y Acid Black 172 (*der.*) con lacasa de *T. villosa* con mediadores redox (t = 24 h). Vai: vainillina, AcS: acetosiringona, AcV: acetovainillona, AVi; ácido violúrico.

En las reacciones de AB172 se observaron resultados muy variables, obteniéndose el mayor porcentaje de decoloración (95 %) con ácido violúrico, por lo cual fue el mediador seleccionado para este colorante.

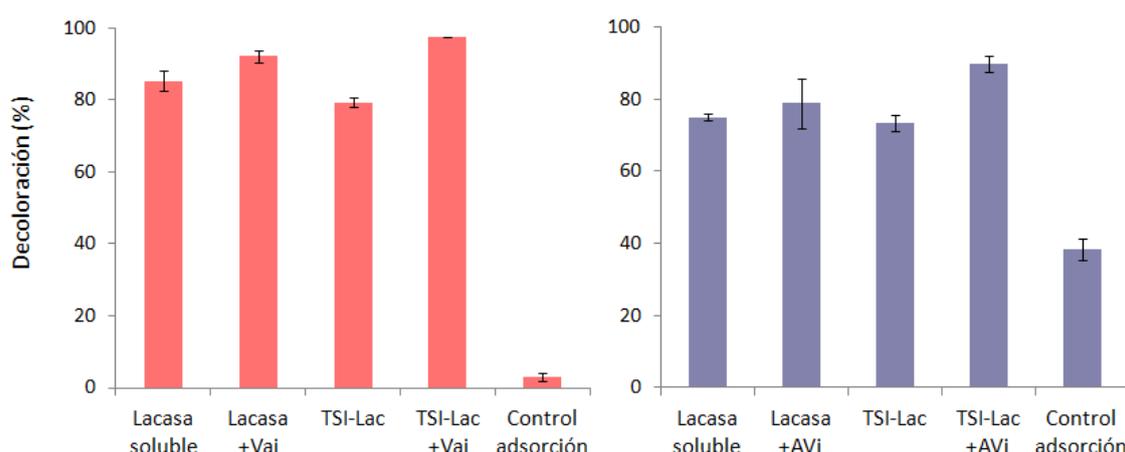
### 3.2.2.2 Decoloración de AR88 y AB172 con el derivado lacasa-TSI-agarosa

El derivado insoluble presentó una gran capacidad para decolorar los colorantes azoicos AR88 y AB172 en presencia y ausencia del mediador redox correspondiente (**fig. V-11 y 12**).

Como se puede observar en la **figura V-11**, AR88 fue decolorado por el biocatalizador insoluble tras 24 horas de reacción, y el grado de decoloración aumentó en presencia del mediador redox, alcanzando porcentajes de decoloración del orden del 80 y 97 %, respectivamente.

A diferencia de AB172, no se observó adsorción de AR88 a ninguna de las matrices utilizadas como control. Es importante aclarar que no se observaron diferencias entre los controles de adsorción realizados con agarosa, TSI-agarosa y TSI-agarosa bloqueado con glutatión para ninguno de los colorantes.

Los mejores resultados de decoloración para ambos colorantes fueron obtenidos con la lacasa inmovilizada y el mediador redox correspondiente, alcanzando 90 % para AB172 y 97 % para AR88 (**fig. V-11**).

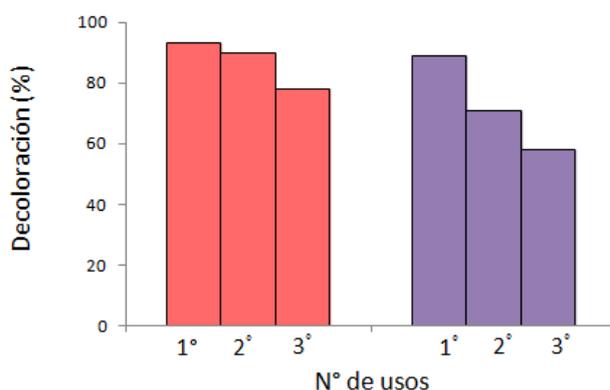


**Figura V-11.** Decoloración de Acid Red 88 y Acid Black 172 (100 ppm) con lacasa de *Trametes villosa* soluble e inmovilizada (100 UE/L), sin o con mediador redox (1.0 mM), y control de adsorción en el soporte utilizado para la inmovilización (t = 24 h).



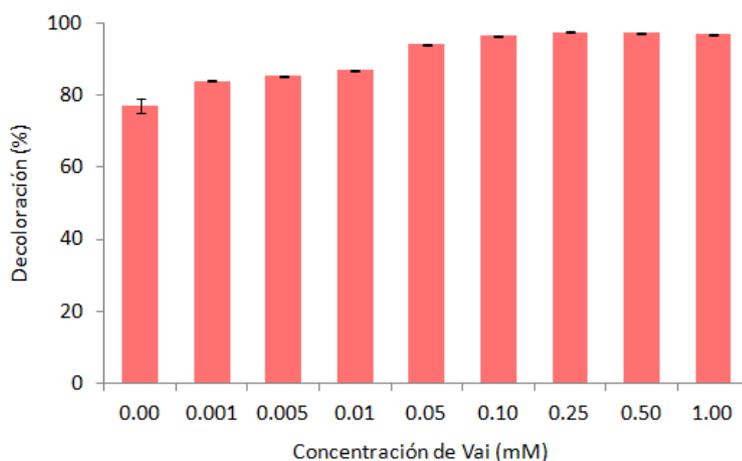
**Figura V-12.** Reacciones de decoloración ( $t = 24$  h) de AR88 (**A1**) y AB172 (**B1**). **A2** de izquierda a derecha: control de adsorción; decoloración con Lacasa-TSI-agarosa y decoloración con lacasa-TSI-agarosa + Vai. **B2** de izquierda a derecha: control de adsorción; decoloración con Lacasa-TSI-agarosa; decoloración con Lacasa-TSI-agarosa + AVi.

En el estudio de estabilidad operacional del biocatalizador insoluble se observó que la capacidad de decoloración se redujo gradualmente para los dos colorantes en los 3 usos consecutivos realizados (**fig. V-13**).



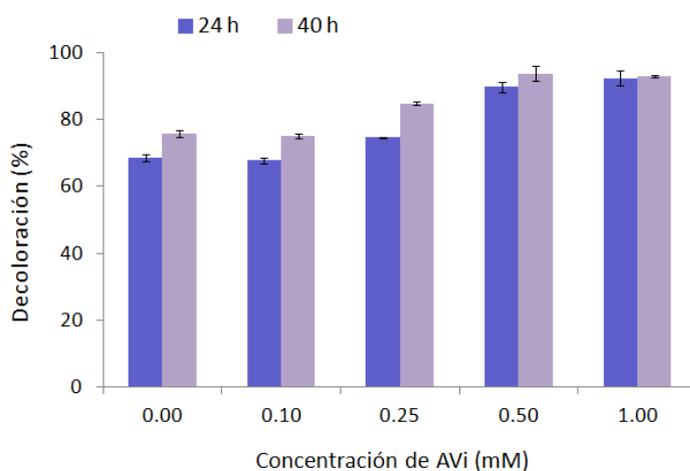
**Figura V-13.** Reutilización del derivado lacasa-TSI-agarosa en la decoloración de AR88 con Vai 1.0 mM (*izq.*) y AB172 con AVi 1.0 mM (*der.*).

No se observó un efecto del aumento de concentración de mediador redox en la decoloración de AR88 por encima de 0.1 mM, por lo que se puede utilizar esta concentración de vainillina, para reducir el costo relacionado a dicho reactivo y la potencial toxicidad asociada al mismo (**fig. V-14 A**).

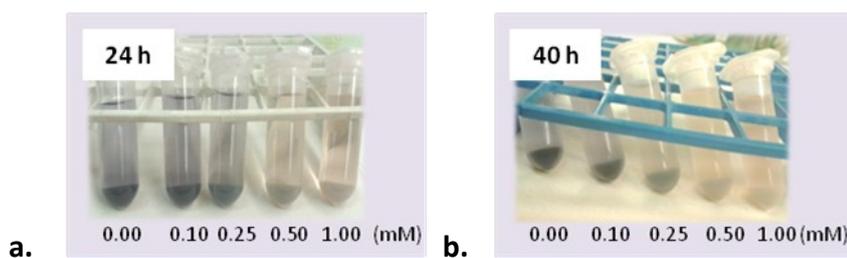


**Figura V-14.** Decoloración de AR88 con el derivado lacasa-TSI-agarosa y concentraciones variables de vainillina (24 h de reacción).

En el caso de AB172, concentraciones de ácido violúrico menores a 0.5 mM resultaron en un porcentaje menor de decoloración en 24 y aún en 40 horas de reacción, no justificando el empleo del sistema lacasa-mediador si se compara con el resultado para el derivado sin mediador redox (**fig V-15**). En la **figura V-16** se puede observar las soluciones resultantes de la decoloración de AB172 con las distintas concentraciones de AVi y cómo el colorante que es adsorbido inicialmente en el derivado también es degradado.



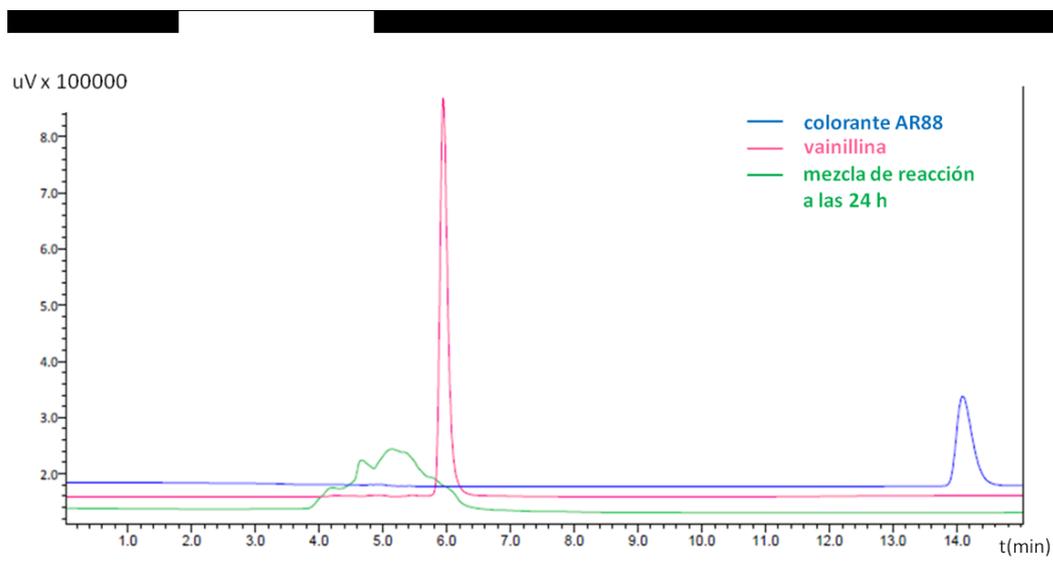
**Figura V-15.** Decoloración de AB172 con el derivado lacasa-TSI-agarosa y concentraciones variables de ácido violúrico para 24 y 40 h de reacción.



**Figura V-16.** Decoloración de AB172 con el derivado lacasa-TSI-agarosa y ácido violúrico (0.00 a 1.00 mM), para 24 h (a) y 40 h (b) de reacción.

### 3.2.2.3 Análisis de las reacciones de degradación de AR88 y AB172 por HPLC

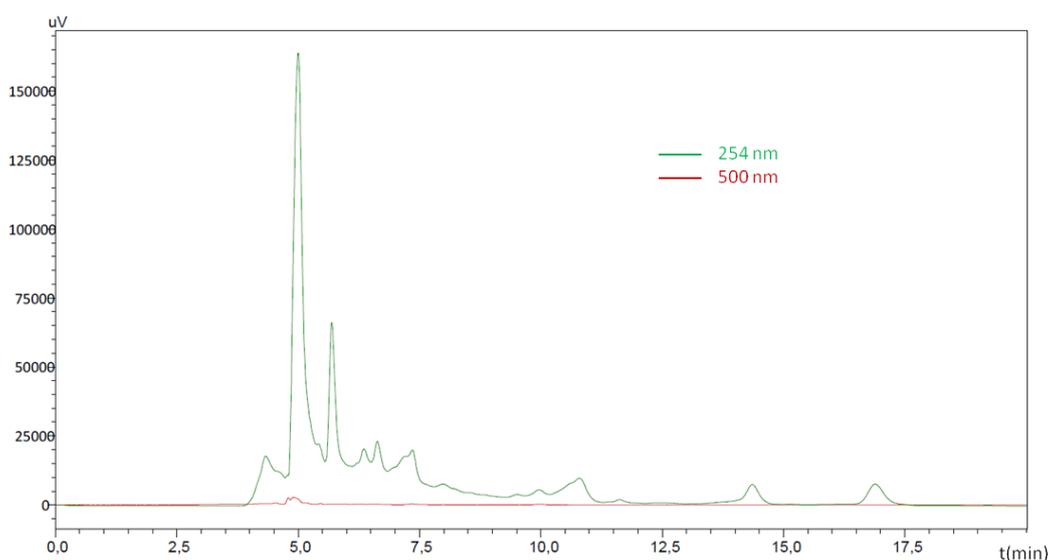
En la figura **V-17** se muestran los resultados obtenidos para el colorante AR88 en la elución por gradiente de 70 a 90 % de metanol. En la misma se observa un pico a  $t_R = 14.3$  min correspondiente al colorante. Este pico no apareció en el cromatograma de la mezcla de reacción a las 24 h, por lo que se concluye que la molécula del colorante ha sido modificada.



**Figura V-17.** Cromatogramas superpuestos de AR88 ( $t_R$  14.3 min), vainillina ( $t_R$  6 min) y mezcla de reacción a 24 horas ( $t_R$  4 - 6.5 min), registrados a 254 nm.

Los productos (“mezcla de reacción a 24 h”) eluyeron en un tiempo menor próximo a 5 minutos sin resolverse, por lo cual fue necesario ajustar las condiciones de corrida para los mismos. El mediador vainillina presentó un  $t_R$  de 6 minutos, superponiéndose con el tiempo de elución de los productos.

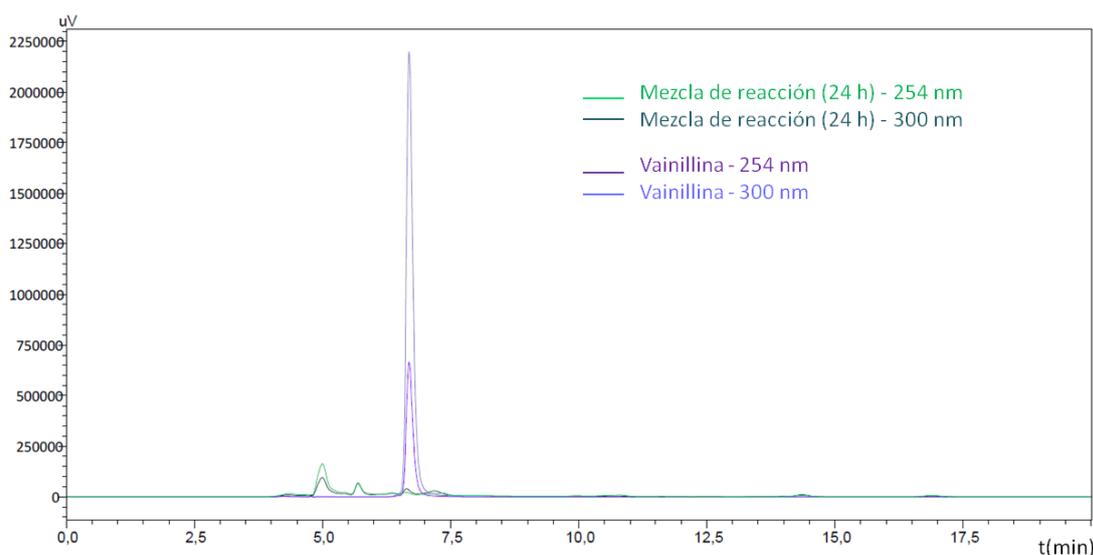
En la **figura V-18** se muestra el cromatograma resultante de la modificación de las condiciones de elución para mejorar la resolución de los productos de reacción. Se puede observar que la solución resultante de la decoloración de AR88 consiste en una mezcla de numerosos compuestos. Además, ninguno de los productos formados mostró absorbanza a la  $\lambda_{\text{máx}}$  del colorante de la región visible (500 nm), por lo cual se pudo deducir que la parte de la estructura del colorante que actúa como cromóforo a ésta longitud de onda no está presente en los mismos. Este resultado concuerda con la disminución de absorbanza observada previamente en las medidas espectrofotométricas.



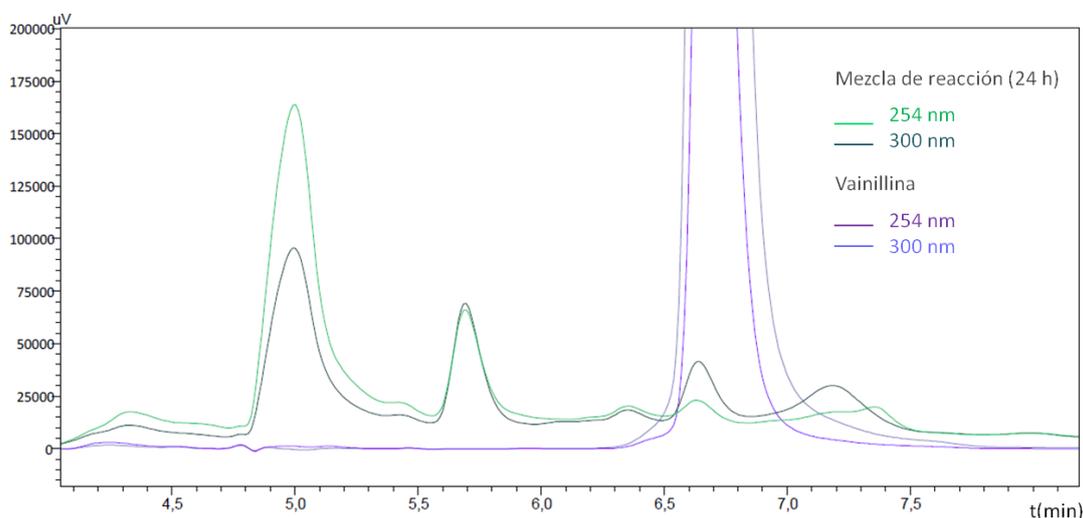
**Figura V-18.** Cromatograma de los productos de degradación de Acid Red 88 (mezcla de reacción 24 h), registrado a 254 y 500 nm.

Con las mismas condiciones de corrida utilizadas para la mezcla de productos se inyectó vainillina y se observó que este compuesto eluyó aproximadamente a 6.7 minutos (**fig. V-19 A**). En el cromatograma de la mezcla de reacción se observó un pico próximo a este  $t_R$  que podría corresponder al mediador redox (**fig. V-19 B**).

Se pudo comprobar que este compuesto fenólico fue transformado en la reacción y no reconvertido a su estructura inicial como se esperaría de un mediador redox “ideal”. De acuerdo a lo reportado en literatura el resultado concuerda con lo observado para distintos compuestos utilizados como mediadores redox, los cuales en general en lugar de reciclarse en la reacción redox, son derivados a reacciones secundarias [37,39,41].



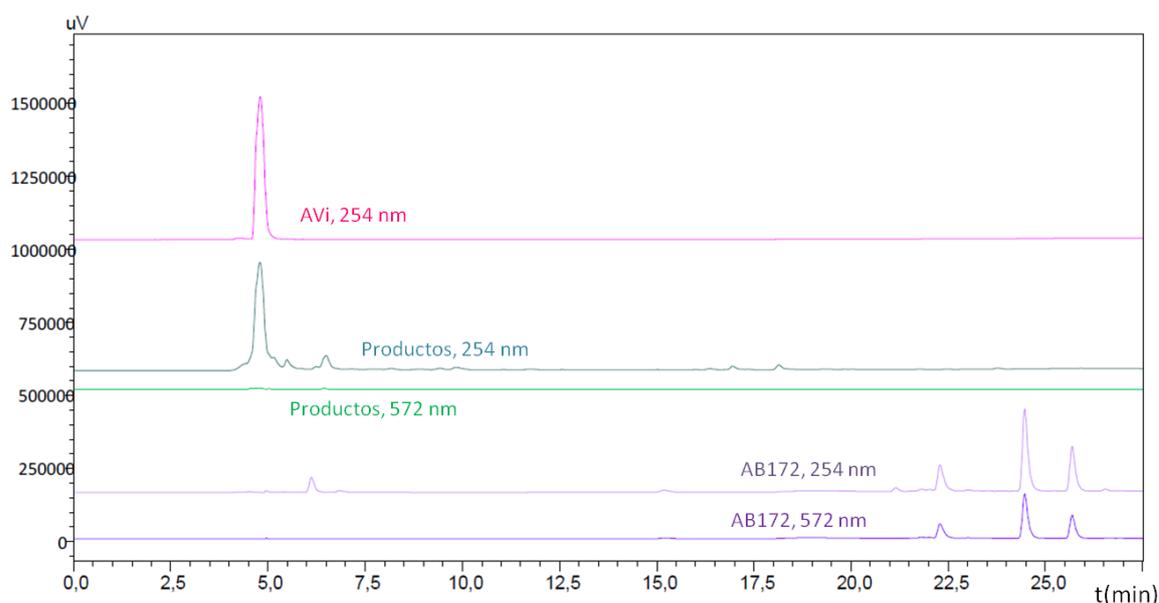
**A**



**B**

**Figura V-19. A** Cromatogramas superpuestos de la mezcla de reacción con los productos de degradación de Acid Red 88 y el mediador redox vainillina (254 nm y 300 nm). **B.** Ampliación de **A** entre 4 y 8 minutos. La longitud de onda 300 nm corresponde al máximo de absorción para el mediador vainillina.

A diferencia de lo observado para AR88, el cromatograma correspondiente al colorante Acid Black 172, no presentó un único pico (**fig. V-20**). Es importante considerar que la muestra de colorante que se utilizó no es de calidad analítica sino que se trata de una muestra suministrada por una empresa local. En esta muestra se resolvieron 3 picos que eluyeron próximos entre sí (22.3, 24.5, 25.7 minutos, **fig. V-20**), con absorción a 572 nm, y otro pequeño a 5.5 minutos detectado por su absorción a 254 nm.

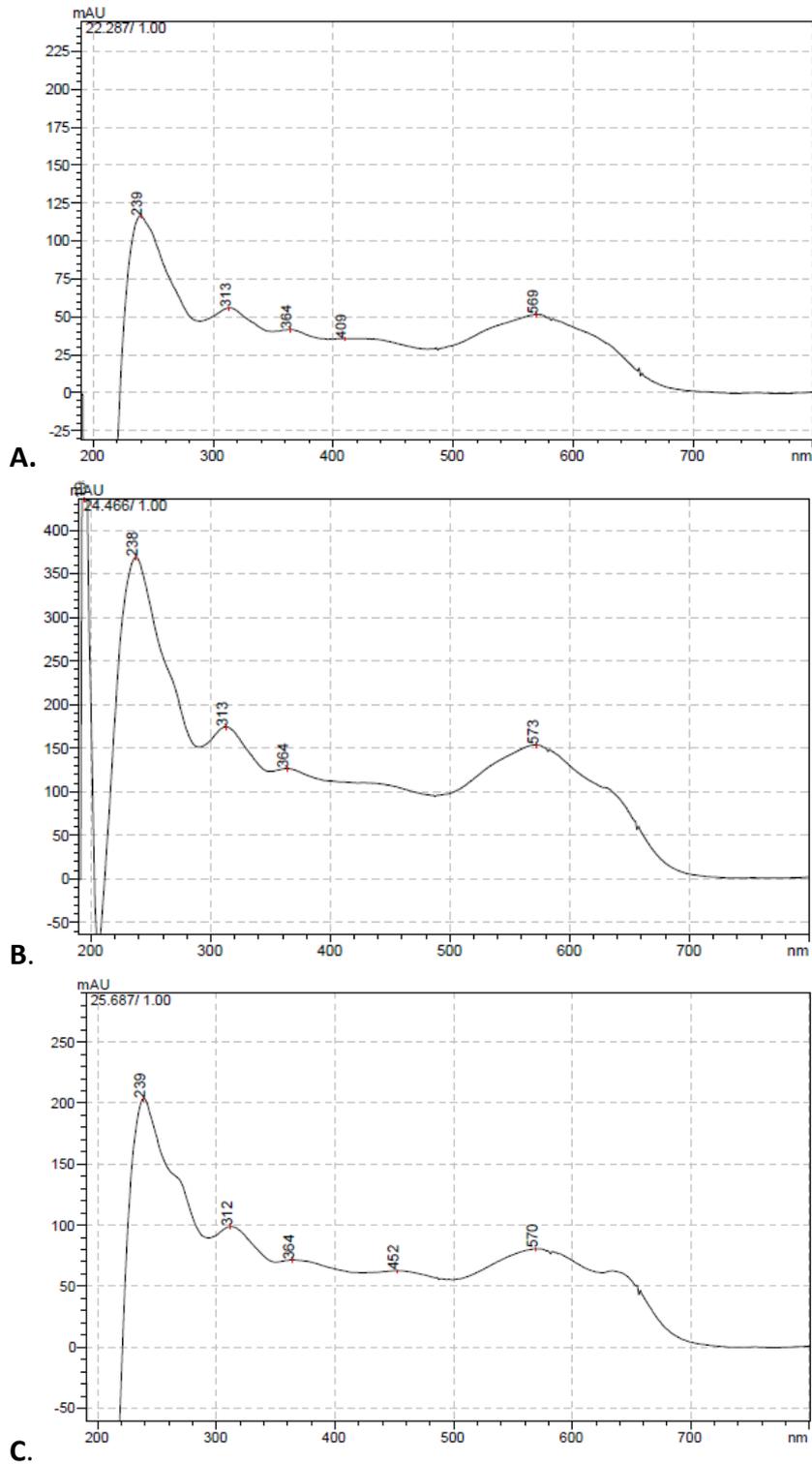


**Figura V-20.** Cromatogramas superpuestos de (de abajo a arriba): la solución de Acid Black 172 (572 y 254 nm), mezcla de productos de reacción (572 y 254 nm) y ácido violúrico “AVi” (254 nm).

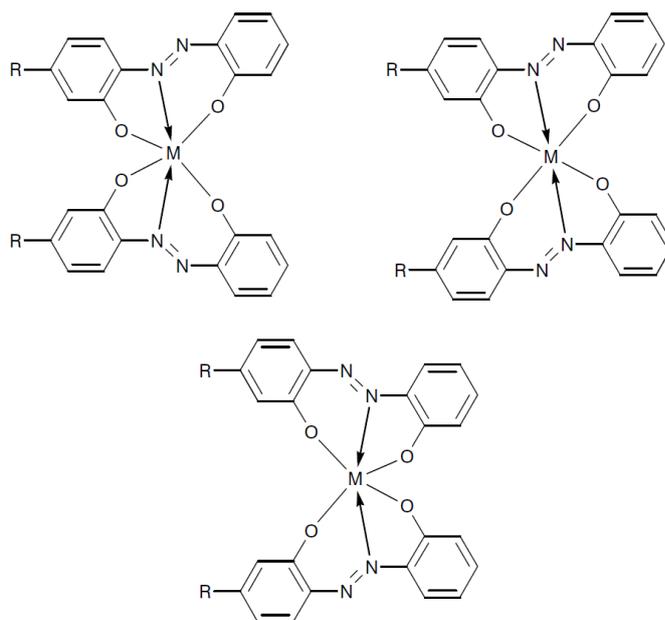
Los compuestos de los tres picos principales podrían presentar cierta similitud en su estructura no solo por la proximidad a la que eluyeron sino porque presentan espectros de absorción similares (**fig. V-21 A-C**).

El colorante AB172 es un complejo 1:2 de cromo (III), con dos moléculas azoicas como ligandos tridentados, es decir que coordinan a través de tres enlaces cada uno (ver **tabla V-I**).

El cromo se utiliza en este tipo de colorantes como mordiente para el teñido de lanas [87]. En literatura se encontró una posible explicación para la presencia de los 3 compuestos observados. La síntesis del colorante puede dar lugar a 3 isómeros originados por la unión de los dos ligandos al cromo en distintas orientaciones. Esta isomería se denominó  $N\alpha/N\beta$  y ocurre cuando los ligandos *o,o'*-dihidroxiazo son asimétricos (**fig. V-22**) [87].



**Figura V-21.** Espectros de absorción de los 3 picos del cromatograma de AB172 que absorben a 572 nm, con  $t_R = 22.3$  (A), 24.5 (B) y 25.7 (C) minutos.



**Figura V-22.** Isomería  $N\alpha/N\beta$  originada en la síntesis de complejos de cromo con ligandos azoicos asimétricos. Los complejos 1:2 dan lugar a estas 3 posibles configuraciones. Tomado de Baldwinson & Shore (1990) [87].

En el cromatograma correspondiente a la mezcla de reacción se observó la desaparición de los 3 picos confirmando la transformación del colorante. Además, esta muestra no presentó picos con absorbancia a 572 nm, lo cual demostró que dicha transformación modificó la estructura del cromóforo (**fig. V-20**).

El mediador ácido violúrico eluyó con  $t_R = 5$  min y en la mezcla de reacción un pico de gran intensidad a 254 nm coincidió exactamente con este.

En este caso también se observó el consumo del mediador redox en la reacción (el pico observado en el cromatograma del ácido violúrico fue de mayor tamaño que el observado en la muestra de productos de decoloración), aunque no de forma total como en la reacción de AR88 y vainillina.

En cuanto a los productos, no se observó ningún pico de gran intensidad a distintas longitudes de onda (aparte del que coincidió con el mediador redox), sino varios pequeños entre los que se destaca uno con  $t_R = 6.5$  minutos, que presentó absorción en la región UV. La resolución de los componentes de esta muestra podría ser mejorada modificando las condiciones de corrida para continuar con el estudio analítico de los productos obtenidos.

#### 3.2.2.4 Discusión

Se realizó la degradación enzimática de dos colorantes pertenecientes a la principal clase de colorantes sintéticos de aplicación industrial. Se seleccionaron dos colorantes azoicos con estructuras de distinta complejidad, los cuales son utilizados en el teñido de distintos materiales, como por ejemplo seda, poliamida, lana y cuero en el caso de AR88 [249] y en el teñido de lana, poliamida, cuero y papel en el caso de AB172 [250].

Acid Red 88 fue eficientemente degradado por la lacasa de *T. villosa* tanto en forma soluble como inmovilizada, así como por la lacasa presente en el sobrenadante del cultivo de *P. sanguineus*, tal como se informó en 3.1. Es posible encontrar diversos estudios sobre tratamientos fisicoquímicos para este colorante [249,251–261], así como algunos en los que se aplicaron métodos de biodegradación [196,262,263]. El único estudio previo donde se realizó la degradación enzimática del colorante fue reportado por Dias *et al.* [196]. La enzima utilizada en este caso fue la lacasa de un basidiomicete (EUC1) y la misma fue eficiente en la decoloración sin requerir un mediador redox, aunque el resultado no fue cuantificado.

En el caso de AB172 se encuentran algunos estudios donde se realizó la degradación del colorante mediante métodos fisicoquímicos [250,264,265] y otros donde se efectuó su biodegradación [266–270]. Entre los últimos, se encuentra un estudio de biodecoloración enzimática en el que se utilizó la lacasa de *Trametes pubescens* inmovilizada en perlas de quitosano, con la cual se obtuvo 69 % de decoloración sin mediador redox en 48 horas de reacción (para una solución 50 mg/L de AB172, con 1000 UE/L de enzima) [270]. Si bien este valor es comparable al obtenido con la lacasa inmovilizada de *T. villosa* en este trabajo, la eficiencia de esta enzima fue mayor, considerando que se utilizó el doble de concentración de colorante y una actividad lacasa diez veces menor.

En relación a estos estudios entonces se pudo concluir:

➤ Fue posible degradar colorantes pertenecientes a las principales clases de los colorantes utilizados en la industria textil mediante lacasas producidas por cepas nativas de basidiomicetes aisladas en Uruguay.

Además, se comprobó que la efectividad de la biodecoloración depende de diversos

factores tales como la fuente y concentración de la enzima empleada, la estructura de los colorantes, el tiempo de incubación y el agregado de mediadores redox, así como la concentración y la naturaleza de los mismos, tal como se describe en literatura [271]. Por otra parte, se demostró la eficacia del biocatalizador insoluble obtenido en base a lacasa de *Trametes villosa* por el método covalente reversible en la degradación de colorantes sintéticos.



# CAPÍTULO VI

## Evaluación ecotoxicológica del tratamiento enzimático de colorantes azoicos con lacasa

Este trabajo fue codirigido por la Dra. Diana Míguez (Especialista Senior,  
Gerencia I+D+i del Laboratorio Tecnológico del Uruguay)



## 1. OBJETIVO

- Evaluación ecotoxicológica del tratamiento enzimático realizado sobre los colorantes azoicos Acid Red 88 y Acid Black 172 con lacasa inmovilizada de *Trametes villosa*.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Bioensayos de toxicidad aguda seleccionados

- Ensayo de inhibición de la germinación y de la elongación de radícula e hipocótilo de la planta vascular *Lactuca sativa*
- Ensayo de inmovilización de neonatos del microcrustáceo de agua dulce *Daphnia magna*
- Ensayo de inhibición de la luminiscencia emitida por la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Microtox®)

### 2.2 Muestras analizadas

- Solución de colorante: Acid Red 88 (AR88) y Acid Black 172 (AB172), 100 ppm.
- Solución con productos de la degradación enzimática del colorante correspondiente.
- Solución del mediador redox utilizado en la reacción de decoloración: vainillina 0.1 mM para AR88; ácido violúrico 1.0 mM para AB172.

El propósito del estudio fue comparar la toxicidad de la mezcla obtenida con respecto a la inicial del colorante. Se debe tener en cuenta que la concentración de los compuestos presentes en la mezcla de productos de reacción es desconocida. Por otro lado, el estudio del efecto del mediador redox se realizó a modo de control, en la misma concentración utilizada en la biotransformación.

Las soluciones fueron preparadas de distinto modo según el bioensayo en el que fueron analizadas y la reacción de decoloración fue llevada a cabo en esas condiciones de modo de obtener resultados comparables entre las 3 muestras:

- Para los ensayos de *L. sativa* y Microtox® se utilizó una solución de sales de fosfato:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM, pH 5.0
- Para el ensayo de *D. magna* se utilizó una solución salina compuesta por sales de fosfato y agua mineral comercial, pH 6.0 (ver sección 2.5.2)

### 2.3 Reacciones de decoloración

Las reacciones se realizaron en *batch* (sistema discontinuo) incubando la solución de colorante 100 ppm con el respectivo mediador redox (Vai 0.1 mM o AVi 1.0 mM) y una alícuota de derivado TSI-lacasa de *T. villosa* (100 UE/L), con agitación en rototorque durante 24 h, a 22 °C. Para detener la reacción se filtró la mezcla reactiva separando el derivado insoluble de la solución con los productos de reacción.

*Nota:* La selección de la concentración 100 mg/L para los colorantes en esta reacción y como concentración máxima para su análisis en los bioensayos de *L. sativa* y *D. magna* se basó en los criterios establecidos por el Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de clasificación y etiquetado de sustancias químicas [272].

### 2.4 Ensayo de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa* L

El ensayo se realizó mediante la adaptación del protocolo descrito en el libro “Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones” [96]. Este fue desarrollado en base a recomendaciones de diferentes organismos de protección ambiental, para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros.

Durante el trabajo experimental realizado en esta Tesis fue necesario realizar algunas modificaciones menores, por lo que se describe aquí el procedimiento detallado.

#### 2.4.1. Organismos de prueba

Los organismos de prueba de este ensayo fueron semillas de *Lactuca sativa* variedad crepa verde. Se utilizaron semillas de productores locales que practican agricultura orgánica para asegurar que estas no fueran curadas con fungicidas y/o plaguicidas<sup>2</sup>.

Fue necesario verificar que el lote de semillas empleado presentaba buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocótilo. Para esto, previo a la implementación del ensayo, se comprobó que el lote tuviera un porcentaje de germinación superior a 90 % y variabilidad de la elongación de la radícula e hipocótilo con un coeficiente de variación (CV) menor a 30 %.

---

<sup>2</sup> Organización No Gubernamental - Redes-Amigos de la Tierra Uruguay -.

Cuando se utilizó un lote o cultivar nuevo de semillas, se definió las condiciones de luz y temperatura óptimas para la germinación. Las semillas seleccionadas se almacenaron fraccionadas a 4 °C, en oscuridad y en ambiente seco. Conservadas en estas condiciones las mismas mantienen su vigor al menos durante dos años.

#### 2.4.2. Control negativo

Si bien el protocolo consultado para la realización del ensayo recomienda utilizar agua dura reconstituida según la Norma APHA (1992), en este caso fue necesario evaluar distintas soluciones tampón para obtener una que cumpliera con dos condiciones simultáneas. Estas son, por un lado proporcionar el medio necesario para la reacción catalizada por lacasa de *T. villosa* en la que se obtuvo la muestra a analizar, y por el otro, aportar las condiciones de pH y osmolaridad adecuadas para que ocurra la germinación y el desarrollo normal de las plántulas de lechuga.

En base a este estudio (ver **Anexo VI-1**) se seleccionó la solución de fosfatos de sodio  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM, pH 5.0, para las reacciones de decoloración y para realizar las diluciones seriadas de las soluciones a testear en el bioensayo así como para el control negativo del mismo.

#### 2.4.3. Preparación de las diluciones seriadas

Para realizar una curva dosis-respuesta se recomienda preparar un mínimo de cinco diluciones de la muestra o compuesto a estudiar, de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 0 y 100 %.

Se utilizó un factor de dilución de 2 para la preparación de la serie obteniendo las concentraciones porcentuales de 100.0, 50.0, 25.0, 12.5 y 6.3 %. Donde 100 % corresponde a la concentración inicial sin diluir de las soluciones 100 ppm de cada colorante, la solución 0.1 mM de vainillina, la de ácido violúrico 1.0 mM, y la de los productos de reacción, de concentración desconocida. La concentración 0 % corresponde al control negativo del ensayo.

#### 2.4.4. Procedimiento del ensayo

Se colocó en placas de Petri limpias de 90 mm de diámetro dos discos de papel de filtro Whatman N° 1 de 80 mm de diámetro.

Se impregnó el papel de filtro en cada placa con 4.0 mL de la solución correspondiente asegurando que quedara bien humedecido sin que se formen bolsas de aire, con sobrante de líquido para evitar la desecación. Para asegurar la disponibilidad de oxígeno necesario para el normal desarrollo del proceso de germinación las semillas no deben quedar sumergidas.

Con la ayuda de una espátula, se colocó cuidadosamente 20 semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces como se observa en la **figura VI - 1b**. Las placas se sellaron con papel Parafilm M para evitar la pérdida de humedad y se incubaron durante 120 horas en la oscuridad, en una cámara termostaticada a 20 °C. Se realizaron 5 repeticiones para cada dilución ensayada así como para el control. El diseño experimental se puede observar en la **figura VI -1a**.

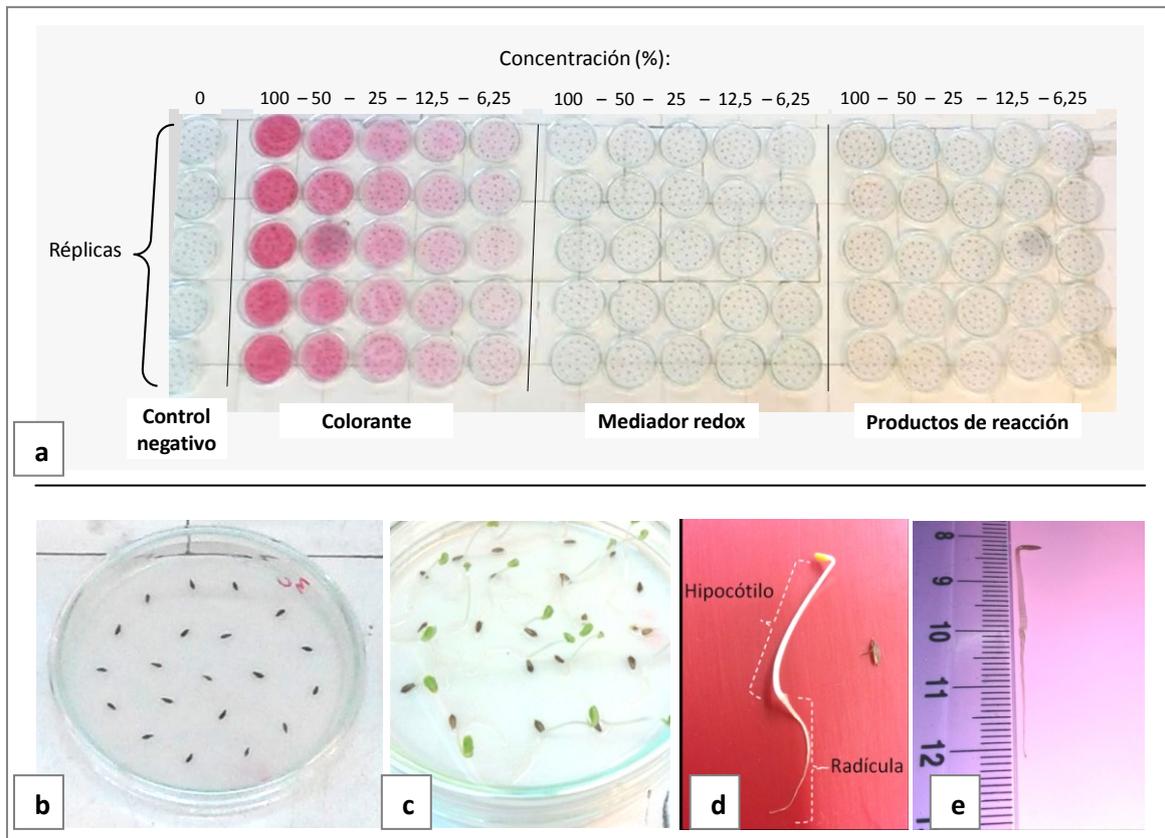
#### 2.4.5. Medida de los puntos finales para la evaluación de la fitotoxicidad

El término “punto final” se refiere a la respuesta o efecto seleccionado para evaluar la toxicidad de un compuesto o mezcla sobre determinado organismo de prueba. También se refiere al valor o parámetro que expresa cuantitativamente el resultado del bioensayo de toxicidad. Por ejemplo CI50 (concentración inhibitoria media), CE50 (concentración efectiva media) y CL50 (concentración letal media), corresponden a la cantidad de compuesto que produce el efecto especificado sobre el 50 % de los organismos expuestos. Asimismo, se puede utilizar los valores NOEC y LOEC <sup>3</sup>, los cuales representan la mayor concentración para la que no se observa efecto estadísticamente significativo respecto al control y la menor concentración para la que se observa efecto estadísticamente significativo respecto al control, respectivamente.

En este caso, los puntos finales evaluados fueron el efecto en la germinación, en la elongación de la radícula y en la del hipocótilo (**fig. VI -1c**). Cada punto final se evaluó comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo.

---

<sup>3</sup> Considerando que el uso de las siglas NOEC y LOEC se encuentra muy extendido en idioma inglés, se mantienen las mismas sin traducirlas al castellano.



**Figura VI-1.** Ensayo de toxicidad aguda con *L. sativa*. **a.** Diseño experimental. **b.** Disposición de semillas de *L. sativa* en la placa de petri sobre papel de filtro embebido en solución a testear. **c.** Plántulas de *L. sativa* desarrolladas en el control negativo durante la duración del ensayo. **d.** Plántula de lechuga al finalizar el ensayo, se señala radícula e hipocótilo. **e.** Medición manual de longitud de radícula e hipocótilo de plántula descongelada.

- Efecto en la germinación:

Se registró el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

- Efecto en la elongación de la radícula e hipocótilo:

Utilizando una regla se midió cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocótilo de cada una de las plántulas correspondientes a cada dilución de muestra y al control (**fig. VI -1d**). La medida de elongación de la radícula se realizó desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocótilo se realizó desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones.

Para facilitar la medición se procedió a congelar las placas de Petri de todos los tratamientos y se descongelaron a medida que se realizó la medición. De esta manera, las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda que favorece la manipulación. Este procedimiento reduce la variabilidad en las medidas principalmente cuando el crecimiento de las radículas es ensortijado o no es parejo.

#### 2.4.6. Cálculos para la expresión de los resultados

- Porcentaje de inhibición en la germinación:

Normalmente, cuando se observa inhibición mayor al 50 %, se debe calcular la concentración que produce el 50 % de inhibición o efecto mediante el uso de un programa estadístico o un método gráfico basado en la curva dosis-respuesta.

Sin embargo en este caso la inhibición fue inferior al 50 % por lo cual se realizó el análisis de comparación de medias mediante el test de Tukey, verificando la significancia estadística en el efecto, para analizar si existen diferencias entre los distintos tratamientos.

- Promedio y error estándar de la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas:

Si se observa inhibición en el crecimiento de la plántula respecto al control negativo, se calcula el porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocótilo, a partir del promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control y se calcula el valor de concentración inhibitoria media  $CI_{50}$ .

Dado que el efecto de inhibición no fue evidente se graficó la longitud promedio de radícula e hipocótilo vs concentración, para la visualización de los resultados. Se realizó el análisis de comparación de medias mediante el test de Tukey.

Para la interpretación de los resultados se debe tener en cuenta que los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula o del hipocótilo son considerados efectos subletales mientras que la inhibición en la germinación puede considerarse como un efecto letal.

## 2.5. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)

Este estudio se implementó mediante una adaptación del método recomendado en la Guía N° 202 de la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (OECD): “*Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test” [110] y según lineamientos aportados por personal del Departamento Aguas y Productos Químicos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), donde el ensayo se realiza bajo condiciones estandarizadas. Este ensayo forma parte de los servicios ofrecidos por dicho laboratorio para el análisis de efluentes, muestras ambientales o sustancias químicas.

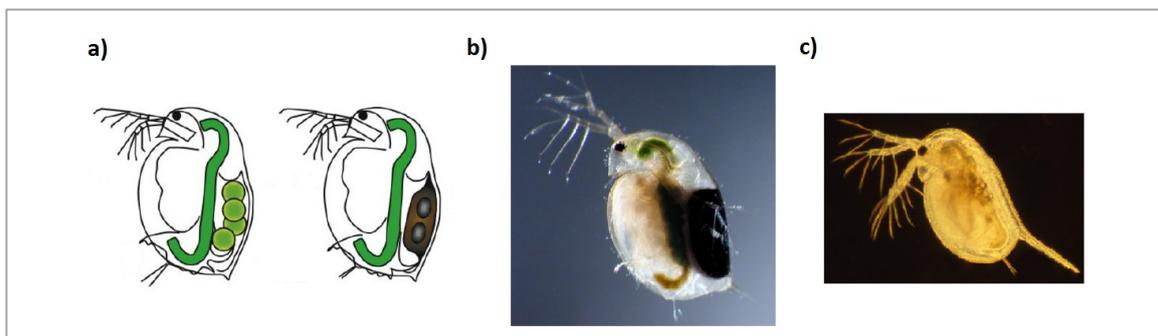
En este ensayo las muestras utilizadas fueron el colorante AB172, el mediador ácido violúrico y la mezcla de reacción correspondiente. No fue posible realizar el ensayo con el colorante Acid Red 88 ya que el mismo no se solubilizó en la solución salina requerida para el mantenimiento del organismo.

### 2.5.1. Organismo de prueba

Se utilizaron neonatos de la especie *Daphnia magna* Straus, con menos de 24 horas de edad (**fig. VI -2c**). Todos los organismos utilizados en cada ensayo se originaron a partir de una misma población de adultos. Para reducir la variabilidad se recomienda que no se utilice la progenie de primera camada. Además, los mismos deben provenir de una estirpe saludable que no muestre signos de estrés tales como alta mortalidad, presencia de machos y efiptos (**fig. VI -2a y 2b**), retraso en la producción de la primera camada, menor número de neonatos por camada o animales descoloridos.

La manipulación de los organismos para transferir los adultos del cultivo a la cámara de cría, los neonatos a los recipientes con las soluciones de prueba o los organismos al finalizar el ensayo para su observación bajo lupa binocular fue llevada a cabo de forma muy cuidadosa. Los dáfnidos se deben encontrar siempre en medio acuoso y no sufrir golpes ya sea de forma directa o a través del recipiente donde se encuentran. Para ello se utilizó una pipeta Pasteur de plástico con una abertura lo suficientemente ancha para no ocasionar daños a los organismos, procurando que estos ingresaran sin entrar en contacto con el aire. Para su liberación, se mantuvo la punta de la pipeta bajo la superficie del agua donde se descargaron. Cuando esto se realizó para la observación bajo lupa, se colocó primero unas gotas del medio líquido sobre el porta-

objeto y luego se sumergió la punta de la pipeta en las mismas como se aprecia en la figura VI-3.



**Figura VI-2.** Reproducción de *Daphnia magna*. **a.** A la izquierda, dibujo de hembra adulta que produce huevos diploides por reproducción partenogenética, los cuales se desarrollan directamente en descendientes hembra, o en machos si las condiciones ambientales son adversas. A la derecha dibujo de hembra adulta con epítopos haploides producidos en respuesta a condiciones ambientales o de cultivo desfavorables. Estos huevos son fertilizados por reproducción sexual. **b.** Fotografía de hembra adulta con epítopos bajo la parte postero-dorsal del caparazón. **c.** Neonato de *D. magna*: descendencia partenogenética con menos de 12 horas luego de salir de la cámara de cría. Obtenido de: Capítulo 2, *Introduction to Daphnia Biology Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia* [Internet]. Ebert D. 2005 [273]



**Figura VI- 3.** Manipulación de neonatos de *D. magna* para la ejecución del ensayo y su observación al finalizar la exposición. Tomado de: <http://www.carolina.com/teacher-resources/Video/care-and-handling-of-daphnia-video/tr11203.tr> [274]

### 2.5.2. Control negativo

Para las diluciones seriadas así como el control negativo del ensayo se recomienda en la guía OECD el uso de agua natural proveniente de una fuente superficial o subterránea, también agua reconstituida o agua potable corriente sin cloro, si los neonatos sobreviven en la misma sin mostrar signos de estrés. Así mismo, se

establecen algunos criterios que debe cumplir el agua en relación a dureza y a pH. Para *Daphnia magna* este último debe encontrarse en el rango entre 6.0 y 9.0.

En este trabajo fue necesario optimizar un medio con pH y dureza adecuada, tal que además de permitir la viabilidad de los neonatos durante las 48 h de la prueba, evitara la precipitación del colorante y favoreciera la actividad enzimática en la reacción de decoloración.

Se obtuvo una solución salina de pH 6.0 con la siguiente composición:

50 %  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM, pH 5.0/ 25 % agua destilada/ 25 % agua mineral comercial sin gas (**tabla VI -1**).

**Tabla VI-1.** Análisis físico-químico del agua mineral envasada (natural, sin gasificar) informado por el fabricante (Análisis N° 1390595).

| Parámetro                                 | Valor informado      |
|---|----------------------|
| Turbiedad                                 | 0.55 NTU*            |
| pH  | 7.36                 |
| Conductividad                             | 644 $\mu\text{S/cm}$ |
| Dureza total (como $\text{CaCO}_3$ )      | 163 mg/L             |
| Alcalinidad total (como $\text{CaCO}_3$ ) | 228 mg/L             |
| Fluoruros (como F)                        | 0.34 mg/L            |
| Cloruros (como Cl)                        | 42.8 mg/L            |
| Nitritos (como N)                         | No Detectable        |

\* Unidad nefelométrica de turbidez.

### 2.5.3. Preparación de las diluciones seriadas de las soluciones problema

Las soluciones se prepararon de la misma forma como se indicó para el ensayo de *L. sativa* (2.4.3), utilizando un factor de 2 para las diluciones obteniendo concentraciones entre 6.3 % y 100.0 %.

### 2.5.4. Procedimiento de ensayo

Se realizó el ensayo por cuadruplicado con 5.0 mL de cada muestra (control negativo y soluciones problema en distintas concentraciones) y 5 animales para cada una. Se utilizaron 20 animales en total para cada concentración de muestra y para el control.

La incubación se realizó sin aireación ni alimentación de los neonatos en una cámara con control de fotoperiodo y temperatura (entre 18 y 22 °C), con un tiempo de exposición de 48 horas. Durante la misma se evitó la pérdida de agua por evaporación y la entrada de polvo en las soluciones mediante el uso de papel film adherente.

Los recipientes y demás materiales que entraron en contacto con las soluciones de ensayo son de vidrio o de otro material químicamente inerte. La relación de volumen de aire / volumen de líquido en el recipiente fue idéntico para las muestras y el control.

#### 2.5.5. Medida del punto final

A las 48 horas se contabilizaron los individuos muertos para cada concentración de solución de prueba y en el control. Para esto se observó su inmovilidad durante 15 segundos luego de agitar en forma circular el recipiente en que se encontraban. Para realizar una observación individual más precisa se transfirieron a un recipiente más amplio y se utilizó como apoyo una lupa binocular.

#### 2.5.6. Expresión de resultados

Se graficó el porcentaje de neonatos muertos para cada tratamiento. Los datos fueron analizados por el método Probit utilizando el software estadístico ToxCalc™, con el cual se obtiene una estimación del valor de CL<sub>50</sub> con un intervalo de 95 % de confianza.

El criterio de performance utilizado para validar el ensayo es una inmovilidad menor al 10 % en los individuos del control negativo. Además se realiza un control positivo para valorar la estabilidad de la sensibilidad de los organismos utilizando una sustancia de referencia como el dicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), con una frecuencia de por lo menos dos veces al año.

*Nota:* Actividades como el cultivo y mantenimiento de los organismos en el laboratorio (incluyendo control de condiciones como luz, temperatura y pH, alimentación, verificación del estado saludable de la población según criterios definidos, etc.), la selección y separación de hembras adultas para la producción de la progenie a utilizar en los ensayos, así como la validación del ensayo con el control positivo, son llevadas a cabo de rutina en el laboratorio del Departamento Aguas y Productos Químicos del LATU.

## 2.6. Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri* (Microtox®)

Este ensayo fue realizado por el Laboratorio Ambiental de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA) del Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA). El procedimiento utilizado por el laboratorio se puede ver en detalle en el **Anexo VI- 2: “6059UY - Evaluación de la ecotoxicidad aguda de muestras ambientales como ser aguas residuales domésticas e industriales, aguas naturales superficiales o subterráneas, lixiviados de residuos sólidos industriales, mediante el test de bacterias luminiscentes (Sistema Microtox®)”**.

Se trata de un ensayo normalizado basado en protocolos de la Asociación Americana para la Salud Pública (APHA) y la Agencia Ambiental Canadiense (Environment Canada).

### 2.6.1. Organismo de prueba

Se empleó la bacteria marina bioluminiscente *Vibrio fischeri* (cepa B-11177 de la colección NRRL). La cepa se conserva de forma liofilizada y fue reactivada en el momento de la prueba mediante su resuspensión en una solución de reconstitución adecuada.

### 2.6.2. Procedimiento de ensayo

La variación de la intensidad de luz emitida por las bacterias expuestas a la muestra problema fue comparada con la del control negativo. Para medir la reducción de la luminiscencia se utilizó un fotómetro Microtox® modelo 500 (comercializado por Modern Water), con el respectivo software (MicrotoxOmni™ Software for Windows versión 1,15 95/98/NT o equivalente). El fotómetro mide la luz a una longitud de onda de 490 nm para lo que cuenta con una posición para la celda de lectura. Además, este analizador funciona como incubador con control de la temperatura. El mismo cuenta con los pocillos necesarios para la preparación de las diluciones de la muestra, para la activación del reactivo bacteriano, para la incubación de la bacteria durante el período de exposición a las distintas concentraciones de la muestra así como para el control negativo. El período de exposición fue de 15 minutos, realizándose la lectura cuando lo indicó el monitor del equipo.

### 2.6.3. Preparación de la muestra

Las reacciones de decoloración para obtener las muestras a analizar se llevaron a cabo a pH 5.0, como se mencionó anteriormente es el pH necesario para favorecer la actividad enzimática. Sin embargo, la bacteria del sistema Microtox® requiere que el pH se encuentre en un rango comprendido entre 6.0 y 8.0. Este factor se debe controlar para asegurar que la disminución de la emisión de luz se debe exclusivamente al efecto tóxico de la muestra. Por ello se procedió al ajuste previo de pH a 6.5 de todas las muestras enviadas a analizar con una solución de NaOH 0.5 N.

Las diluciones seriadas de las soluciones problema se prepararon utilizando un factor de 2 obteniendo como concentraciones finales de la muestra en cada cubeta: 45.50 %, 22.75 %, 11.38 % y 5.68 % (ver **Anexo VI- 2**).

### 2.6.4. Control positivo

Se realizó un control de calidad para verificar la sensibilidad del reactivo bacteriano a un tóxico de referencia. Para eso se utiliza fenol u otro compuesto de respuesta conocida como es el caso del Zn (II).

### 2.6.5. Expresión de los resultados

Con los datos de luminiscencia obtenidos el software cuantificó el punto final del bioensayo y calculó la concentración de la muestra que causa 50 % de inhibición de la luz emitida por la bacteria *Vibrio fischeri* (CE50).

En base al valor de CE50 se clasificó la muestra en una de las 4 categorías de toxicidad como se puede ver en la **tabla VI- 2**, o como no tóxica si el valor fue mayor al 100 %.

**Tabla VI-2.** Clasificación de la muestra según el valor de CE50 del ensayo Microtox®

| CE50      | Clasificación        |
|-----------|----------------------|
| < 25 %    | Muy tóxica           |
| 25 a 50 % | Tóxica               |
| 51 a 75 % | Moderadamente tóxica |
| 76 a 99 % | Levemente tóxica     |
| > 100 %   | No tóxica            |

Fuente: Qureshi 1990, p3-89. Microbiology methods manual. Alberta Environmental Centre.

### 3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

#### 3.1. Resultados para el colorante Acid Black 172

En el ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga no se observó efecto de **inhibición de la germinación** para ninguna de las 3 muestras ensayadas, con un valor de inhibición menor a 10 % en las 5 concentraciones testeadas (**tabla VI -3**).

**Tabla VI -3.** Inhibición de la germinación en el bioensayo de *L. sativa*

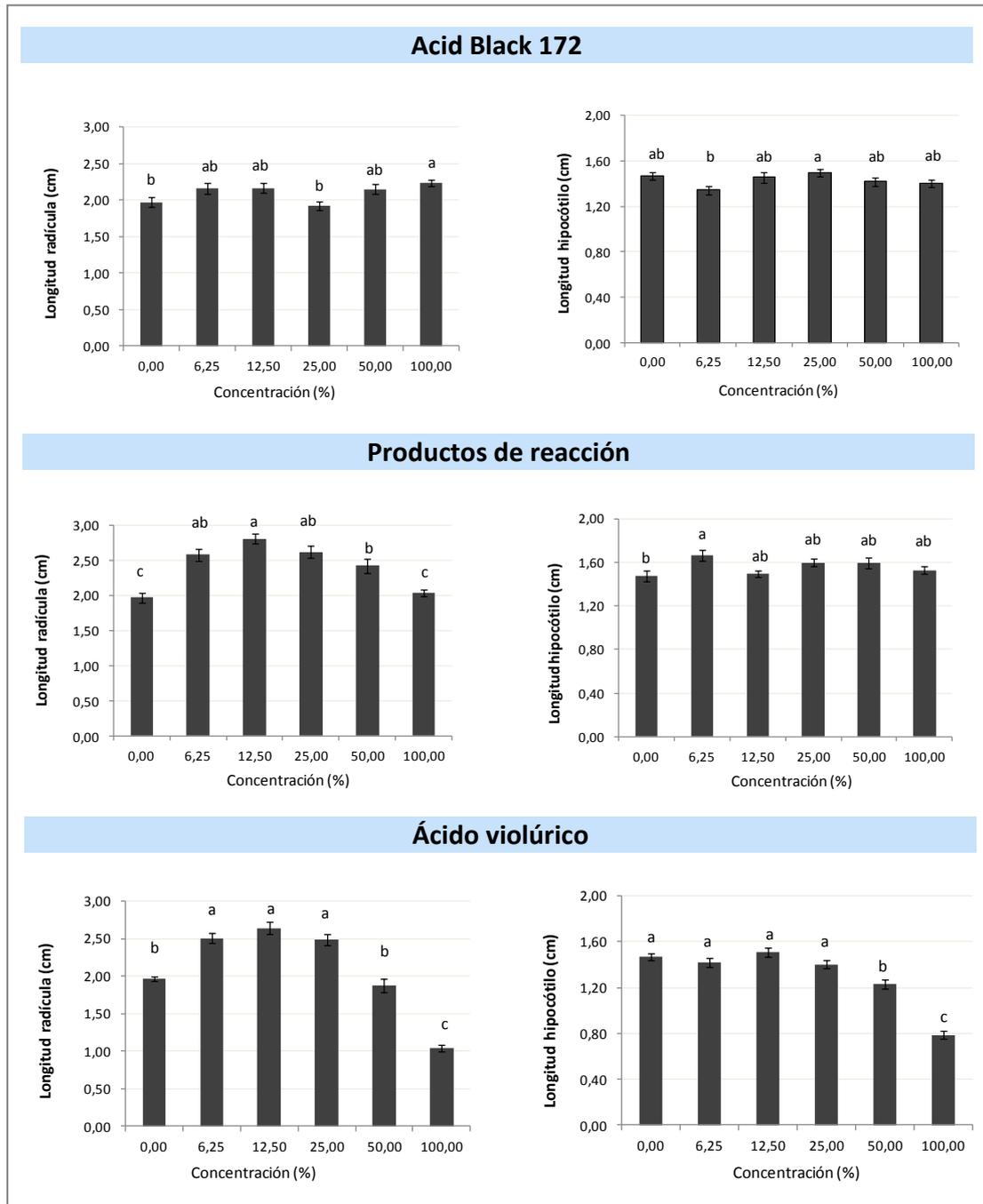
| Concentración de muestra (%) | Semillas no germinadas (%) |                 |                       |
|------------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------------|
|                              | AB172                      | Ácido Violúrico | Productos de reacción |
| 0,00 <sup>1</sup>            | 0,0                        | 0,0             | 0,0                   |
| 6,25                         | 3,0                        | 2,0             | 1,0                   |
| 12,50                        | 2,0                        | 3,0             | 0,0                   |
| 25,00                        | 5,0                        | 1,0             | 3,0                   |
| 50,00                        | 2,0                        | 7,0*            | 1,0                   |
| 100,00                       | 4,0                        | 1,0             | 0,0                   |

| Concentración de muestra (%) | Semillas no germinadas (%) |            |                       |
|------------------------------|----------------------------|------------|-----------------------|
|                              | AR88                       | Vainillina | Productos de reacción |
| 0,00 <sup>1</sup>            | 11,0                       | 11,0       | 11,0                  |
| 6,25                         | 20,2                       | 15,9       | 27,0*                 |
| 12,50                        | 15,0                       | 13,0       | 9,9                   |
| 25,00                        | 13,0                       | 18,0       | 12,2                  |
| 50,00                        | 21,0                       | 13,0       | 15,0                  |
| 100,00                       | 12,0                       | 5,0        | 9,0                   |

Notas: Se muestra el porcentaje de semillas que no germinaron frente a distintas concentraciones de colorante, de mediador redox y de productos de degradación del colorante. \*Se indica con un asterisco los resultados con diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo según la prueba de comparación de medias Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). <sup>1</sup>La concentración 0.0 % corresponde al control negativo.

En el caso de las respuestas de **elongación de radícula y de hipocótilo** para las muestras de colorante y de productos de decoloración no se observó un efecto inhibitorio con las concentraciones ensayadas. Por el contrario, en el caso de los productos de reacción se observó una elongación mayor de la radícula respecto al control para las concentraciones inferiores a 100 % (**fig. VI -4**).



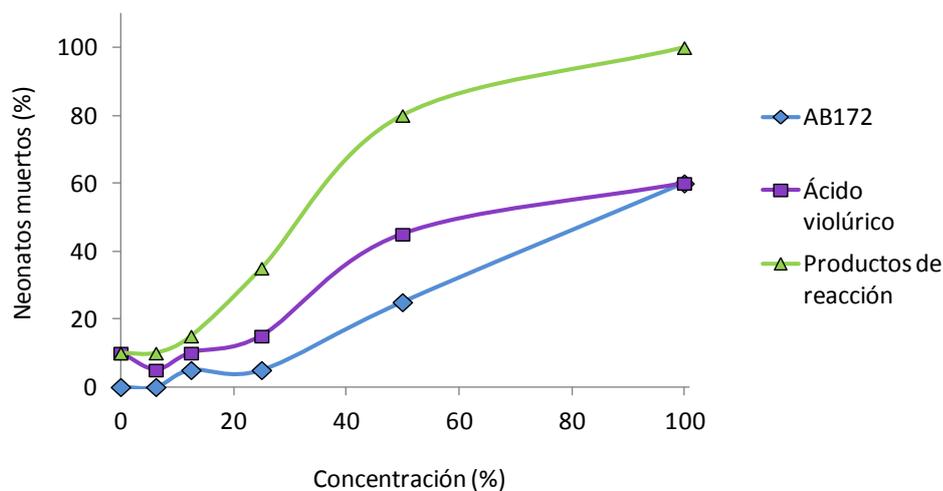
**Figura VI-4.** Efecto de las muestras “AB172”, “productos de la reacción de degradación de AB172” y “Ácido violúrico” en el desarrollo de plántulas de *L. sativa var crespa*. Se muestran los resultados de las dos respuestas registradas: a la izquierda “longitud de la radícula” y a la derecha “longitud del hipocótilo”. Los resultados con igual letra indican que no difieren significativamente según la prueba estadística de comparación de medias Tukey ( $p > 0.05$ ).

Dicho fenómeno se denomina hormesis y se define como un efecto estimulante a dosis bajas de una sustancia que a mayores dosis puede presentar un efecto adverso [275]. El mismo ha sido descrito en numerosos estudios para diversos organismos y variados compuestos [275–277]. El término fue usado por primera vez en 1943 para describir el efecto observado para un compuesto de la corteza de roble sobre el desarrollo fúngico [278]. Se propuso que puede ocurrir debido a hipercorrecciones dadas por mecanismos de control biosintéticos a bajos niveles de daño por el compuesto tóxico. También podría tratarse de una adaptación para minimizar los efectos de inhibidores de crecimiento, mediante una reducción de las concentraciones de los mismos en los tejidos por un crecimiento mayor de lo normal [275]. Entre los organismos en los que se ha puesto de manifiesto se encuentran diversas especies vegetales incluyendo la empleada en este ensayo, observándose además en distintos estudios de alelopatía [276,278,279]. Un aspecto interesante que ha sido estudiado es la posibilidad de que los compuestos que producen el efecto puedan emplearse como fertilizante en cultivos agrícolas. Para esto es necesario conocer la concentración efectiva del compuesto, la reproducibilidad del efecto esperado, la variación con las condiciones de cultivo así como el efecto sobre las malezas para tener un resultado favorable [276,280].

El mismo efecto se pudo observar para el mediador redox ácido violúrico, por lo que es posible que la presencia de este compuesto en la mezcla de reacción esté relacionada con el resultado obtenido para la misma (**fig. VI -4**). Para este mediador redox además se detectó un efecto inhibitorio aunque solo para las concentraciones altas. Para la mayor concentración se observó inhibición de la elongación de radícula (47.1 %) y de hipocótilo (46.5%) y para la concentración 50 % (corresponde a 0.5 mM) fue inhibida la elongación de hipocótilo aunque solo un 16.5 %. Dado que no se observó un valor de inhibición mayor al 50 % en ningún caso, se realizó el análisis de comparación de medias en lugar de calcular la concentración efectiva 50 (CE50).

En el bioensayo de *Daphnia magna* el colorante AB172 presentó menor toxicidad aguda que los productos de reacción, como se observa en las curvas dosis-respuesta de la **figura VI -5** y los valores de dosis letal 50 (CL50). El mediador redox presentó una toxicidad intermedia respecto a las otras dos muestras.

a.



b.

| Muestra               | CL50 (%) |
|-----------------------|----------|
| AB172                 | 86,0     |
| Ácido violúrico       | 70,6     |
| Productos de reacción | 31,3     |

**Figura VI -5.** Resultado del bioensayo con *D. magna* (48 h) para las muestras “AB172”, “ácido violúrico” y “productos de degradación de AB172”. **a.** Se representa el porcentaje de organismos inmóviles para las distintas concentraciones de las 3 muestras. **b.** Valores de CL50 obtenidos a partir del modelo Probit, con un intervalo de confianza de 95 %.

En el ensayo con *Vibrio fischeri* (tabla VI-4) se observó que el mediador no presentó toxicidad mientras que tanto el colorante como los productos de decoloración fueron clasificados en la categoría “Muy tóxicos” con valores de CE50 menores a 25 %.

**Tabla VI-4.** Clasificación de las muestras analizadas según el valor de CE50 y un intervalo de confianza de 95 %, obtenido en el ensayo **Microtox®**.

| Muestra               | CE50 (%) | Clasificación |
|-----------------------|----------|---------------|
| AB172                 | 16       | Muy Tóxico    |
| Productos de reacción | 11       | Muy Tóxico    |
| Ácido violúrico       | >100     | No tóxico     |
| AR88                  | 48       | Tóxico        |
| Productos de reacción | 28       | Tóxico        |
| Vainillina            | > 100    | No tóxico     |

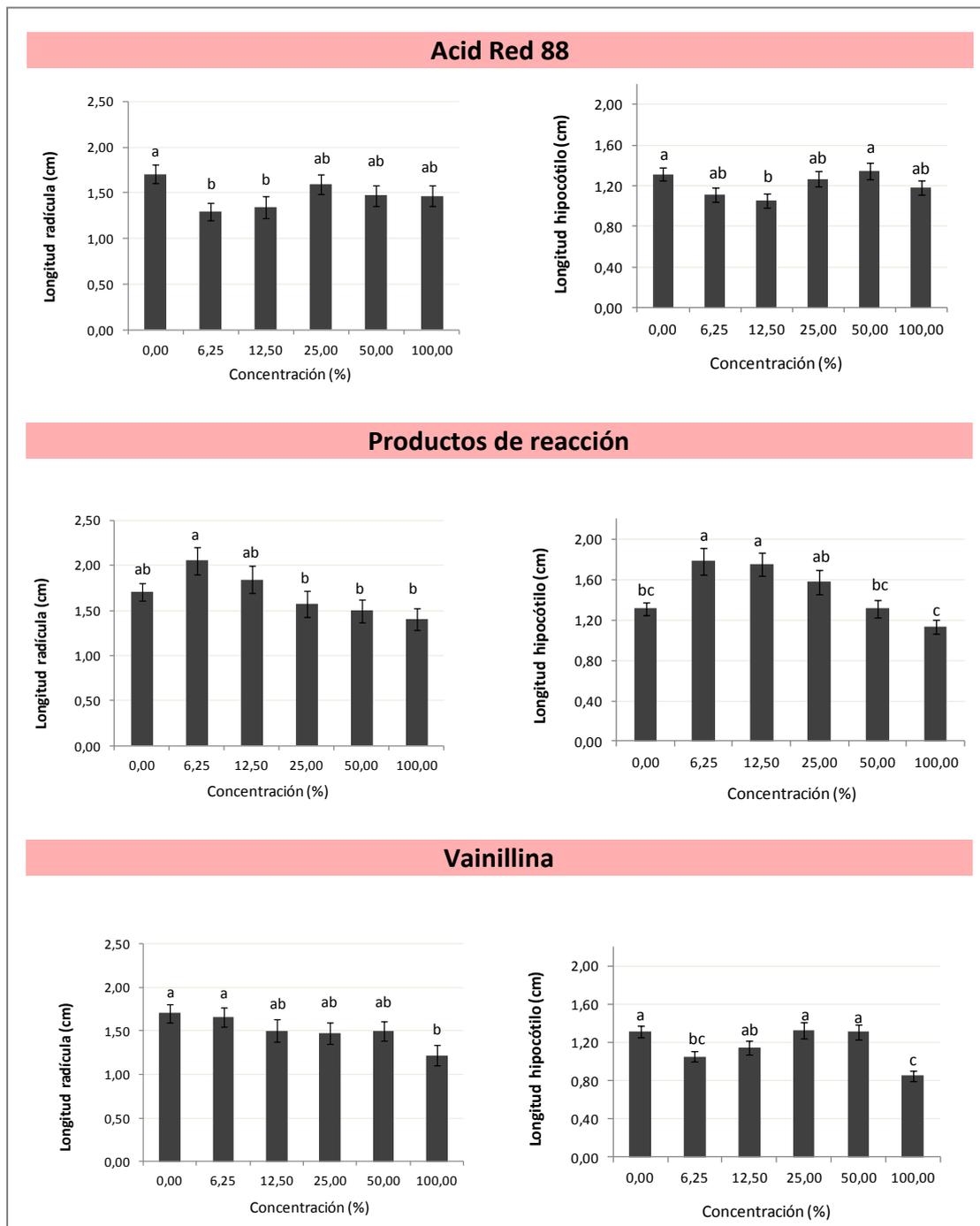
### 3.2. Resultados para el colorante Acid Red 88

En el bioensayo con *Lactuca sativa* AR88 presentó un comportamiento semejante a AB172 ya que no causó el efecto letal de **inhibición de la germinación**, así como tampoco lo hizo la solución de vainillina ni la de los productos de degradación de este colorante (**tabla VI -3**). Si bien se encontró un mayor número de semillas no germinadas en este ensayo, no hubo diferencias significativas respecto al control. La mayor variabilidad y menor viabilidad de las semillas registradas en este caso se puede explicar por la utilización de un lote diferente de semillas respecto al ensayo de AB172.

Por otro lado, no se observó un efecto tóxico para el colorante ni los productos de decoloración en las concentraciones ensayadas sobre la **elongación de radícula e hipocótilo (fig. VI -6)**. Se repitió el efecto de hormesis dado por los productos de decoloración el cual en este caso se presenta sobre la elongación de la radícula y también sobre la elongación del hipocótilo, siendo más importante el efecto en la segunda respuesta.

En cuanto al mediador redox a diferencia del ensayo anterior, no se observó el efecto de hormesis. Por otro lado, se observó un efecto inhibitorio con la mayor concentración ensayada (0.1 mM) sobre elongación de radícula y de hipocótilo. Dicho efecto no debería interferir en la respuesta observada para la mezcla de productos ya que no se detectó vainillina en el medio de reacción a las 24 h (ver Capítulo V). Esta suposición coincide con el resultado obtenido para la muestra de los productos, para la que no hubo diferencias significativas en la concentración 100 % respecto al control negativo, en ninguna de las dos respuestas.

Al igual que para el colorante AB172, en el ensayo **Microtox® (tabla VI -4)** el mediador redox no mostró toxicidad con un valor de concentración efectiva media mayor al 100 %. Por otro lado, no se encontró una variación entre la muestra del colorante y la de los productos de degradación, siendo ambas categorizadas como “tóxicas” según la clasificación adoptada por la DINAMA, por presentar un valor de CE50 comprendido entre 25 y 50 %.



**Figura VI-6.** Efecto de las muestras “AR88”, “productos de la reacción de degradación de AR88” y “Vainillina” en el desarrollo de plántulas de *L. sativa var crespa*. Se muestran los resultados de las dos respuestas registradas: a la izquierda “longitud de la radícula” y a la derecha “longitud del hipocótilo”. Los resultados con igual letra indican que no difieren significativamente según el test estadístico de comparación de medias Tukey ( $p > 0.05$ ).

### 3.3. Discusión

En relación a los ensayos de toxicidad aguda realizados en este trabajo, se pudo comprobar que:

- los productos del tratamiento enzimático de los colorantes AR88 y AB172 resultaron con igual toxicidad aguda que dichos colorantes, al evaluar el efecto inhibitorio en la bioluminiscencia del microorganismo *Vibrio fischeri*
- en el ensayo de fitotoxicidad ninguno de los colorantes presentó toxicidad aguda, al igual que los productos de ambas reacciones de decoloración, para ninguna de las respuestas evaluadas. Además, se constató un efecto estimulante sobre el desarrollo de las plántulas de *L. sativa* para las concentraciones bajas de las dos mezclas de productos de reacción
- para el organismo acuático *D. magna* se observó mayor toxicidad en los productos de decoloración de Acid Black 172 respecto al colorante

Es importante resaltar que los resultados de estudios de ecotoxicidad son dependientes tanto de la estructura química de los colorantes, como de la metodología utilizada en el o los bioensayos seleccionados (modelo biológico implicado, punto final evaluado y expresión de resultados), por lo que resulta compleja una comparación con otros datos bibliográficos.

En general, para evaluar la toxicidad de colorantes y de los productos obtenidos en el tratamiento de decoloración empleado se han aplicado ensayos biológicos que involucran procedimientos y organismos de prueba muy diversos [94]. En relación a los organismos de prueba, las especies utilizadas pertenecen a grupos taxonómicos muy distantes, por ejemplo se ha estudiado la toxicidad sobre crustáceos como *D. magna* [281–285] o *Artemia salina* [286–288], sobre animales y células animales [289,290], bacterias (citotoxicidad e inhibición de la respiración) [104,291–295], levaduras y hongos [105,296–298], bacterias bioluminiscentes (Microtox®) [299–302], especies vegetales (germinación de semillas) [242,286,288,303,304], etc.

En algunos trabajos se utiliza un único bioensayo mientras que en otros, al igual que en el presente, se combinaron diferentes bioensayos para evaluar toxicidad sobre distintos organismos, incluyendo en ciertos casos estudios de citotoxicidad y

mutagenicidad [94,305–307]. Por otro lado, usualmente se utiliza una única concentración del compuesto o muestra a analizar, siendo menos frecuentes los casos donde se analiza una serie de concentraciones para aplicar parámetros como CL50, CE50, NOEC o LOEC como criterio de toxicidad.

El empleo de una batería de bioensayos, es decir ensayos que utilicen organismos ecológicamente representativos de diferentes rangos taxonómicos, permite obtener una imagen más realista del impacto ambiental que puede generar un compuesto químico o mezcla de compuestos al ser introducidos en determinado ecosistema.

De los organismos utilizados en este trabajo el que presentó mayor sensibilidad fue la bacteria *V. fischeri*. Esto coincide con lo conocido para este bioensayo, al que además de una gran sensibilidad se le atribuye una buena correlación con resultados obtenidos en peces y *Daphnia*, por lo que se lo ha adoptado como ensayo de referencia para evaluación de toxicidad aguda en medio acuático [308–310].

Para el ensayo Microtox®, ambos colorantes así como las mezclas de productos de reacción (si se consideran como una única sustancia) presentaron valores de CE50 mayores a 10 mg/L e inferiores a 100 mg/L, al igual que los valores de CL50 obtenidos en el ensayo de *D. magna* para el colorante AB172 y los productos de decoloración. De acuerdo a criterios establecidos por el Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de clasificación y etiquetado de sustancias químicas, estas muestras se clasifican como “nocivo para el medio ambiente acuático” (categoría 3 de peligros agudos) [272]. Este sistema desarrollado por las Naciones Unidas armoniza los criterios empleados para la clasificación y el etiquetado de sustancias químicas proporcionando las bases para uniformizar la información relativa a los peligros que puedan presentar [99]. En el SGA dentro de la clase de “peligros para el medio ambiente acuático” se incluye tres categorías de peligro agudo y cuatro categorías de peligro a largo plazo o crónico. La propiedad que define el peligro agudo es la toxicidad aguda sobre organismos acuáticos, determinada mediante ensayos realizados sobre crustáceos (*Daphnia*), peces y algas. De esta forma, los valores de CE50, CL50 y CI50 obtenidos mediante estos ensayos permiten la categorización de la sustancia. La categoría 3, definida para valores comprendidos entre 10 y 100 mg/L, en la que se encuentran las muestras analizadas en este trabajo, es la de menor toxicidad acuática aguda, mientras que las muestras para las que se obtienen valores mayores a 100 mg/L no deben ser

categorizadas y se consideran no peligrosas para el medio ambiente acuático. Para dicha categorización se utiliza el resultado del bioensayo más sensible de los aplicados.

En relación al colorante AB172, el resultado obtenido concuerda con lo reportado en la ficha de seguridad del producto de la empresa Huntsman Textile Effects (utilizado en este trabajo) (**Anexo VI-3**). En la misma se informó un valor CL50 de 17 mg/L para el ensayo con el pez cebrá (OECD 203), el cual resultó de mayor sensibilidad. En este reporte el valor de CE50 obtenido para el ensayo de *Daphnia* (OECD 202) fue 79 mg/L, mayor al observado en el presente trabajo, si bien la categorización según el SGA no varía.

Para el colorante AR88 no fue posible encontrar información ecotoxicológica en hojas de seguridad (**Anexo VI-4**). Únicamente una de la empresa MP Biomedicals en la cual se informa que el compuesto puede causar efectos adversos a largo plazo en el medio ambiente acuático, pero no se indica cuál fue el bioensayo de toxicidad crónica utilizado ni el resultado del mismo (**Anexo VI-4 B**).

Contrariamente a lo observado para los organismos acuáticos, en el ensayo de fitotoxicidad, ninguno de los colorantes ni los productos de degradación mostraron toxicidad para *Lactuca sativa*, con valores de CE50 > 100 mg/L.

Esta variación en el grado de toxicidad para una misma muestra dependiente de los organismos que involucren los bioensayos utilizados confirma la importancia de la utilización de una Batería de bioensayos.

Si bien en general se espera una reducción en la toxicidad de la solución de colorante o del efluente acompañando la eliminación del color lograda a través de distintas metodologías, ya sea con tratamientos fisicoquímicos o biológicos, es importante considerar que no necesariamente esto coincide con lo observado. Es así que en numerosos estudios se ha reportado detoxificación [289,293,295,296,303,305,306], mientras que en otros trabajos la toxicidad no es modificada o incluso la misma aumenta como consecuencia del tratamiento para determinados organismos de prueba y colorantes [106,242,286,288,299,311,312]. Por lo tanto se ha demostrado que no existe una correlación estricta entre decoloración y detoxificación, lo cual ha sido observado también en estudios donde se aplica el tratamiento enzimático con lacasa [104,291,307,313,314]. Es así que resulta fundamental la verificación de la

disminución de la toxicidad con el proceso de decoloración, para evaluar una potencial aplicación del mismo.

Es posible realizar un análisis por separado en base a los resultados obtenidos para los distintos bioensayos y de acuerdo al destino final del agua tratada o efluente, el cual puede ser por ejemplo vertido en un curso de agua así como utilizado como agua de riego.

Para el vertido de efluentes en cursos de agua las concentraciones de los compuestos químicos son fijadas por organismos regulatorios, de forma tal que una vez diluidos en el cuerpo receptor no afecten a los organismos que allí habitan [99]. En nuestro país la normativa vigente que establece los límites de vertido es el Decreto “253/79 y modificativos”, en el que además se describen distintas clases de agua según el uso que se le da [100]. En la propuesta de modificación del decreto presentada por GESTA-Agua, se establece que el vertido debería cumplir con un estándar de toxicidad, empleando dos bioensayos de toxicidad como mínimo, con diferentes organismos de la cadena trófica. Dicho Estándar fija los puntos finales de toxicidad aguda del efluente en peces (CL50 96 h), dáfidos (CL50 48 h) y *Vibrio fischeri* (CL50 15 min), los cuales deben ser mayores a 75 % [102]. Por lo tanto, según la clasificación adoptada por el Laboratorio Ambiental de DINAMA (ver en 2.6.5), se recomienda que el efluente sea “levemente tóxico” o “no tóxico” para la autorización del vertido. En este caso, el nivel de toxicidad no se establece para un compuesto en particular sino para el efluente total.

Para el colorante Acid Black 172 se estima que la concentración presente en el efluente sin tratar sería de aproximadamente 30 mg/L [comunicación personal] por lo que el estándar establecido de CL50 = 75 % correspondería a 22,5 mg/L. Por consiguiente, según el ensayo con *V. fischeri* (el de mayor sensibilidad) y de acuerdo a este límite de toxicidad establecido, el efluente sin tratamiento previo no sería aceptado, ya que presenta un valor de concentración letal media de 53 % (CL50: 16 mg/L), menor al estándar. Lo mismo sucedería para el efluente (sin tener en cuenta otros componentes del mismo) si fuera tratado con el sistema lacasa-mediador, ya que se obtuvo una concentración letal media correspondiente al 37 % de la concentración estimada en el efluente (CL50: 11 mg/L).

Para el colorante Acid Red 88 no fue posible realizar una estimación similar ya que no se cuenta con el dato real de concentración aproximada en el efluente.

El otro destino posible para el agua tratada sería su uso como agua de riego para distintos cultivos, por ejemplo aquellos cuyos productos no son destinados al consumo humano [106,242,315]. Sin tener en cuenta otras características fisicoquímicas del efluente que escapan a este estudio, los resultados de fitotoxicidad obtenidos sugieren que sería viable esta aplicación para el agua tratada en la que se eliminó el color. En este caso además, dado el efecto estimulante observado sobre el desarrollo de las plántulas de lechuga, podría considerarse su aplicación como tratamiento fertilizante [276,280]. Si bien como ya se mencionó se puede encontrar en literatura diversos reportes de distintos casos de hormesis, incluyendo algunos donde se estudia la toxicidad de colorantes sintéticos [316,317], no sucede lo mismo para los estudios de decoloración de colorantes y efluentes de la industria textil. Esto se podría atribuir a que en dichos estudios no es habitual el análisis de una serie de diluciones de la muestra problema para la expresión del resultado de toxicidad por medio de un parámetro como por ejemplo CE50. Por lo tanto, el resultado obtenido en este trabajo constituye un importante hallazgo.

Finalmente, en base a las consideraciones mencionadas, se concluye que si bien el efluente no sería apto para su vertido en el medio acuático, el resultado obtenido en relación a la eliminación del color y el efecto estimulante observado sobre el desarrollo de una especie vegetal permite plantear una potencial aplicación para el método enzimático desarrollado en el tratamiento de efluentes que contengan los colorantes azoicos AR88 y AB172.

# CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

## 1. Conclusiones

A partir de cepas de basidiomicetes aisladas de plantaciones de Eucaliptus en Uruguay fue posible obtener lacasas con alta actividad catalítica.

Se optimizó la producción de lacasas a partir de los basidiomicetes *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes villosa* empleando para ello distintos diseños estadísticos de experimentos. Los mejores resultados se obtuvieron empleando cobre como inductor y un residuo forestal (corteza de *Eucalyptus grandis*) como soporte-sustrato en condiciones de estado semi-sólido.

Ambas lacasas fueron purificadas a partir de los sobrenadantes de los medios de cultivo correspondientes. Se ensayaron diferentes protocolos de purificación logrando optimizar este proceso. En el caso de la lacasa de *T. villosa* se empleó en forma secuencial: precipitación salina, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de intercambio aniónico, obteniendo un factor de purificación de 24. La lacasa de *P. sanguineus* fue purificada 26 veces mediante precipitación salina y cromatografía de intercambio aniónico.

La caracterización bioquímica de ambas enzimas purificadas mostró gran similitud entre ellas. El patrón electroforético obtenido mediante electroforesis desnaturante expuso la presencia de una cadena polipeptídica de peso molecular cercano a 80 kDa. Ambas presentaron carácter ácido, con puntos isoelectricos menores a 4.0, tal como se encuentra reportado en general para lacasas fúngicas y el rango de pH óptimo se encontró en el entorno de 3.0.

Por otra parte, dichas enzimas mostraron muy buena estabilidad térmica (entre 4 y 50 °C) y conservaron su actividad en un amplio rango de pH. La lacasa de *P. sanguineus* presentó mayor afinidad por el sustrato ABTS, ya que su  $K_M$  fue la mitad de la obtenida con la lacasa de *T. villosa*.

Se obtuvo un derivado insoluble en base a lacasa de *T. villosa* inmovilizada mediante el método covalente reversible en tiolsulfonato-agarosa, con elevado rendimiento de inmovilización y alta eficiencia de unión. Este biocatalizador presentó

propiedades similares a las de la enzima en solución si bien mostró mayor estabilidad térmica, conservando 20 % de su actividad inicial luego de una incubación de una hora a 70 °C. Por otro lado, se demostró la posibilidad de su reutilización en un proceso de decoloración en el cual luego de cuatro usos consecutivos mantuvo 80 % de su capacidad operativa.

Si bien no fue posible inmovilizar la lacasa de *Pycnoporus sanguineus* mediante el método covalente reversible se logró su inmovilización por adsorción en el intercambiador aniónico DEAE-Sephadex®.

La lacasa producida por *P. sanguineus* fue capaz de degradar dos colorantes de tipo azoico (AR88 y RB5) y a Lanaset Grey G, una mezcla de colorantes que forman complejos con metales (estructura no conocida). La adición de mediador redox permitió no solo que dicha enzima catalizara el proceso de decoloración sino que en varios casos mejoró su eficiencia.

La lacasa producida por *T. villosa* mostró una gran capacidad para degradar colorantes antraquinónicos (RBBR) y azoicos (AR88 y AB172). Estos representan las principales clases de colorantes sintéticos utilizados en la industria textil. Por otro lado, se demostró la viabilidad de la aplicación del derivado insoluble desarrollado en reacciones de decoloración.

La degradación de AR88 y AB172 alcanzada permitiría evitar el impacto ambiental asociado a la reducción de entrada de luz en los cursos de agua y al efecto visual negativo que causa el color, originados por una eventual descarga de un efluente que contenga estos colorantes. La ecotoxicidad de estos compuestos recalcitrantes y de los productos obtenidos en su degradación es otro aspecto fundamental relacionado al impacto ambiental generado. En este trabajo se utilizaron tres bioensayos basados en el estudio de la toxicidad aguda con diferentes organismos: *Daphnia magna*, *Lactuca sativa* y *Vibrio fischeri*.

Se comprobó que tanto los colorantes AB172 y AR88 como los productos de su biotransformación resultaron no tóxicos en el bioensayo con la especie vegetal *L. sativa*. Además, para los productos de degradación de ambos colorantes se pudo observar el efecto de hormesis, un efecto estimulante a bajas dosis. Sin embargo, en el

bioensayo con *V. fischeri* (Microtox®) ambos colorantes así como los productos de biodegradación resultaron tóxicos. En el caso del ensayo con el crustáceo *Daphnia magna* los productos de decoloración de AB172 resultaron más tóxicos que el colorante sin tratar.

De esta forma, se pudo evidenciar que la decoloración no es suficiente para evitar el impacto ambiental causado por el vertido de un efluente que contenga colorantes sintéticos en un ecosistema acuático. La misma se debe estudiar asociada a bioensayos de evaluación ecotoxicológica.

Por último, la dependencia de estos resultados del sistema biológico empleado demostró la importancia de aplicar una batería de bioensayos, así como de evaluar dichos resultados en función de la normativa vigente y del destino de la muestra estudiada.

En suma, se logró obtener un derivado enzimático insoluble en base a una lacasa producida por una cepa nativa de *Trametes villosa*, con un gran potencial para degradar colorantes sintéticos utilizados en la industria textil. Dicho derivado constituye una valiosa herramienta para el diseño de procesos continuos para el tratamiento de efluentes industriales.

## **2. Perspectivas**

Se plantean los siguientes estudios como perspectivas de trabajo que surgen a partir de los resultados presentados:

- Aplicación del derivado enzimático obtenido a partir de la lacasa de *Trametes villosa* en el tratamiento de un efluente industrial que contenga colorantes sintéticos o alternativamente de una solución preparada que simule la composición de un efluente.
- Aplicación del derivado en el tratamiento de efluentes con alto contenido de fenoles de otras industrias tales como la industria papelera.
- Análisis de la estructura química de los productos de degradación obtenidos en las biotransformaciones de los colorantes sintéticos.

- Estudios de ecotoxicidad para los otros colorantes sintéticos utilizados y productos de su degradación enzimática con lacasa.
- Evaluación de la capacidad de decoloración del derivado obtenido por adsorción de la lacasa de *P. sanguineus* en DEAE-sephadex®.
- Exploración de otros métodos de inmovilización de las lacasas estudiadas, así como de otras matrices como soporte, que permitan obtener biocatalizadores insolubles con diferente resistencia química y mecánica, ampliando el rango de aplicaciones biotecnológicas de los derivados.

# Bibliografía

1. Jaworski, J. *The application of biotechnology to industrial sustainability: A primer*; Canada, 2001.
2. Frazzetto, G. White biotechnology. *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 835–837.
3. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) *The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability*; Gram, A.; Treffenfeldt, W.; Lange, U.; McIntyre, T.; Wolf, O.; Wald, S.; Yabusaki, Y., Eds.; 1st ed.; OECD Publications: Paris, 2001.
4. Xu, F. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Ind. Biotechnol.* **2005**, *1*, 38–50.
5. Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U. Industrial biotechnology—the future of green chemistry? *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007.
6. Mugdha, A.; Usha, M. Enzymatic treatment of wastewater containing dyestuffs using different delivery systems. *Sci. Revs. Chem. Commun* **2012**, *2*, 31–40.
7. Kandelbauer, A.; Cavaco-Paulo, A.; Gübitz, G. M. Biotechnological treatment of textile dye effluent. In *Environmental Aspects of Textile Dyeing*; Elsevier, 2007; pp. 212–231.
8. Ali, H. Biodegradation of synthetic dyes - A review. *Water. Air. Soil Pollut.* **2010**, *213*, 251–273.
9. Batista-viera, F. Métodos de inmovilización enzimática 1998, 1–41.
10. Brena, B.; González-Pombo, P.; Batista-Viera, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In *Immobilization of Enzymes and Cells*; Guisan, J. M., Ed.; Springer: New York, 2013; pp. 15–31.
11. Batista-Viera, F.; Ovsejevi, K.; Manta, C. Reversible covalent immobilization of enzymes via their thiol groups. In *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*; Guisan, J. M., Ed.; Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey, 2006; pp. 185–204.
12. Manta, C.; Ovsejevi, K.; Betancor, L.; Grazú, V.; Batistoni, J.; Batista-Viera, F.; Carlsson, J. Introduction of thiol-reactive structures on to soluble and insoluble proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2000**, *31*, 231.
13. Ovsejevi, K.; Grazú, V.; Batista-Viera, F.  $\beta$ -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* immobilized on to thiol-sulfinate/ thiol-sulfonate supports for lactose hydrolysis in milk and dairy by-products. *Biotechnol. Tech.* **1998**, *12*, 143–148.
14. Ovsejevi, K.; Manta, C.; Batista-Viera, F. Reversible covalent immobilization of enzymes via disulfide bonds. In *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition, Methods in Molecular Biology*; Guisan, J. M., Ed.; Springer Science+Business Media New: New York, 2013; pp. 89–116.
15. International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) IUBMB Nomenclature Committee Recommendations <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> (consultado Mar 17, 2016).
16. Yoshida, H. LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *J. Chem. Soc., Trans.* **1883**, *43*, 472–486.
17. Wong, D. W. S.; Wong, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* **2009**, *157*, 174–209.
18. Koschorreck, K.; Richter, S. M.; Swierczek, A.; Beifuss, U.; Schmid, R. D.; Urlacher, V. B. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C–C coupling and oxidation of PAHs. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *474*, 213–219.
19. Mayer, A. M.; Staples, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 551–565.

20. Rodgers, C. J.; Blanford, C. F.; Giddens, S. R.; Skamnioti, P.; Armstrong, F. A.; Gurr, S. J. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 63–72.
21. Morozova, O. V.; Shumakovich, G. P.; Gorbacheva, M. A.; Shleev, S. V.; Yaropolov, A. I. “Blue” Laccases. *Biochem.* **2007**, *72*, 1136–1150.
22. Madhavi, V.; Lele, S. S. Laccase: properties and applications. *Bioresources* **2009**, *4*, 1694–1717.
23. Strong, P. J.; Claus, H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2011**, *41*, 373–434.
24. Kallio, J. P.; Gasparetti, C.; Andberg, M.; Boer, H.; Koivula, A.; Kruus, K.; Rouvinen, J.; Hakulinen, N. Crystal structure of an ascomycete fungal laccase from *Thielavia arenaria* - common structural features of asco-laccases. *FEBS J.* **2011**, *278*, 2283–2295.
25. Bertrand, T.; Jolival, C.; Briozzo, P.; Caminade, E.; Joly, N.; Madzak, C.; Mougin, C. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7325–33.
26. Polyakov, K. M.; Fedorova, T. V.; Stepanova, E. V.; Cherkashin, E. A.; Kurzeev, S. A.; Strokopytov, B. V.; Lamzin, V. S.; Koroleva, O. V. Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 611–617.
27. Rivera-Hoyos, C. M.; Morales-Álvarez, E. D.; Poutou-Piñales, R. A.; Pedroza-Rodríguez, A. M.; Rodríguez-Vázquez, R.; Delgado-Boada, J. M. Fungal laccases. *Fungal Biol. Rev.* **2013**, *27*, 67–82.
28. Gamenara, D.; Seoane, G. A.; Saenz-Méndez, P.; de María, P. D. Enzymes involved in redox reactions: natural sources and mechanistic overview. In *Redox Biocatalysis: Fundamentals and Applications*; 2012; pp. 1–85.
29. Giardina, P.; Faraco, V.; Cinzia, P.; Piscitelli, A.; Vanhulle, S.; Sannia, G. Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 369–385.
30. Riva, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 219–226.
31. Alcalde, M. Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*; 2007; pp. 461–476.
32. Marzorati, M.; Danieli, B.; Haltrich, D.; Riva, S. Selective laccase-mediated oxidation of sugars derivatives. *Green Chem.* **2005**, *7*, 310.
33. Rodríguez Couto, S.; Toca Herrera, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 500–513.
34. Kurniawati, S.; Nicell, J. A. Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 353–361.
35. Camarero, S.; Ibarra, D.; Martínez, M. J.; Martínez, Á. T. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1775–1784.
36. Cañas, A. I.; Camarero, S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 694–705.
37. Díaz-González, M.; Vidal, T.; Tzanov, T. Phenolic compounds as enhancers in enzymatic and electrochemical oxidation of veratryl alcohol and lignins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 1693–1700.
38. Morozova, O. V.; Shumakovich, G. P.; Shleev, S. V.; Yaropolov, Y. I. Laccase-mediator

- systems and their applications: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2007**, *43*, 523–535.
39. Shumakovich, G. P.; Shleev, S. V.; Morozova, O. V.; Khohlov, P. S.; Gazaryan, I. G.; Yaropolov, A. I. Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators. *Bioelectrochemistry* **2006**, *69*, 16–24.
40. Díaz-González, M.; Vidal, T.; Tzanov, T. Electrochemical study of phenolic compounds as enhancers in laccase-catalyzed oxidative reactions. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 2249–2257.
41. Rosado, T.; Bernardo, P.; Koci, K.; Coelho, A. V.; Robalo, M. P.; Martins, L. O. Methyl syringate: An efficient phenolic mediator for bacterial and fungal laccases. *Bioresour. Technol.* **2012**, *124*, 371–378.
42. Li, K.; Xu, F.; Eriksson, K. E. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2654–60.
43. Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* **2002**, *16*, 231–240.
44. Astolfi, P.; Brandi, P.; Galli, C.; Gentili, P. New mediators for the enzyme laccase: mechanistic features and selectivity in the oxidation of non-phenolic substrates. *New J. Chem.* **2005**, *29*, 1308–1317.
45. Cantarella, G.; Galli, C.; Gentili, P. Free radical versus electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems: Catalytic or stoichiometric procedures. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2003**, *22*, 135–144.
46. D'Acunzo, F.; Galli, C.; Gentili, P.; Sergi, F. Mechanistic and steric issues in the oxidation of phenolic and non-phenolic compounds by laccase or laccase-mediator systems. The case of bifunctional substrates. *New J. Chem.* **2006**, *30*, 583.
47. Brandi, P.; Galli, C.; Gentili, P. Kinetic study of the hydrogen abstraction reaction of the benzotriazole-N-oxyl radical (BTNO) with H-donor substrates. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9521–9528.
48. D'Acunzo, F.; Baiocco, P.; Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. The radical rate-determining step in the oxidation of benzyl alcohols by two N-OH-type mediators of laccase: the polar N-oxyl radical intermediate. *New J. Chem.* **2002**, *26*, 1791–1794.
49. Galhaup, C.; Wagner, H.; Hinterstoisser, B.; Haltrich, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 529–536.
50. Senthivelan, T.; Kanagaraj, J.; Panda, R. C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2016**, *21*, 19–38.
51. Minussi, R. C.; Rossi, M.; Bologna, L.; Rotilio, D.; Pastore, G. M.; Durán, N. Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2007**, *45*, 102–107.
52. Minussi, R. C.; Pastore, G. M.; Durán, N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13*, 205–216.
53. Bezerra, T. M. D. S.; Bassan, J. C.; Santos, V. T. D. O.; Ferraz, A.; Monti, R. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 378–387.
54. Lettera, V.; Pezzella, C.; Cicatiello, P.; Piscitelli, A.; Giacobelli, V. G.; Galano, E.; Amoresano, A.; Sannia, G. Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification. *Food Chem.* **2015**, *196*, 1272–1278.

55. Moreno, A. D.; Ibarra, D.; Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M. Exploring laccase and mediators behavior during saccharification and fermentation of steam-exploded wheat straw for bioethanol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2016**, *91*, 1816–1825.
56. Jurado, M.; Prieto, A.; Martínez-Alcalá, Á.; Martínez, Á. T.; Martínez, M. J. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 6378–6384.
57. Call, H. P.; Mücke, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 163–202.
58. Shleev, S.; Persson, P.; Shumakovich, G.; Mazhugo, Y.; Yaropolov, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. Laccase-based biosensors for monitoring lignin. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 835–840.
59. Rodríguez-Delgado, M. M.; Alemán-Nava, G. S.; Rodríguez-Delgado, J. M.; Dieck-Assad, G.; Martínez-Chapa, S. O.; Barceló, D.; Parra, R. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, *74*, 21–45.
60. Wellington, K. W.; Steenkamp, P.; Brady, D. Diamination by N-coupling using a commercial laccase. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1406–14.
61. Engelmann, C.; Illner, S.; Kragl, U. Laccase initiated CC couplings: Various techniques for reaction monitoring. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 1591–1599.
62. Ibrahim, V.; Volkova, N.; Pyo, S.-H.; Mamo, G.; Hatti-Kaul, R. Laccase catalysed modification of lignin subunits and coupling to p-aminobenzoic acid. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, *97*, 45–53.
63. Kunamneni, A.; Camarero, S.; García-Burgos, C.; Plou, F. J.; Ballesteros, A.; Alcalde, M. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb. Cell Fact.* **2008**, *7*, 32.
64. Ricklefs, E.; Girhard, M.; Urlacher, V. B. Three-steps in one-pot: whole-cell biocatalytic synthesis of enantiopure (+)- and (–)-pinoresinol via kinetic resolution. *Microb. Cell Fact.* **2016**, 78–89.
65. Bassanini, I.; Gavezzotti, P.; Monti, D.; Krejzová, J.; Křen, V.; Riva, S. Laccase-catalyzed dimerization of glycosylated lignols. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *134*, 295–301.
66. Beneventi, E.; Conte, S.; Cramarossa, M. R.; Riva, S.; Forti, L. Chemo-enzymatic synthesis of new resveratrol-related dimers containing the benzo[b]furan framework and evaluation of their radical scavenger activities. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 3052–3058.
67. Gavezzotti, P.; Vavříková, E.; Valentová, K.; Fronza, G.; Kudanga, T.; Kuzma, M.; Riva, S.; Biedermann, D.; Křen, V. Enzymatic oxidative dimerization of silymarin flavonolignans. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *109*, 24–30.
68. Galante, Y. A.; Formantici, C. Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 1399–1422.
69. Filer, K. The newest old way to make enzymes. *Feed Mix* **2001**, *9*, 27–29.
70. Bertrand, B.; Martínez-Morales, F.; Trejo-Hernández, M. R. Fungal Laccases: Induction and Production. *Rev. Mex. Ing. Química* **2013**, *12*, 473–488.
71. Elisashvili, V.; Kachlishvili, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *J. Biotechnol.* **2009**, *144*, 37–42.
72. Brijwani, K.; Rigdon, A.; Vadlani, P. V Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Res.* **2010**, *2010*, 149748.
73. Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. M.; Giese, E. C.; Godoy, S. D. S.; Covizzi, L. G. Influence of

- nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Int. Microbiol.* **2007**, *10*, 177–185.
74. Majeau, J.-A.; Brar, S. K.; Tyagi, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 2331–2350.
75. Singhania, R. R.; Patel, A. K.; Soccol, C. R.; Pandey, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *44*, 13–18.
76. Rodríguez-Couto, S.; Sanromán, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem. Eng. J.* **2005**, *22*, 211–219.
77. Yazid, N. A.; Barrena, R.; Komilis, D.; Sánchez, A. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review. *Sustain.* **2017**, *9*, 1–28.
78. Thomas, L.; Larroche, C.; Pandey, A. *Current developments in solid-state fermentation*; Elsevier B.V., 2013; Vol. 81.
79. Hesseltine, C. W. Solid state fermentation-An overview. *Int. Biodeterior.* **1987**, *23*, 79–89.
80. Rodríguez-Couto, S.; Gundín, M.; Lorenzo, M.; Sanromán, M. Á. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochem.* **2002**, *38*, 249–255.
81. Economou, C. N.; Makri, A.; Aggelis, G.; Pavlou, S.; Vayenas, D. V. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 1385–1388.
82. Viniegra-González, G.; Favela-Torres, E.; Aguilar, C. N.; Romero-Gomez, S. de J.; Díaz-Godínez, G.; Augur, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.* **2003**, *13*, 157–167.
83. Hölker, U.; Höfer, M.; Lenz, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 175–186.
84. Toca-Herrera, J.; Osma, J.; Rodríguez-Couto, S. Potential of solid-state fermentation for laccase production. In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*; Méndez-Vilas, A., Ed.; Formatex, 2007; pp. 391–400.
85. Programa de Naciones Unidas Para el Desarrollo. *Documento del Proyecto PIMS 3618 URU/10/ G31. Producción de Electricidad a partir de Biomasa en Uruguay (PROBIO). Award Id 00059520. Project Id 00074451.*; 2010.
86. Society of Dyers and Colourists; American Association of Textile Chemists and Colourists Colour Index™ Explained | Colour Index <http://www.colour-index.com/ci-explained> (consultado Dic 13, 2016).
87. Baldwinson, T. M.; Shore, J. *Colorants and Auxiliaries. Organic chemistry and application properties*; Shore, J., Ed.; 2nd ed.; Society of Dyers & Colourists: Bradford, United Kingdom, 1990; Vol. 2.
88. Gürses, A.; Açıkyıldız, M.; Güneş, K.; Sadi Gürses, M. *Dyes and Pigments*; Sharma, S. K., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2016.
89. Singh, R. L.; Singh, P. K.; Singh, R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – A review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2015**, *104*, 21–31.
90. Jonstrup, M.; Kumar, N.; Murto, M.; Mattiasson, B. Sequential anaerobic–aerobic treatment of azo dyes: Decolourisation and amine degradability. *Desalination* **2011**, *280*, 339–346.
91. Kandelbauer, A.; Guebitz, G. M. Bioremediation for the Decolorization of Textile Dyes — A

- Review. In *Environmental Chemistry*; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, 2005; pp. 269–288.
92. Carneiro, P. A.; Umbuzeiro, G. A.; Oliveira, D. P.; Zanoni, M. V. B. Assessment of water contamination caused by a mutagenic textile effluent/dyehouse effluent bearing disperse dyes. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *174*, 694–699.
93. Stolz, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 69–80.
94. Bafana, A.; Devi, S. S.; Chakrabarti, T. Azo dyes: past, present and the future. *Environ. Rev.* **2011**, *19*, 350–370.
95. Newman, M. C. *Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of Pollution*; Group, T. & F., Ed.; 4th ed.; CRC Press, 2015; Vol. 1.
96. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*; Castillo Morales, G., Ed.; 1st ed.; IMTA, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Mexico., 2004.
97. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*; Ramírez Romero, P.; Mendoza Cantú, A., Eds.; 1st ed.; Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. México, 2008.
98. Sobrero, M. C. Estudio de la fitotoxicidad de metales pesados y del herbicida glifosato en ambientes acuáticos. Bioensayos con plantas vasculares como organismos diagnóstico., Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2010.
99. Planes, E.; Fuchs, J. Cuáles son los aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales. *Cienc. Invest.* **2015**, *65*, 45–62.
100. Poder Ejecutivo *Decreto 253/79*; Uruguay, 1990; pp. 1–14.
101. Intendencia de Montevideo. Servicio Evaluación de la Calidad y Control Ambiental. Parámetros de control de calidad de agua que evalúa la Intendencia de Montevideo. <http://www.montevideo.gub.uy/servicios-y-sociedad/limpieza-y-medio-ambiente/curso-de-aguanode/25040/parametros-de-control> (consultado Mar 7, 2016).
102. Ministerio Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. Gesta-Agua. *Propuesta de modificación del Decreto 253/979 y modificativos. "Normas reglamentarias para prevenir la contaminación ambiental mediante el control de las aguas"*; 2008.
103. Ministerio Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. Departamento Laboratorio ambiental. Uruguay *Compendio de Metodologías Analíticas de Referencia y Preservación de Parámetros Ambientales. Versión IV.*; 2014.
104. Abadulla, E.; Tzanov, T.; Costa, S.; Robra, K.-H.; Cavaco-Paulo, A.; Gubitz, G. M. Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3357–3362.
105. Pereira, L.; Coelho, A. V.; Viegas, C. A.; Santos, M. M. C. dos; Robalo, M. P.; Martins, L. O. Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase. *J. Biotechnol.* **2009**, *139*, 68–77.
106. Byberg, R.; Cobb, J.; Martin, L. D.; Thompson, R. W.; Camesano, T. A.; Zahraa, O.; Pons, M. N. Comparison of photocatalytic degradation of dyes in relation to their structure. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20*, 3570–3581.
107. Navarro, A. R.; Arrueta, R. G.; Maldonado, M. C. Determinación del efecto de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga, escarola y achicoria. *Rev. Toxicol.* **2006**, *23*, 125–129.

108. Haney, J. F. An-Image-based Key to the Zooplankton of North America. Version 5.0 [http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/Organisms/CCladocera/FDaphnidae/GDaphnia/Daphnia\\_magna/daphniamagna.html#1](http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/Organisms/CCladocera/FDaphnidae/GDaphnia/Daphnia_magna/daphniamagna.html#1) (consultado Mar 14, 2016).
109. Anderson, B. G.; Sewage, S.; Journal, W.; Nov, N.; Journal, W.; Anderson, G. The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. *Sewage Work. J.* **1944**, *16*, 1156–1165.
110. OECD Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test. In; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2; OECD Publishing: Paris, 2004; p. 12.
111. Nelson, E.; Sycuro, L. *Vibrio\_fischeri\_1145457864* (*Vibrio fischeri* Genome Project) [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio\\_fischeri](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischeri) (consultado Mar 14, 2016).
112. Kunkel, D. *Vibrio fischeri* Bacteria - 3049914 [http://www.visualsunlimited.com/image/I00008\\_NKk6FPg1I](http://www.visualsunlimited.com/image/I00008_NKk6FPg1I) (consultado Mar 14, 2016).
113. Modern Water Inc. Microtox M500® <http://www.modernwater.com> (consultado Mar 14, 2016).
114. Johnson, B. Microtox® Acute Toxicity Test. *Small-scale Freshw. Toxic. Investig.* **2005**, *1*, 69–105.
115. WCMUC Western Canada Microtox Users Committee *Standard procedure for MICROTOX analysis*; Gaudet, I. D., Ed.; 1994.
116. Niku-Paavola, M. L.; Raaska, L.; Itävaara, M. Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. *Mycol. Res.* **1990**, *94*, 27–31.
117. Perez, J.; Jeffries, T. W. Mineralization of <sup>14</sup>C-ring-labeled synthetic lignin correlates with the production of lignin peroxidase, not of manganese peroxidase or laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 1806–1812.
118. Branchi, B.; Galli, C.; Gentili, P. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase–ABTS oxidations: an apparent paradox. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2604.
119. Vanhulle, S.; Enaud, E.; Trovaslet, M.; Nouaimeh, N.; Bols, C. M.; Keshavarz, T.; Tron, T.; Sannia, G.; Corbisier, A. M. Overlap of laccases/cellobiose dehydrogenase activities during the decolourisation of anthraquinonic dyes with close chemical structures by *Pycnoporus* strains. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1723–1731.
120. Pointing, S. B.; Jones, E. B. G.; Vrijmoed, L. L. P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia* **2000**, *92*, 139.
121. Lu, L.; Zhao, M.; Zhang, B.-B.; Yu, S.-Y.; Bian, X.-J.; Wang, W.; Wang, Y. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 1232–1239.
122. Lomascolo, A.; Cayol, J.-L.; Roche, M.; Guo, L.; Robert, J.-L.; Record, E.; Lesage-Meessen, L.; Ollivier, B.; Sigoillot, J.-C.; Asther, M. Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monokaryotic strains for laccase hyperproduction. *Mycol. Res.* **2002**, *106*, 1193–1203.
123. Tien, M.; Kirk, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81*, 2280–4.
124. Kuwahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Gold, M. H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* **1984**, *169*, 247–250.

125. Beckman, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2000**, *57*, 101–110.
126. Eugenio, M. E.; Carbajo, J. M.; Martín, J. A.; González, A. E.; Villar, J. C. Laccase production by *Pycnoporus sanguineus* under different culture conditions. *J. Basic Microbiol.* **2009**, *49*, 433–440.
127. Vikineswary, S.; Abdullah, N.; Renuvathani, M.; Sekaran, M.; Pandey, A.; Jones, E. B. G. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 171–177.
128. Elisashvili, V.; Kachlishvili, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *J. Biotechnol.* **2009**, *144*, 37–42.
129. Viswanath, B.; Rajesh, B.; Janardhan, A.; Kumar, A. P.; Narasimha, G.; Viswanath, B.; Rajesh, B.; Janardhan, A.; Kumar, A. P.; Narasimha, G. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Res.* **2014**, *2014*, 163242.
130. Preussler, C. A.; Shimizu, E.; Villalba, L. L.; Zapata, P. D. Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* (sw.: Fr.) Kreisel. *Rev. Cienc. y Tecnol.* **2009**, *12*, 9–16.
131. Yamanaka, R.; Soares, C. F.; Matheus, D. R.; Machado, K. M. G. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. *Brazilian J. Microbiol.* **2008**, *39*, 78–84.
132. Fonseca, M. I.; Shimizu, E.; Zapata, P. D.; Villalba, L. L. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 534–539.
133. Rodríguez-Couto, S.; Osma, J. F.; Toca-Herrera, J. L. Removal of synthetic dyes by an eco-friendly strategy. *Eng. Life Sci.* **2009**, *9*, 116–123.
134. Galhaup, C.; Haltrich, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 225–232.
135. Bajwa, P. K.; Arora, D. S. Comparative production of ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Polyporus sanguineus*. *Can. J. Microbiol.* **2009**, *55*, 1397–402.
136. Rohr, C. O.; Levin, L. N.; Mentaberry, A. N.; Wirth, S. A. A first insight into *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126 transcriptome. *PLoS One* **2013**, *8*.
137. Lomascolo, A.; Uzan-Boukhris, E.; Herpoël-Gimbert, I.; Sigoillot, J. C.; Lesage-Meessen, L. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 1129–1149.
138. Kunamneni, A.; Ballesteros, A.; Plou, F. J.; Alcalde, M. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*; Méndez-Vilas, A., Ed.; Formatex, 2007; pp. 233–245.
139. Zhuo, R.; Yuan, P.; Yang, Y.; Zhang, S.; Ma, F.; Zhang, X. Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *117*, 62–72.
140. Fernández-Larrea, J.; Stahl, U. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* **1996**, *252*, 539–551.
141. Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Fontanella, B.; Sannia, G. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*,

920–4.

142. Tychanowicz, G. K.; De Souza, D. F.; Souza, C. G. M.; Kadowaki, M. K.; Peralta, R. M. Copper improves the production of laccase by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2006**, *49*, 699–704.
143. Minussi, R. C.; Pastore, G. M.; Durán, N. Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 158–164.
144. Levin, L.; Malignani, E.; Ramos, A. M. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4554–63.
145. Yaver, D. S.; Xu, D. F.; Dalbøge, H.; Schneider, P.; Aaeling, D. A. Purified *Polyporus* laccases and nucleic acids encoding same. 1995. NOVO NORDISK BIOTECH, INC, Novo, Nordisk A/s WO/1996/000290. <http://www.freepatentsonline.com>
146. Litthauer, D.; van Vuuren, M. J.; van Tonder, A.; Wolfaardt, F. W. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 563–568.
147. Trovaslet, M.; Enaud, E.; Guiavarc'h, Y.; Corbisier, A. M.; Vanhulle, S. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 368–376.
148. Dantán-González, E.; Vite-Vallejo, O.; Martínez-Anaya, C.; Méndez-Sánchez, M.; González, M. C.; Palomares, L. A.; Folch-Mallol, J. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. *Int. Microbiol.* **2008**, *11*, 163–169.
149. Eugenio, M. E.; Carbajo, J. M.; Martín, J. A.; González, A. E.; Villar, J. C. Laccase production by *Pycnoporus sanguineus* under different culture conditions. *J. Basic Microbiol.* **2009**, *49*, 433–440.
150. Thongkred, P.; Lotrakul, P.; Prasongsuk, S.; Imai, T.; Punnapayak, H. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a tropical isolate of *Pycnoporus coccineus* and its laccase. *ScienceAsia* **2011**, *37*, 225–233.
151. Ramírez-Cavazos, L. I.; Junghanns, C.; Nair, R.; Cárdenas-Chávez, D. L.; Hernández-Luna, C.; Agathos, S. N.; Parra, R. Enhanced production of thermostable laccases from a native strain of *Pycnoporus sanguineus* using central composite design. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2014**, *15*, 343–352.
152. Uzan, E.; Nousiainen, P.; Balland, V.; Sipila, J.; Piumi, F.; Navarro, D.; Asther, M.; Record, E.; Lomascolo, A. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: From gene cloning to enzyme characterization and applications. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *108*, 2199–2213.
153. Zimbardi, A. L. R. L.; Camargo, P. F.; Carli, S.; Neto, S. A.; Meleiro, L. P.; Rosa, J. C.; De Andrade, A. R.; Jorge, J. A.; Furriel, R. P. M. A high redox potential laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: Potential application for dye decolorization. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*.
154. Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658–666.
155. Eisenthal, R.; Cornish-Bowden, A. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem. J.* **1974**, *139*, 715–720.
156. Rogalski, J.; Wojtas-Wasilewska, M.; Apalovi, R.; Leonowicz, A. Affinity chromatography as a rapid and convenient method for purification of fungal laccases. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**,

37, 770–777.

157. Nishizawa, Y.; Nakabayashi, K.; Shinagawa, E. Purification and characterization of laccase from white rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2. *J. Ferment. Bioeng.* **1995**, *80*, 91–93.

158. Garcia, T. A.; Santiago, M. F.; Ulhoa, C. J. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 311–318.

159. Vite-Vallejo, O.; Palomares, L. A.; Dantán-González, E.; Ayala-Castro, H. G.; Martínez-Anaya, C.; Valderrama, B.; Folch-Mallol, J. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme Microb. Technol.* **2009**, *45*, 233–239.

160. Ramírez-Cavazos, L. I.; Junghanns, C.; Ornelas-Soto, N.; Cárdenas-Chávez, D. L.; Hernández-Luna, C.; Demarche, P.; Enaud, E.; García-Morales, R.; Agathos, S. N.; Parra, R. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *108*, 32–42.

161. Liu, J.; Yu, Z.; Liao, X.; Liu, J.; Mao, F.; Huang, Q. Scalable production, fast purification, and spray drying of native *Pycnoporus* laccase and circular dichroism characterization. *J. Clean. Prod.* **2015**, *127*, 600–609.

162. Yaver, D. S.; Xu, F.; Golightly, E. J.; Brown, K. M.; Brown, S. H.; Rey, M. W.; Schneider, P.; Halkier, T.; Mondorf, K.; Dalbøge, H. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 834–841.

163. Baldrian, P. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 215–242.

164. Garcia, T. A.; Santiago, M. F.; Ulhoa, C. J. Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylidine. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 633–636.

165. Bukh, C.; Lund, M.; Bjerrum, M. J. Kinetic studies on the reaction between *Trametes villosa* laccase and dioxygen. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1547–1557.

166. Hoshida, H.; Nakao, M.; Kanazawa, H.; Kubo, K.; Hakukawa, T.; Morimasa, K.; Akada, R.; Nishizawa, Y. Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *92*, 372–380.

167. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.

168. Batista-Viera, F.; Manta, C.; Carlsson, J. Solid-phase thiolsulfinates for the reversible immobilization of thiols. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1994**, *44*, 1–14.

169. Batista-Viera, F.; Barbieri, M.; Ovsejevi, K.; Manta, C.; Carlsson, J. A new method for reversible immobilization of thiol biomolecules based on solid-phase bound thiolsulfonate groups. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1991**, *31*, 175–195.

170. Ellman, G. L. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *74*, 443–450.

171. Yaver, D. S.; Golightly, E. J. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: Genomic organization of the laccase gene family. *Gene* **1996**, *181*, 95–102.

172. Basto, C.; Silva, C. J.; Gübitz, G.; Cavaco-Paulo, A. Stability and decolourization ability of

- Trametes villosa* laccase in liquid ultrasonic fields. *Ultrason. Sonochem.* **2007**, *14*, 355–362.
173. Jung, H.; Xu, F.; Li, K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 161–168.
174. Kunamneni, A.; Ghazi, I.; Camarero, S.; Ballesteros, A.; Plou, F. J.; Alcalde, M. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochem.* **2008**, *43*, 169–178.
175. Lu, L.; Zhao, M.; Wang, Y. Immobilization of laccase by alginate-chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *23*, 159–166.
176. Rodríguez Couto, S.; Oasma, J. F.; Saravia, V.; Gübitz, G. M.; Toca Herrera, J. L. Coating of immobilised laccase for stability enhancement: A novel approach. *Appl. Catal. A Gen.* **2007**, *329*, 156–160.
177. Fernández-Fernández, M.; Sanromán, M. Á.; Moldes, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 1808–1825.
178. Tesevic, V.; Aljancic, I.; Vajs, V.; Zivkovic, M.; Nikicevic, N.; Urosevic, I.; Vujisic, L. Development and validation of an LC- MS/MS method with a multiple reactions monitoring mode for the quantification of vanillin and syringaldehyde in plum brandies. *J. Serbian Chem. Soc.* **2014**, *79*, 1537–1543.
179. Da Silva, A. M.; Tavares, A. P. M.; Rocha, C. M. R.; Cristóvão, R. O.; Teixeira, J. A.; MacEdo, E. A. Immobilization of commercial laccase on spent grain. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 1095–1101.
180. Yang, W. Y.; Min, D. Y.; Wen, S. X.; Jin, L.; Rong, L.; Tetsuo, M.; Bo, C. Immobilization and characterization of laccase from *Chinese Rhus vernicifera* on modified chitosan. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 1378–1382.
181. Gonzalez-coronel, L. A.; Cobas, M.; Rostro-alanis, M. D. J.; Parra-saldívar, R.; Hernandez-luna, C.; Pazos, M.; Sanromán, M. Á. Immobilization of laccase of *Pycnoporus sanguineus* CS43. *N. Biotechnol.* **2016**.
182. Dai, J.; Wang, H.; Chi, H.; Wang, Y.; Zhao, J. Immobilization of laccase from *Pleurotus ostreatus* on magnetic separable SiO<sub>2</sub> support and excellent activity towards azo dye decolorization. *J. Environ. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 2585–2591.
183. Fernandes, R. A.; Daniel-da-silva, A. L.; Tavares, A. P. M.; Xavier, A. M. R. B. EDTA-Cu (II) chelating magnetic nanoparticles as a support for laccase immobilization. *Chem. Eng. Sci.* **2017**, *158*, 599–605.
184. Zille, A.; Tzanov, T.; Gübitz, G. M.; Cavaco-Paulo, A. Immobilized laccase for decolourization of reactive Black 5 dyeing effluent. *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 1473–1477.
185. Spinelli, D.; Fatarella, E.; Di Michele, A.; Pogni, R. Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization. *Process Biochem.* **2013**, *48*, 218–223.
186. Forde, J.; Tully, E.; Vakurov, A.; Gibson, T. D.; Millner, P.; Ó'Fágáin, C. Chemical modification and immobilisation of laccase from *Trametes hirsuta* and from *Myceliophthora thermophila*. *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 430–437.
187. Oasma, J. F.; Toca-Herrera, J. L.; Rodríguez-Couto, S. Biodegradation of a simulated textile effluent by immobilised-coated laccase in laboratory-scale reactors. *Appl. Catal. A Gen.* **2010**, *373*, 147–153.
188. Brandi, P.; D'Annibale, A.; Galli, C.; Gentili, P.; Pontes, A. S. N. In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase. *J. Mol. Catal. B Enzym.*

2006, 41, 61–69.

189. Rekuć, A.; Kruczkiewicz, P.; Jastrzemska, B.; Liesiene, J.; Peczyńska-Czoch, W.; Bryjak, J. Laccase immobilization on the tailored cellulose-based Granocel carriers. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, 42, 208–215.

190. Matijošytė, I.; Arends, I. W. C. E.; de Vries, S.; Sheldon, R. A. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, 62, 142–148.

191. Huang, J.; Xiao, H.; Li, B.; Wang, J.; Jiang, D. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on copper tetra-aminophthalocyanine-Fe(3)O(4) nanoparticle composite. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2006**, 44, 93–100.

192. Crestini, C.; Perazzini, R.; Saladino, R. Oxidative functionalisation of lignin by layer-by-layer immobilised laccases and laccase microcapsules. *Appl. Catal. A Gen.* **2010**, 372, 115–123.

193. Arroyo, D. M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharm.* **1998**.

194. Viera, S. E.; Batista-Viera, F.; Ovsejevi, K. Development and characterization of a solid-phase biocatalyst based on cyclodextrin glucantransferase reversibly immobilized onto thiol-sulfinate-agarose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, 167, 164–176.

195. Batista-Viera, F.; Manta, C.; Carlsson, J. Covalent binding of thiols to thiol-sulfinate-containing supports. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1996**, 24, 231–239.

196. Dias, A. A.; Bezerra, R. M.; Lemos, P. M.; Pereira, A. N. In vivo and laccase-catalysed decolorization of xenobiotic azo dyes by a basidiomycetous fungus: Characterization of its ligninolytic system. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 19, 969–975.

197. Sridhar, S.; Chinnathambi, V.; Arumugam, P.; Suresh, P. K. In silico and in vitro physicochemical screening of *Rigidoporus* sp. crude laccase-assisted decolorization of synthetic dyes—approaches for a cost-effective enzyme-based remediation Methodology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, 169, 911–922.

198. Claus, H.; Faber, G.; König, H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 59, 672–678.

199. Baldrian, P.; Šnajdr, J. Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39, 1023–1029.

200. Enayatzamir, K.; Alikhani, H. A.; Rodríguez Couto, S. Simultaneous production of laccase and decoloration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed bioreactor. *J. Hazard. Mater.* **2009**, 164, 296–300.

201. Osma, J. F.; Toca-Herrera, J. L.; Rodríguez-Couto, S. Biodegradation of a simulated textile effluent by immobilised-coated laccase in laboratory-scale reactors. *Appl. Catal. A Gen.* **2010**, 373, 147–153.

202. Cristóvão, R. O.; Amaral, P. F. F.; Tavares, A. P. M.; Coelho, M. A. Z.; Cammarota, M. C.; Loureiro, J. M.; Boaventura, R. A. R.; Macedo, E. A.; Pessoa, F. L. P. Optimization of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes in supercritical carbon dioxide medium by response surface methodology. *React. Kinet. Mech. Catal.* **2010**, 99, 311–323.

203. Roriz, M. S.; Osma, J. F.; Teixeira, J. A.; Rodríguez Couto, S. Application of response surface methodological approach to optimise Reactive Black 5 decoloration by crude laccase from *Trametes pubescens*. *J. Hazard. Mater.* **2009**, 169, 691–696.

204. Zeng, X.; Cai, Y.; Liao, X.; Zeng, X.; Li, W.; Zhang, D. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. *J. Hazard. Mater.* **2011**, 187, 517–25.

205. Wang, T.-N.; Lu, L.; Li, G.-F.; Li, J.; Xu, T.-F.; Zhao, M. Decolorization of the azo dye reactive black 5 using laccase mediator system. *African J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 17186–17191.
206. Bibi, I.; Bhatti, H. N. Biodecolorization of Reactive Black 5 by laccase- mediator system. *African J. Biotechnol.* **2012**, *11*, 7464–7471.
207. Theerachat, M.; Morel, S.; Guieysse, D.; Remaud-Simeon, Magali Chulalaksananukul, W. Comparison of synthetic dye decolorization by whole cells and a laccase enriched extract from *Trametes versicolor* DSM11269. *African J. Biotechnol.* **2012**, *11*, 1964–1969.
208. Lu, L.; Wang, T. N.; Xu, T. F.; Wang, J. Y.; Wang, C. L.; Zhao, M. Cloning and expression of thermo-alkali-stable laccase of *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Bioresour. Technol.* **2013**, *134*, 81–86.
209. Daâssi, D.; Frikha, F.; Zouari-Mechichi, H.; Belbahri, L.; Woodward, S.; Mechichi, T. Application of response surface methodology to optimize decolourization of dyes by the laccase-mediator system. *J. Environ. Manage.* **2012**, *108*, 84–91.
210. Ashrafi, S. D.; Rezaei, S.; Forootanfar, H.; Mahvi, A. H.; Faramarzi, M. A. The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiothyrium variabile*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2013**, *85*, 173–181.
211. Yang, Y.; Ding, Y.; Liao, X.; Cai, Y. Purification and characterization of a new laccase from *Shiraia* sp.SUPER-H168. *Process Biochem.* **2013**, *48*, 351–357.
212. Daâssi, D.; Rodríguez-Couto, S.; Nasri, M.; Mechichi, T. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Corioloropsis gallica* into Ca-alginate beads. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2014**, *90*, 71–78.
213. Sathishkumar, P.; Kamala-Kannan, S.; Cho, M.; Kim, J. S.; Hadibarata, T.; Salim, M. R.; Oh, B. T. Laccase immobilization on cellulose nanofiber: The catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *100*, 111–120.
214. Kumar, V. V.; Sivanesan, S.; Cabana, H. Magnetic cross-linked laccase aggregates - Bioremediation tool for decolorization of distinct classes of recalcitrant dyes. *Sci. Total Environ.* **2014**, *487*, 830–839.
215. Yeşilada, Ö.; Birhanli, E.; Ercan, S.; Özmen, N. Reactive dye decolorization activity of crude laccase enzyme from repeated-batch culture of *Funalia trogii*. *Turkish J. Biol.* **2014**, *38*, 103–110.
216. Ramírez-Montoya, L. A.; Hernández-Montoya, V.; Montes-Morán, M. A.; Jáuregui-Rincón, J.; Cervantes, F. J. Decolorization of dyes with different molecular properties using free and immobilized laccases from *Trametes versicolor*. *J. Mol. Liq.* **2015**, *212*, 30–37.
217. Bankeeree, W.; Prasongsuk, S.; Imai, T.; Lotrakul, P.; Punnapayak, H. A novel xylan-polyvinyl alcohol hydrogel bead with laccase entrapment for decolorization of Reactive Black 5. *BioResources* **2016**, *11*, 6984–7000.
218. Romero, S.; Blánquez, P.; Caminal, G.; Font, X.; Sarrà, M.; Gabarrell, X.; Vicent, T. Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. *Biochem. Eng. J.* **2006**, *31*, 42–47.
219. Blánquez, P.; Casas, N.; Font, X.; Gabarrell, X.; Sarrà, M.; Caminal, G.; Vicent, T. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Res.* **2004**, *38*, 2166–2172.
220. Baccar, R.; Blánquez, P.; Bouzid, J.; Feki, M.; Sarrá, M. Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies on adsorption of commercial dye by activated carbon derived from olive-waste cakes. *Chem. Eng. J.* **2010**, *165*, 457–464.

221. Gabarrell, X.; Font, M.; Vicent, T.; Caminal, G.; Sarrà, M.; Blánquez, P. A comparative life cycle assessment of two treatment technologies for the Grey Lanaset G textile dye: biodegradation by *Trametes versicolor* and granular activated carbon adsorption. *Int. J. Life Cycle Assess.* **2012**, *17*, 613–624.
222. Moilanen, U.; Osma, J. F.; Winqvist, E.; Leisola, M.; Couto, S. R. Decolorization of simulated textile dye baths by crude laccases from *Trametes hirsuta* and *Cerrena unicolor*. *Eng. Life Sci.* **2010**, *10*, 242–247.
223. Zimbardi, A. L. R. L.; Camargo, P. F.; Carli, S.; Neto, S. A.; Meleiro, L. P.; Rosa, J. C.; De Andrade, A. R.; Jorge, J. A.; Furriel, R. P. M. A high redox potential laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: Potential application for dye decolorization. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*.
224. Vanhulle, S.; Enaud, E.; Trovaslet, M.; Billottet, L.; Kneipe, L.; Jiwan, J.-L. H.; Corbisier, A.-M.; Marchand-Brynaert, J. Coupling occurs before breakdown during biotransformation of Acid Blue 62 by white rot fungi. *Chemosphere* **2008**, *70*, 1097–1107.
225. Pointing, S. B.; Vrijmoed, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoxidase. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *16*, 317–318.
226. Iracheta-Cárdenas, M. M.; Rocha-Peña, M. A.; Galán-Wong, L. J.; Arévalo-Niño, K.; Tovar-Herrera, O. E. A *Pycnoporus sanguineus* laccase for denim bleaching and its comparison with an enzymatic commercial formulation. *J. Environ. Manage.* **2016**, *177*, 93–100.
227. Soares, G. M. B.; Pessoa de Amorim, M. T.; Costa-Ferreira, M. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *J. Biotechnol.* **2001**, *89*, 123–129.
228. Christopher, L. P.; Yao, B.; Ji, Y. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. *Front. Energy Res.* **2014**, *2*, 1–13.
229. Osma, J. F.; Toca-Herrera, J. L.; Rodríguez-Couto, S. Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 8509–14.
230. Perlatti, B.; Fernandes da Silva, M. F. das G.; Fernandes, J. B.; Rossi Forim, M. Validation and application of HPLC-ESI-MS/MS method for the quantification of RBBR decolorization, a model for highly toxic molecules, using several fungi strains. *Bioresour. Technol.* **2012**, *124*, 37–44.
231. Smith, R. E. Dyes : Reactive. In *Van Nostrand's Encyclopedia of Chemistry*; Considine, G. D., Ed.; JohnWiley & Sons, 2005; pp. 1–7.
232. Mechichi, T.; Mhiri, N.; Sayadi, S. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. *Chemosphere* **2006**, *64*, 998–1005.
233. Zhang, M.; Wu, F.; Wei, Z.; Xiao, Y.; Gong, W. Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis*. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 92–97.
234. Osma, J. F.; Toca Herrera, J. L.; Rodríguez Couto, S. Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. *Dye. Pigment.* **2007**, *75*, 32–37.
235. Murugesan, K.; Nam, I. H.; Kim, Y. M.; Chang, Y. S. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1662–1672.
236. Guo, M.; Lu, F.; Liu, M.; Li, T.; Pu, J.; Wang, N.; Liang, P.; Zhang, C. Purification of recombinant laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 2091–2096.
237. Stoilova, I.; Krastanov, A.; Stanchev, V. Properties of crude laccase from *Trametes*

- versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2010**, *1*, 208–215.
238. Grassi, E.; Scodeller, P.; Filiel, N.; Carballo, R.; Levin, L. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2011**, *65*, 635–643.
239. Mendoza, L.; Jonstrup, M.; Hatti-Kaul, R.; Mattiasson, B. Azo dye decolorization by a laccase/mediator system in a membrane reactor: Enzyme and mediator reusability. *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *49*, 478–484.
240. Kim, H.; Lee, S.; Ryu, S.; Choi, H. T. Decolorization of remazol brilliant blue R by a purified laccase of *Polyporus brumalis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *166*, 159–164.
241. Sun, S.; Ruan, L.; Zhang, Y.; Tao, Y.; Hu, K. Decolourization characterizations of crude enzymes from a novel basidiomycete *Mycena purpureofusca*. *African J. Microbiol. Res.* **2012**, *6*, 3501–3509.
242. Sathishkumar, P.; Balan, K.; Palvannan, T.; Kamala-Kannan, S.; Oh, B.-T.; Rodríguez-Couto, S. Efficiency of *Pleurotus florida* laccase on decolorization and detoxification of the reactive dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR) under optimized conditions. *CLEAN - Soil, Air, Water* **2013**, *41*, 665–672.
243. Shi, L.; Yu, H.; Dong, T.; Kong, W.; Ke, M.; Ma, F.; Zhang, X. Biochemical and molecular characterization of a novel laccase from selective lignin-degrading white-rot fungus *Echinodontium taxodii* 2538. *Process Biochem.* **2014**, *49*, 1097–1106.
244. Khambhaty, Y.; Ananth, S.; Sreeram, K. J.; Rao, J. R.; Nair, B. U. Dual utility of a novel, copper enhanced laccase from *Trichoderma aureoviridae*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *81*, 69–75.
245. Yang, J.; Xu, X.; Yang, X.; Ye, X.; Lin, J. Cross-linked enzyme aggregates of *Cerrena* laccase: Preparation, enhanced NaCl tolerance and decolorization of Remazol Brilliant Blue Reactive. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2016**, *65*, 1–7.
246. Campos, P. A.; Levin, L. N.; Wirth, S. A. Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFC 463. *Process Biochem.* **2016**, *51*, 895–903.
247. Le, T. T.; Murugesan, K.; Lee, C.-S.; Vu, C. H.; Chang, Y.-S.; Jeon, J.-R. Degradation of synthetic pollutants in real wastewater using laccase encapsulated in core-shell magnetic copper alginate beads. *Bioresour. Technol.* **2016**, *216*, 203–210.
248. Desai, S. S.; Nityanand, C. Microbial Laccases and their Applications: A Review. *Asian J. Biotechnol.* **2011**, *3*, 98–124.
249. Konicki, W.; Sibera, D.; Mijowska, E.; Lendzion-Bieluń, Z.; Narkiewicz, U. Equilibrium and kinetic studies on acid dye Acid Red 88 adsorption by magnetic ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> spinel ferrite nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *398*, 152–160.
250. Ciobanu, G.; Harja, M.; Rusu, L.; Mocanu, A. M.; Luca, C. Acid Black 172 dye adsorption from aqueous solution by hydroxyapatite as low-cost adsorbent. *Korean J. Chem. Eng.* **2014**, *31*, 1021–1027.
251. Anandan, S.; Sathish Kumar, P.; Pugazhenthiran, N.; Madhavan, J.; Maruthamuthu, P. Effect of loaded silver nanoparticles on TiO<sub>2</sub> for photocatalytic degradation of Acid Red 88. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2008**, *92*, 929–937.
252. Madhavan, J.; Maruthamuthu, P.; Murugesan, S.; Anandan, S. Kinetic studies on visible light-assisted degradation of acid red 88 in presence of metal-ion coupled oxone reagent. *Appl. Catal. B Environ.* **2008**, *83*, 8–14.

253. Avramescu, S. M.; Mihalache, N.; Bradu, C.; Neata, M.; Udrea, I. Catalytic Ozonation of Acid Red 88 from Aqueous Solutions. *Catal. Letters* **2009**, *129*, 273–280.
254. Kumar, P. S. S.; Raj, M. R.; Anandan, S.; Zhou, M.; Ashokkumar, M. Visible light assisted photocatalytic degradation of acid red 88 using Au–ZnO nanophotocatalysts. *Water Sci. Technol.* **2009**, *60*, 1589.
255. Sathish Kumar, P. S.; Manivel, A.; Anandan, S. Synthesis of Ag-ZnO nanoparticles for enhanced photocatalytic degradation of acid red 88 in aqueous environment. *Water Sci. Technol.* **2009**, *59*, 1423.
256. Song, Y.-L.; Li, J.-T.; Chen, H. Degradation of C.I. Acid Red 88 aqueous solution by combination of Fenton's reagent and ultrasound irradiation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 578–583.
257. Tang, Q.; Jiang, W.; Zhang, Y.; Wei, W.; Lim, T. M. Degradation of Azo Dye Acid Red 88 by gas phase dielectric barrier discharges. *Plasma Chem. Plasma Process.* **2009**, *29*, 291–305.
258. Madhavan, J.; Sathish Kumar, P. S.; Anandan, S.; Grieser, F.; Ashokkumar, M. Degradation of acid red 88 by the combination of sonolysis and photocatalysis. *Sep. Purif. Technol.* **2010**, *74*, 336–341.
259. Gao, B.; Yap, P. S.; Lim, T. M.; Lim, T.-T. Adsorption-photocatalytic degradation of Acid Red 88 by supported TiO<sub>2</sub>: Effect of activated carbon support and aqueous anions. *Chem. Eng. J.* **2011**, *171*, 1098–1107.
260. Balachandran, K.; Venckatesh, R.; Sivaraj, R.; Rajiv, P. TiO<sub>2</sub> nanoparticles versus TiO<sub>2</sub>–SiO<sub>2</sub> nanocomposites: A comparative study of photo catalysis on Acid Red 88. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *128*, 468–474.
261. Özcan, A.; Gençten, M. Investigation of acid red 88 oxidation in water by means of electro-Fenton method for water purification. *Chemosphere* **2016**, *146*, 245–252.
262. Khehra, M. S.; Saini, H. S.; Sharma, D. K.; Chadha, B. S.; Chimni, S. S. Biodegradation of azo dye C.I. Acid Red 88 by an anoxic–aerobic sequential bioreactor. *Dye. Pigment.* **2006**, *70*, 1–7.
263. Coughlin, M. F.; Kinkle, B. K.; Bishop, P. L. Degradation of azo dyes containing aminonaphthol by *Sphingomonas sp* strain 1CX. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *23*, 341–346.
264. Taheri, M.; Moghaddam, M. R. A.; Arami, M. Optimization of Acid Black 172 decolorization by electrocoagulation using response surface methodology. *Iranian J. Environ. Health Sci. Eng.* **2012**, *9*, 23.
265. Yang, Y.; Wang, G.; Wang, B.; Li, Z.; Jia, X.; Zhou, Q.; Zhao, Y. Biosorption of Acid Black 172 and Congo Red from aqueous solution by nonviable *Penicillium* YW 01: Kinetic study, equilibrium isotherm and artificial neural network modeling. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 828–834.
266. Du, L.-N.; Yang, Y.-Y.; Li, G.; Wang, S.; Jia, X.-M.; Zhao, Y.-H. Optimization of heavy metal-containing dye Acid Black 172 decolorization by *Pseudomonas sp.* DY1 using statistical designs. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2010**, *64*, 566–573.
267. Du, L.-N.; Wang, S.; Li, G.; Yang, Y.-Y.; Jia, X.-M.; Zhao, Y.-H. Ecofriendly decolorisation of Cr-complex dye Acid Black 172 by a newly isolated *Pseudomonas sp.* strain DY1. *Water Sci. Technol.* **2011**, *63*, 1531–1538.
268. Du, L. N.; Wang, B.; Li, G.; Wang, S.; Crowley, D. E.; Zhao, Y. H. Biosorption of the metal-complex dye Acid Black 172 by live and heat-treated biomass of *Pseudomonas sp.* strain DY1: Kinetics and sorption mechanisms. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *205–206*, 47–54.

269. Chen, K. C.; Wu, J. Y.; Liou, D. J.; Hwang, S. C. J. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *J. Biotechnol.* **2003**, *101*, 57–68.
270. Zheng, F.; Cui, B.-K.; Wu, X.-J.; Meng, G.; Liu, H.-X.; Si, J. Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2016**, *110*, 69–78.
271. Yeşilada, Ö.; Birhanli, E.; Ercan, S.; Özmen, N. Reactive dye decolorization activity of crude laccase enzyme from repeated-batch culture of *Funalia trogii*. *Turkish J. Biol.* **2014**, *38*, 103–110.
272. United Nations Economic Commission for Europe Part 4- Environmental Hazards. In *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*; 2015.
273. Ebert, D. *Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in Daphnia [Internet]*; NCBI Bookshelf: Bethesda, Maryland, 2005.
274. Carolina Biological Supply Company Daphnia Care and Handling [Video] 2011. <https://youtu.be/sD9Tg0Qw-Yg>
275. Stebbing, A. Hormesis - the stimulation of growth by low-levels of inhibitors. *Sci. Total Environ.* **1982**, *22*, 213–234.
276. Belz, R. G.; Piepho, H. P. Variability of hormetic dose responses of the antiauxin PCIB on *Lactuca sativa* in a plant bioassay. *Weed Res.* **2013**, *53*, 418–428.
277. Calabrese, E. J.; Baldwin, L. A. HORMESIS: The dose-response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *43*, 175–197.
278. Duke, S. O.; Cedergreen, N.; Velini, E. D.; Belz, R. G. Hormesis: Is it an important factor in Herbicide use and Allelopathy? *Outlooks Pest Manag.* **2006**, *17*, 29–33(5).
279. Belz, R.; Hurle, K.; Duke, S. Dose-response—A Challenge for Allelopathy? *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.* **2005**, *3*, 173–211.
280. BELZ, R. G.; CEDERGREEN, N.; DUKE, S. O. Herbicide hormesis - can it be useful in crop production? *Weed Res.* **2011**, *51*, 321–332.
281. Verma, Y. Acute toxicity assessment of textile dyes and textile and dye industrial effluents using *Daphnia magna* bioassay. *Toxicol. Ind. Health* **2008**, *24*, 491–500.
282. Przystas, W.; Zabłocka-Godlewska, E.; Grabińska-Sota, E. Effectiveness of dyes removal by mixed fungal cultures and toxicity of their metabolites. *Water. Air. Soil Pollut.* **2013**, *224*.
283. Przystas, W.; Zabłocka-Godlewska, E.; Grabinska-Sota, E. Efficacy of fungal decolorization of a mixture of dyes belonging to different classes. *Brazilian J. Microbiol.* **2015**, *46*, 415–424.
284. Choi, Y.-S.; Seo, J.-Y.; Lee, H.; Yoo, J.; Jung, J.; Kim, J.-J.; Kim, G.-H. Decolorization and detoxification of wastewater containing industrial dyes by *Bjerkandera adusta* KUC9065. *Water, Air, Soil Pollut.* **2014**, *225*, 1801.
285. Hernández-Zamora, M.; Cristiani-Urbina, E.; Martínez-Jerónimo, F.; Perales-Vela, H. V. Irgilio; Ponce-Noyola, T.; Montes-Horcasitas, M. del C.; Cañizares-Villanueva, R. O. Iivia Bioremoval of the azo dye Congo Red by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2015**, *22*, 10811–10823.
286. Prasad, A. S. A.; Rao, K. V. B. Aerobic biodegradation of Azo dye by *Bacillus cohnii* MTCC 3616; an obligately alkaliphilic bacterium and toxicity evaluation of metabolites by different bioassay systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 7469–7481.
287. Moraes, J. R.; Bidoia, E. D. Colour degradation of simulated textile effluent by electrolytic treatment and ecotoxicological evaluation. *Water, Air, Soil Pollut.* **2015**, *226*, 402.

288. Almeida, E. J. R.; Corso, C. R. Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. *Chemosphere* **2014**, *112*, 317–322.
289. Adedayo, O.; Javadpour, S.; Taylor, C.; Anderson, W. A.; Moo-Young, M. Decolourization and detoxification of Methyl Red by aerobic bacteria from a wastewater treatment plant. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *20*, 545–550.
290. El-Rahim, W. M. A.; Khalil, W. K. B.; Eshak, M. G. Genotoxicity studies on the removal of a direct textile dye by a fungal strain, in vivo, using micronucleus and RAPD-PCR techniques on male rats. *J. Appl. Toxicol.* **2008**, *28*, 484–90.
291. Tauber, M. M.; Guebitz, G. M.; Rehorek, A. Degradation of azo dyes by laccase and ultrasound treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 2600–2607.
292. Rezaei, S.; Tahmasbi, H.; Mogharabi, M.; Firuzyar, S.; Ameri, A.; Khoshayand, M. R.; Faramarzi, M. A. Efficient decolorization and detoxification of reactive orange 7 using laccase isolated from *Paraconiothyrium variable*, kinetics and energetics. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2015**, *56*, 113–121.
293. Ben Younes, S.; Sayadi, S. Detoxification of Indigo carmine using a combined treatment via a novel trimeric thermostable laccase and microbial consortium. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, *87*, 62–68.
294. Ben Younes, S.; Bouallagui, Z.; Sayadi, S. Catalytic behavior and detoxifying ability of an atypical homotrimeric laccase from the thermophilic strain *Scytalidium thermophilum* on selected azo and triarylmethane dyes. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *79*, 41–48.
295. Ben Younes, S.; Cherif, I.; Dhouib, A.; Sayadi, S. *Trametes trogii*: A biologic powerful tool for dyes decolorization and detoxification. *Catal. Letters* **2016**, *146*, 204–211.
296. Sharma, A.; Shrivastava, B.; Kuhad, R. C. Reduced toxicity of malachite green decolorized by laccase produced from *Ganoderma* sp. rckk-02 under solid-state fermentation. *3 Biotech* **2015**, *5*, 621–631.
297. Mendes, S.; Farinha, A.; Ramos, C. G.; Leitão, J. H.; Viegas, C. A.; Martins, L. O. Synergistic action of azoreductase and laccase leads to maximal decolourization and detoxification of model dye-containing wastewaters. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 9852–9859.
298. Maalej-Kammoun, M.; Zouari-Mechichi, H.; Belbahri, L.; Woodward, S.; Mechichi, T. Malachite green decolourization and detoxification by the laccase from a newly isolated strain of *Trametes* sp. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2009**, *63*, 600–606.
299. Gottlieb, A.; Shaw, C.; Smith, A.; Wheatley, A.; Forsythe, S. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *J. Biotechnol.* **2003**, *101*, 49–56.
300. Champagne, P.-P.; Ramsay, J. a Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 2230–5.
301. López, C.; Valade, A.-G.; Combourieu, B.; Mielgo, I.; Bouchon, B.; Lema, J. M. Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ 1H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2004**, *335*, 135–149.
302. Khelifi, R.; Belbahri, L.; Woodward, S.; Ellouz, M.; Dhouib, A.; Sayadi, S.; Mechichi, T. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *175*, 802–8.
303. Rodrigues Mota, T.; Kato, C. G.; Peralta, R. A.; Bracht, A.; De Moraes, G. R.; Baesso, M. L.; Giatti Marques De Souza, C.; Peralta, R. M. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma*

- lucidum* laccase: evaluation of degradation products and toxicity. *Water. Air. Soil Pollut.* **2015**, 226.
304. Si, J.; Cui, B. K.; Dai, Y. C. Decolorization of chemically different dyes by white-rot fungi in submerged cultures. *Ann. Microbiol.* **2013**, 63, 1099–1108.
305. Chhabra, M.; Mishra, S.; Sreekrishnan, T. R. Mediator-assisted decolorization and detoxification of textile dyes/dye mixture by *Cyathus bulleri* laccase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, 151, 587–598.
306. Jadhav, S. B.; Phugare, S. S.; Patil, P. S.; Jadhav, J. P. Biochemical degradation pathway of textile dye Remazol red and subsequent toxicological evaluation by cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2011**, 65, 733–743.
307. Chhabra, M.; Mishra, S.; Sreekrishnan, T. R. Combination of chemical and enzymatic treatment for efficient decolorization/degradation of textile effluent: High operational stability of the continuous process. *Biochem. Eng. J.* **2015**, 93, 17–24.
308. Kaiser, K. L. Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environ. Health Perspect.* **1998**, 583–591.
309. ALS Global. *Microtox® Bioassay Testing System Toxicity Bioassay*; 2012.
310. Johnson, B. T. *Small-scale freshwater toxicity investigations*; Blaise, C.; Féraud, J.-F., Eds.; Springer: Dordrecht, 2005.
311. Oliveira, G. A. R.; Ferraz, E. R. A.; Chequer, F. M. D.; Grando, M. D.; Angeli, J. P. F.; Tsuboy, M. S.; Marcarini, J. C.; Mantovani, M. S.; Osugi, M. E.; Lizier, T. M.; Zanoni, M. V. B.; Oliveira, D. P. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2010**, 703, 200–208.
312. Anastasi, A.; Spina, F.; Prigione, V.; Tigini, V.; Giansanti, P.; Cristina, G. Bioresource Technology. Scale-up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera adusta*. *Bioresour. Technol.* **2010**, 101, 3067–3075.
313. Khlifi, R.; Belbahri, L.; Woodward, S.; Ellouz, M.; Dhouib, A.; Sayadi, S.; Mechichi, T. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *J. Hazard. Mater.* **2010**, 175, 802–808.
314. Benzina, O.; Daâssi, D.; Zouari-Mechichi, H.; Frikha, F.; Woodward, S.; Belbahri, L.; Rodriguez-Couto, S.; Mechichi, T. Decolorization and detoxification of two textile industry effluents by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, 20, 5177–5187.
315. Khandare, R. V.; Govindwar, S. P. Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33, 1697–1714.
316. Kastury, F.; Juhasz, A.; Beckmann, S.; Manefield, M. Ecotoxicity of neutral red (dye) and its environmental applications. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, 122, 186–192.
317. Polak, J.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Szuster-Ciesielska, A.; Wlizlo, K.; Kopycinska, M.; Sojka-Ledakowicz, J.; Lichawska-Olczyk, J. Toxicity and dyeing properties of dyes obtained through laccase-mediated synthesis. *J. Clean. Prod.* **2016**, 112, 4265–4272.

# Anexos

**ANEXO II – 1.** Diseño factorial: producción de lacasa por *P. sanguineus* en cultivo sumergido.

| Unidad experimental | Inductor | F de C   | F de N | Actividad (UE/L) |       |        |        |        | Act. máxima (UE/L) |
|---------------------|----------|----------|--------|------------------|-------|--------|--------|--------|--------------------|
|                     |          |          |        | Día 6            | Día 8 | Día 10 | Día 12 | Día 14 |                    |
| 1                   | Cobre    | Glicerol | SA     | 1.8              | -0.9  | 4.1    | 18.9   | 58.3   | 58.3               |
| 2                   | Cobre    | Glicerol | SA     | 5.8              | 2.8   | 17.3   | 17.9   | 19.8   | 19.8               |
| 3                   | Cobre    | Glicerol | Urea   | 0.1              | 147.9 | 371.3  | 342.0  | 431.6  | 431.6              |
| 4                   | Cobre    | Glicerol | Urea   | 4.5              | 17.3  | 27.6   | 53.9   | 93.9   | 93.9               |
| 5                   | Cobre    | Glucosa  | SA     | 80.4             | 7.5   | 5.8    | 103.2  | 177.7  | 177.7              |
| 6                   | Cobre    | Glucosa  | SA     | 14.7             | 11.5  | 8.9    | 9.5    | 10.8   | 14.7               |
| 7                   | Cobre    | Glucosa  | Urea   | 12.3             | 58.0  | 59.4   | 98.1   | 152.1  | 152.1              |
| 8                   | Cobre    | Glucosa  | Urea   | 45.0             | 70.5  | 113.6  | 134.6  | 45.3   | 134.6              |
| 9                   | Gálico   | Glicerol | SA     | -7.2             | 6.3   | 16.7   | 13.0   | 7.1    | 16.7               |
| 10                  | Gálico   | Glicerol | SA     | -2.4             | 5.9   | 24.0   | 32.0   | 42.8   | 42.8               |
| 11                  | Gálico   | Glicerol | Urea   | 30.0             | 48.6  | 74.3   | 89.2   | 94.5   | 94.5               |
| 12                  | Gálico   | Glicerol | Urea   | 52.4             | 87.7  | 145.1  | 205.1  | 258.8  | 258.8              |
| 13                  | Gálico   | Glucosa  | SA     | -4.0             | 4.4   | 24.5   | 28.5   | 19.9   | 28.5               |
| 14                  | Gálico   | Glucosa  | SA     | -0.9             | -1.9  | 15.9   | 30.6   | 47.3   | 47.3               |
| 15                  | Gálico   | Glucosa  | Urea   | 73.0             | 140.4 | 198.6  | 199.5  | 166.5  | 199.5              |
| 16                  | Gálico   | Glucosa  | Urea   | 109.7            | 215.9 | 280.1  | 253.5  | 330.0  | 330.0              |
| 17                  | Nudos    | Glicerol | SA     | -3.7             | 28.6  | 84.1   | 88.7   | 90.2   | 90.2               |
| 18                  | Nudos    | Glicerol | SA     | 17.0             | 18.8  | 8.6    | 88.7   | 282.9  | 282.9              |
| 19                  | Nudos    | Glicerol | SA     | 12.3             | 17.0  | 51.8   | 156.5  | 193.9  | 193.9              |
| 20                  | Nudos    | Glicerol | SA     | 34.2             | 36.0  | 80.1   | 148.3  | 242.6  | 242.6              |
| 21                  | Nudos    | Glicerol | Urea   | 43.4             | 96.3  | 137.9  | 153.5  | 181.7  | 181.7              |
| 22                  | Nudos    | Glicerol | Urea   | 80.1             | 130.1 | 217.9  | 244.4  | 400.5  | 400.5              |
| 23                  | Nudos    | Glicerol | Urea   | 82.3             | 109.0 | 196.1  | 215.7  | 240.4  | 240.4              |
| 24                  | Nudos    | Glicerol | Urea   | 22.2             | 37.5  | 18.6   | 152.2  | 219.4  | 219.4              |
| 25                  | Nudos    | Glucosa  | SA     | 10.1             | 34.0  | 70.3   | 47.6   | 24.6   | 70.3               |
| 26                  | Nudos    | Glucosa  | SA     | -4.4             | 93.2  | 198.2  | 215.3  | 183.8  | 215.3              |
| 27                  | Nudos    | Glucosa  | SA     | 35.5             | 39.6  | 48.7   | 139.6  | 229.9  | 229.9              |
| 28                  | Nudos    | Glucosa  | SA     | 8.7              | 22.6  | 19.4   | 60.5   | 53.6   | 60.5               |
| 29                  | Nudos    | Glucosa  | Urea   | -1.7             | 0.1   | 1.7    | 0.2    | 1.3    | 1.7                |
| 30                  | Nudos    | Glucosa  | Urea   | 23.9             | 43.2  | 95.0   | 359.8  | 343.1  | 359.8              |
| 31                  | Nudos    | Glucosa  | Urea   | 23.2             | 16.5  | 11.7   | 131.6  | 151.1  | 151.1              |
| 32                  | Nudos    | Glucosa  | Urea   | 27.5             | 35.3  | 3.1    | 97.8   | 462.8  | 462.8              |
| 33                  | No       | Glicerol | SA     | 0.3              | -1.8  | -0.3   | -1.9   | 0.0    | 0.3                |
| 34                  | No       | Glicerol | SA     | -0.1             | 0.1   | -0.4   | -0.1   | -2.3   | 0.1                |
| 35                  | No       | Glicerol | Urea   | -0.4             | -0.9  | -0.3   | -1.2   | 0.8    | 0.8                |
| 36                  | No       | Glicerol | Urea   | 22.4             | 66.5  | 127.4  | 49.2   | 1.4    | 127.4              |
| 37                  | No       | Glucosa  | SA     | -1.0             | -2.4  | -1.2   | -1.7   | 6.7    | 6.7                |
| 38                  | No       | Glucosa  | SA     | 0.1              | 0.1   | -2.9   | -3.3   | 11.1   | 11.1               |
| 39                  | No       | Glucosa  | Urea   | -1.1             | 0.9   | 0.2    | -0.1   | -1.5   | 0.9                |
| 40                  | No       | Glucosa  | Urea   | -1.2             | -0.2  | -0.6   | -2.4   | -2.6   | -0.2               |

F de C: fuente de carbono, F de N: fuente de nitrógeno, SA: sulfato de amonio.

Se indica en gris la medida de actividad máxima para cada unidad experimental.

**ANEXO II – 2.** Diseño factorial fraccionado (estudio exploratorio): producción de lacasa por *P. sanguineus* en cultivo semi-sólido.

| Unidad exp. | Glucosa (g/L) | GLiceroL (g/L) | Peptona caseína (g/L) | Urea (g/L) | Extracto levadura (g/L) | Sustrato (g) | pH  | Tiempo incubación (días) | Actividad (UE/L) |
|-------------|---------------|----------------|-----------------------|------------|-------------------------|--------------|-----|--------------------------|------------------|
| 1           | 5.0           | 20.0           | 2.0                   | 20.0       | 20.0                    | 0.72         | 6.0 | 7                        | 0.0              |
| 2           | 20.0          | 20.0           | 20.0                  | 20.0       | 20.0                    | 2.0          | 6.0 | 14                       | 0.0              |
| 3           | 20.0          | 20.0           | 2.0                   | 2.0        | 2.0                     | 2.0          | 6.0 | 7                        | 0.0              |
| 4           | 20.0          | 5.0            | 20.0                  | 2.0        | 2.0                     | 2.0          | 3.0 | 14                       | 1618.1           |
| 5           | 5.0           | 5.0            | 20.                   | 2.0        | 2.0                     | 0.72         | 3.0 | 7                        | 0.0              |
| 6           | 5.0           | 5.0            | 20.0                  | 2.0        | 20.0                    | 2.0          | 6.0 | 7                        | 4.1              |
| 7           | 12.5          | 12.5           | 11.0                  | 11.0       | 11.0                    | 1.36         | 4.5 | 10.5                     | 15.0             |
| 8           | 5.0           | 5.0            | 20.0                  | 20.0       | 20.0                    | 0.72         | 3.0 | 14                       | 69.6             |
| 9           | 20.0          | 20.0           | 2.0                   | 20.0       | 2.0                     | 0.72         | 3.0 | 14                       | 0.0              |
| 10          | 12.5          | 12.5           | 11.0                  | 11.0       | 11.0                    | 1.36         | 4.5 | 10.5                     | 28.3             |
| 11          | 5.0           | 5.0            | 2.0                   | 2.0        | 2.0                     | 0.72         | 3.0 | 7                        | 39.2             |
| 12          | 12.5          | 12.5           | 11.0                  | 11.0       | 11.0                    | 1.36         | 4.5 | 10.5                     | 0.0              |
| 13          | 5.0           | 20.0           | 20.0                  | 20.0       | 2.0                     | 2.0          | 3.0 | 7                        | 0.0              |
| 14          | 5.0           | 20.0           | 20.0                  | 2.0        | 2.0                     | 0.72         | 6.0 | 14                       | 0.0              |
| 15          | 20.0          | 5.0            | 20.0                  | 20.0       | 2.0                     | 0.72         | 6.0 | 7                        | 0.0              |
| 16          | 5.0           | 5.0            | 2.0                   | 20.0       | 2.0                     | 2.0          | 6.0 | 14                       | 0.0              |
| 17          | 12.5          | 12.5           | 11.0                  | 11.0       | 11.0                    | 1.36         | 4.5 | 10.5                     | 6.0              |
| 18          | 20.0          | 5.0            | 20.0                  | 20.0       | 2.0                     | 0.72         | 6.0 | 7                        | 0.0              |
| 19          | 20.0          | 5.0            | 2.0                   | 2.0        | 20.0                    | 0.72         | 6.0 | 14                       | 144.9            |
| 20          | 5.0           | 20.0           | 20.0                  | 20.0       | 2.0                     | 2.0          | 3.0 | 7                        | 0.0              |
| 21          | 20.0          | 5.0            | 2.0                   | 20.0       | 20.0                    | 2.0          | 3.0 | 7                        | 0.0              |
| 22          | 5.0           | 5.0            | 20.0                  | 2.0        | 20.0                    | 2.0          | 6.0 | 7                        | 0.0              |
| 23          | 5.0           | 5.0            | 2.0                   | 20.0       | 2.0                     | 2.0          | 6.0 | 14                       | 0.0              |
| 24          | 20.0          | 20.0           | 20.0                  | 2.0        | 20.0                    | 0.72         | 3.0 | 7                        | 43.7             |
| 25          | 20.0          | 20.0           | 20.0                  | 2.0        | 20.0                    | 0.72         | 3.0 | 7                        | 83.1             |
| 26          | 5.0           | 20.0           | 2.0                   | 2.0        | 20.0                    | 2.0          | 3.0 | 14                       | 1095             |
| 27          | 20.0          | 5.0            | 2.0                   | 20.0       | 20.0                    | 2.0          | 3.0 | 7                        | 0.0              |
| 28          | 5.0           | 5.0            | 20.0                  | 20.0       | 20.0                    | 0.72         | 3.0 | 14                       | 0.0              |
| 29          | 20.0          | 20.0           | 2.0                   | 2.0        | 2.0                     | 2.0          | 6.0 | 7                        | 4.1              |
| 30          | 20.0          | 20.0           | 2.0                   | 20.0       | 2.0                     | 0.72         | 3.0 | 14                       | 0.0              |
| 31          | 20.0          | 20.0           | 20.0                  | 20.0       | 20.0                    | 2.0          | 6.0 | 14                       | 0.0              |
| 32          | 5.0           | 20.0           | 2.0                   | 2.0        | 20.0                    | 2.0          | 3.0 | 14                       | 1440             |
| 33          | 5.0           | 20.0           | 20.0                  | 2.0        | 2.0                     | 0.72         | 6.0 | 14                       | 0.0              |
| 34          | 20.0          | 5.0            | 2.0                   | 2.0        | 20.0                    | 0.72         | 6.0 | 14                       | 146.4            |
| 35          | 5.0           | 20.0           | 2.0                   | 20.0       | 20.0                    | 0.72         | 6.0 | 7                        | 0.0              |
| 36          | 20.0          | 5.0            | 20.0                  | 2.0        | 2.0                     | 2.0          | 3.0 | 14                       | 313.1            |

**ANEXO II – 3 A.** Diseño factorial completo  $2^4$  - producción de lacasa por *P. sanguineus* en cultivo semi-sólido.

**A.** Actividad medida para todas las unidades experimentales del diseño.

| Unidad exp. | pH         | Extracto levadura (g/L) | Glucosa (g/L) | Sustrato (g) | Actividad (UE/L) |
|-------------|------------|-------------------------|---------------|--------------|------------------|
| <b>1</b>    | <b>3.0</b> | <b>10.0</b>             | <b>5.0</b>    | <b>3.0</b>   | <b>2977.5</b>    |
| 2           | 5.0        | 10.0                    | 5.0           | 1.0          | 300.0            |
| 3           | 3.0        | 10.0                    | 10.0          | 3.0          | 2535.0           |
| 4           | 5.0        | 20.0                    | 10.0          | 1.0          | 547.5            |
| 5           | 3.0        | 10.0                    | 10.0          | 1.0          | 16.1             |
| 6           | 5.0        | 20.0                    | 5.0           | 3.0          | 2396.3           |
| 7           | 3.0        | 20.0                    | 5.0           | 3.0          | 1387.5           |
| 8           | 5.0        | 10.0                    | 5.0           | 1.0          | 450.0            |
| 9           | 3.0        | 20.0                    | 10.0          | 3.0          | 536.3            |
| 10          | 3.0        | 20.0                    | 5.0           | 3.0          | 581.3            |
| 11          | 3.0        | 10.0                    | 5.0           | 1.0          | 571.9            |
| <b>12</b>   | <b>3.0</b> | <b>10.0</b>             | <b>5.0</b>    | <b>3.0</b>   | <b>2722.5</b>    |
| 13          | 5.0        | 20.0                    | 10.0          | 3.0          | 1571.3           |
| 14          | 5.0        | 10.0                    | 10.0          | 1.0          | 446.3            |
| 15          | 3.0        | 10.0                    | 5.0           | 1.0          | 67.1             |
| 16          | 5.0        | 10.0                    | 5.0           | 3.0          | 1878.8           |
| 17          | 4.0        | 15.0                    | 7.5           | 2.0          | 1061.3           |
| 18          | 3.0        | 20.0                    | 10.0          | 1.0          | 208.5            |
| 19          | 5.0        | 20.0                    | 5.0           | 3.0          | 1721.3           |
| 20          | 5.0        | 20.0                    | 10.0          | 3.0          | 1162.5           |
| 21          | 3.0        | 20.0                    | 5.0           | 1.0          | 483.8            |
| 22          | 5.0        | 10.0                    | 10.0          | 3.0          | 2088.8           |
| 23          | 4.0        | 15.0                    | 7.5           | 2.0          | 1612.5           |
| 24          | 5.0        | 20.0                    | 10.0          | 1.0          | 468.8            |
| 25          | 5.0        | 20.0                    | 5.0           | 1.0          | 476.3            |
| 26          | 5.0        | 10.0                    | 10.0          | 3.0          | 1500.0           |
| 27          | 4.0        | 15.0                    | 7.5           | 2.0          | 997.5            |
| 28          | 3.0        | 20.0                    | 10.0          | 1.0          | 622.5            |
| 29          | 4.0        | 15.0                    | 7.5           | 2.0          | 960.0            |
| 30          | 5.0        | 10.0                    | 5.0           | 3.0          | 1485.0           |
| 31          | 5.0        | 20.0                    | 5.0           | 1.0          | 416.3            |
| 32          | 3.0        | 20.0                    | 10.0          | 3.0          | 382.5            |
| 33          | 3.0        | 20.0                    | 5.0           | 1.0          | 1158.8           |
| 34          | 3.0        | 10.0                    | 10.0          | 1.0          | 4.5              |
| 35          | 5.0        | 10.0                    | 10.0          | 1.0          | 333.8            |
| 36          | 3.0        | 10.0                    | 10.0          | 3.0          | 2865.0           |

**ANEXO II – 3 B.** Diseño factorial completo  $2^4$  - producción de lacasa por *P. sanguineus* en cultivo semi-sólido.

**B.** Respuestas observadas y valores predichos por el modelo ajustado para los 16 tratamientos y el punto central del diseño factorial completo.

| pH         | Extracto levadura (g/L) | Glucosa (g/L) | Corteza (g) | ln (Act)     |             |
|------------|-------------------------|---------------|-------------|--------------|-------------|
|            |                         |               |             | Experimental | Predicho    |
| 3.0        | 10.0                    | 5.0           | 1.0         | 5.28         | 5.12        |
| <b>3.0</b> | <b>10.0</b>             | <b>5.0</b>    | <b>3.0</b>  | <b>7.95</b>  | <b>8.14</b> |
| 3.0        | 10.0                    | 10.0          | 1.0         | 2.14         | 2.28        |
| 3.0        | 10.0                    | 10.0          | 3.0         | 7.90         | 7.75        |
| 3.0        | 20.0                    | 5.0           | 1.0         | 6.62         | 6.76        |
| 3.0        | 20.0                    | 5.0           | 3.0         | 6.80         | 6.68        |
| 3.0        | 20.0                    | 10.0          | 1.0         | 5.89         | 5.67        |
| 3.0        | 20.0                    | 10.0          | 3.0         | 6.12         | 6.24        |
| 4.0        | 15.0                    | 7.5           | 2.0         | 7.03         | 7.03        |
| 5.0        | 10.0                    | 5.0           | 1.0         | 5.91         | 6.07        |
| 5.0        | 10.0                    | 5.0           | 3.0         | 7.42         | 7.32        |
| 5.0        | 10.0                    | 10.0          | 1.0         | 5.96         | 5.77        |
| 5.0        | 10.0                    | 10.0          | 3.0         | 7.48         | 7.67        |
| 5.0        | 20.0                    | 5.0           | 1.0         | 6.10         | 5.93        |
| 5.0        | 20.0                    | 5.0           | 3.0         | 7.62         | 7.84        |
| 5.0        | 20.0                    | 10.0          | 1.0         | 6.23         | 6.28        |
| 5.0        | 20.0                    | 10.0          | 3.0         | 7.21         | 7.04        |

**ANEXO II – 4.** Diseño factorial exploratorio: producción de lacasa por *T. villosa* en cultivo semi-sólido.

| Unidad experimental | pH         | Sustrato                 | F de C         | F de N         | Inductor           | Actividad (UE/L) | Actividad total (UEt) |
|---------------------|------------|--------------------------|----------------|----------------|--------------------|------------------|-----------------------|
| 1                   | 3.0        | <i>E. dunii</i>          | Glicerol       | Peptona        | Pirogalol          | 4368.8           | 21.8                  |
| 2                   | 3.0        | <i>E. dunii</i>          | Glicerol       | Urea           | Ác. gálico         | 2645.6           | 13.2                  |
| 3                   | 3.0        | <i>E. dunii</i>          | Glicerol       | Urea           | Pirocatecol        | 3658.1           | 20.1                  |
| 4                   | 3.0        | <i>E. dunii</i>          | Glucosa        | Peptona        | Pirocatecol        | 5958.8           | 23.8                  |
| 5                   | 3.0        | <i>E. dunii</i>          | Glucosa        | Urea           | Pirogalol          | 2304.4           | 9.7                   |
| 6                   | 3.0        | <i>E. dunii</i>          | Glucosa        | Urea           | 4-metilpirocatecol | 2328.8           | 10.5                  |
| 7                   | 3.0        | <i>E. grandis</i>        | Glicerol       | Peptona        | Ác. gálico         | 13023.8          | 44.3                  |
| 8                   | 3.0        | <i>E. grandis</i>        | Glicerol       | Peptona        | Pirocatecol        | 10663.1          | 26.7                  |
| 9                   | 3.0        | <i>E. grandis</i>        | Glicerol       | Urea           | Pirogalol          | 4406.3           | 22.9                  |
| 10                  | 3.0        | <i>E. grandis</i>        | Glicerol       | Urea           | 4-metilpirocatecol | 4130.6           | 22.3                  |
| <b>11</b>           | <b>3.0</b> | <b><i>E. grandis</i></b> | <b>Glucosa</b> | <b>Peptona</b> | <b>Pirogalol</b>   | <b>16792.5</b>   | <b>73.9</b>           |
| 12                  | 3.0        | <i>E. grandis</i>        | Glucosa        | Peptona        | 4-metilpirocatecol | 16569.4          | 41.4                  |
| 13                  | 3.0        | <i>E. grandis</i>        | Glucosa        | Urea           | Ác. gálico         | 5173.1           | 31.0                  |
| 14                  | 3.0        | <i>E. grandis</i>        | Glucosa        | Urea           | Pirocatecol        | 5842.5           | 32.1                  |
| 19                  | 6.0        | <i>E. dunii</i>          | Glicerol       | Peptona        | Ác. gálico         | 2439.4           | 6.8                   |
| 20                  | 6.0        | <i>E. dunii</i>          | Glicerol       | Peptona        | Pirocatecol        | 3258.8           | 17.3                  |
| 21                  | 6.0        | <i>E. dunii</i>          | Glicerol       | Urea           | Pirogalol          | 3498.8           | 14.0                  |
| 22                  | 6.0        | <i>E. dunii</i>          | Glucosa        | Peptona        | Pirogalol          | 3733.1           | 22.4                  |
| 23                  | 6.0        | <i>E. dunii</i>          | Glucosa        | Peptona        | 4-metilpirocatecol | 5311.9           | 23.9                  |
| 24                  | 6.0        | <i>E. dunii</i>          | Glucosa        | Urea           | Ác. gálico         | 2310.0           | 12.7                  |
| 25                  | 6.0        | <i>E. grandis</i>        | Glicerol       | Peptona        | Pirogalol          | 5902.5           | 10.0                  |
| 26                  | 6.0        | <i>E. grandis</i>        | Glicerol       | Peptona        | 4-metilpirocatecol | 5970.0           | 14.9                  |
| 27                  | 6.0        | <i>E. grandis</i>        | Glicerol       | Urea           | Ác. gálico         | 4111.9           | 22.6                  |
| 28                  | 6.0        | <i>E. grandis</i>        | Glicerol       | Urea           | Pirocatecol        | 4848.8           | 26.7                  |
| 29                  | 6.0        | <i>E. grandis</i>        | Glucosa        | Peptona        | Ác. gálico         | 6031.9           | 30.2                  |
| 30                  | 6.0        | <i>E. grandis</i>        | Glucosa        | Peptona        | Pirocatecol        | 6613.1           | 23.1                  |
| 31                  | 6.0        | <i>E. grandis</i>        | Glucosa        | Urea           | Pirogalol          | 4995.0           | 27.5                  |
| 32                  | 6.0        | <i>E. grandis</i>        | Glucosa        | Urea           | 4-metilpirocatecol | 4213.1           | 17.7                  |
| 15                  | 4.5        | <i>E. dunii</i>          | Glicerol       | Peptona        | 4-metilpirocatecol | 2829.4           | 7.1                   |
| 16                  | 4.5        | <i>E. dunii</i>          | Glicerol       | Urea           | 4-metilpirocatecol | 2891.3           | 14.5                  |
| 17                  | 4.5        | <i>E. dunii</i>          | Glucosa        | Peptona        | Ác. gálico         | 4488.8           | 24.7                  |
| 18                  | 4.5        | <i>E. dunii</i>          | Glucosa        | Urea           | Pirocatecol        | 2670.0           | 12.8                  |

F de C: fuente de carbono, F de N: fuente de nitrógeno.

**ANEXO II – 5.** Primer Diseño factorial de optimización: producción de lacasa por *T. villosa* en cultivo semi-sólido.

| Unidad experimental | Sustrato ( <i>E. grandis</i> ) | Peptona (g/L) | Glucosa (g/L) | Actividad (UE/L) |
|---------------------|--------------------------------|---------------|---------------|------------------|
| 1                   | Corteza molida                 | 2.0           | 7.3           | 2876.3           |
| 2                   | Corteza molida                 | 4.7           | 4.7           | 4925.6           |
| 3                   | Corteza molida                 | 4.7           | 10.0          | 4203.8           |
| 4                   | Corteza molida                 | 7.3           | 2.0           | 7404.4           |
| 5                   | Corteza molida                 | 7.3           | 7.3           | 7456.9           |
| <b>6</b>            | <b>Corteza molida</b>          | <b>7.3</b>    | <b>12.7</b>   | <b>34687.5</b>   |
| 7                   | Corteza molida                 | 10.0          | 4.7           | 9828.8           |
| 8                   | Corteza molida                 | 10.0          | 10.0          | 13567.5          |
| 9                   | Corteza molida                 | 12.7          | 7.3           | 10565.6          |
| 10                  | Corteza troceada               | 2.0           | 7.3           | 0.0              |
| 11                  | Corteza troceada               | 4.7           | 4.7           | 4072.5           |
| 12                  | Corteza troceada               | 4.7           | 10.0          | 6241.9           |
| 13                  | Corteza troceada               | 7.3           | 2.0           | 12517.5          |
| 14                  | Corteza troceada               | 7.3           | 7.3           | 15813.8          |
| 15                  | Corteza troceada               | 7.3           | 12.7          | 2175.0           |
| 16                  | Corteza troceada               | 10.0          | 4.7           | 13676.3          |
| 17                  | Corteza troceada               | 10.0          | 10.0          | 15170.6          |
| 18                  | Corteza troceada               | 12.7          | 7.3           | 17026.9          |
| 19                  | Madera molida                  | 2.0           | 7.3           | 2416.9           |
| 20                  | Madera molida                  | 4.7           | 4.7           | 6480.0           |
| 21                  | Madera molida                  | 4.7           | 10.0          | 7676.3           |
| 22                  | Madera molida                  | 7.3           | 2.0           | 5587.5           |
| 23                  | Madera molida                  | 7.3           | 7.3           | 7627.5           |
| 24                  | Madera molida                  | 7.3           | 12.7          | 10974.4          |
| 25                  | Madera molida                  | 10.0          | 4.7           | 11962.5          |
| 26                  | Madera molida                  | 10.0          | 10.0          | 8782.5           |
| 27                  | Madera molida                  | 12.7          | 7.3           | 12926.3          |
| 28                  | Corteza molida                 | 2.0           | 7.3           | 2578.1           |
| 29                  | Corteza molida                 | 4.7           | 4.7           | 5302.5           |
| 30                  | Corteza molida                 | 4.7           | 10.0          | 4561.9           |
| 31                  | Corteza molida                 | 7.3           | 2.0           | 9223.1           |
| 32                  | Corteza molida                 | 7.3           | 7.3           | 11182.5          |
| 33                  | Corteza molida                 | 7.3           | 12.7          | 19668.8          |
| 34                  | Corteza molida                 | 10.0          | 4.7           | 9356.3           |
| 35                  | Corteza molida                 | 10.0          | 10.0          | 10886.3          |
| 36                  | Corteza molida                 | 12.7          | 7.3           | 10635.0          |
| 37                  | Corteza troceada               | 2.0           | 7.3           | 0.0              |

## ANEXO II – 5. Continuación

| Unidad experimental | Sustrato ( <i>E. grandis</i> ) | Peptona (g/L) | Glucosa (g/L) | Actividad (UE/L) |
|---------------------|--------------------------------|---------------|---------------|------------------|
| 38                  | Corteza troceada               | 4.7           | 4.7           | 1301.3           |
| 39                  | Corteza troceada               | 4.7           | 10.0          | 2493.8           |
| 40                  | Corteza troceada               | 7.3           | 2.0           | 13831.9          |
| 41                  | Corteza troceada               | 7.3           | 7.3           | 3414.4           |
| 42                  | Corteza troceada               | 7.3           | 12.7          | 0.0              |
| 43                  | Corteza troceada               | 10.0          | 4.7           | 16237.5          |
| 44                  | Corteza troceada               | 10.0          | 10.0          | 15536.3          |
| 45                  | Corteza troceada               | 12.7          | 7.3           | 12249.4          |
| 46                  | Madera molida                  | 2.0           | 7.3           | 3418.1           |
| 47                  | Madera molida                  | 4.7           | 4.7           | 6515.6           |
| 48                  | Madera molida                  | 4.7           | 10.0          | 7269.4           |
| 49                  | Madera molida                  | 7.3           | 2.0           | 8068.1           |
| 50                  | Madera molida                  | 7.3           | 7.3           | 6586.9           |
| 51                  | Madera molida                  | 7.3           | 12.7          | 6594.4           |
| 52                  | Madera molida                  | 10.0          | 4.7           | 7441.9           |
| 53                  | Madera molida                  | 10.0          | 10.0          | 7462.5           |
| 54                  | Madera molida                  | 12.7          | 7.3           | 12358.1          |

**ANEXO II – 6.** Segundo Diseño factorial de optimización: producción de lacasa por *T. villosa* en cultivo semi-sólido.

| Unidad experimental | Glucosa (g/L) | Peptona (g/L) | Actividad (UE/L) |
|---------------------|---------------|---------------|------------------|
| 1                   | 0.0           | 0.0           | 34.0             |
| 2                   | 0.0           | 0.0           | 0.0              |
| 3                   | 0.0           | 0.0           | 4.9              |
| 4                   | 0.0           | 7.5           | 5535.0           |
| 5                   | 0.0           | 7.5           | 7027.5           |
| 6                   | 0.0           | 7.5           | 5145.0           |
| 7                   | 0.0           | 15.0          | 7196.3           |
| 8                   | 0.0           | 15.0          | 4923.8           |
| 9                   | 0.0           | 15.0          | 6420.0           |
| 10                  | 0.0           | 22.5          | 7365.0           |
| 11                  | 0.0           | 22.5          | 6648.8           |
| 12                  | 0.0           | 22.5          | 6142.5           |
| 13                  | 7.5           | 0.0           | 19.1             |
| 14                  | 7.5           | 0.0           | 2.7              |
| 15                  | 7.5           | 0.0           | 2.2              |
| 16                  | 7.5           | 15.0          | 27881.3          |
| 17                  | 7.5           | 15.0          | 17422.5          |
| 18                  | 7.5           | 15.0          | 14800.0          |
| 19                  | 7.5           | 22.5          | 9105.0           |
| 20                  | 7.5           | 22.5          | 7312.5           |
| 21                  | 7.5           | 22.5          | 8775.0           |
| 22                  | 15.0          | 0.0           | 2.8              |
| 23                  | 15.0          | 0.0           | 1.9              |
| 24                  | 15.0          | 0.0           | 11.3             |
| 25                  | 15.0          | 7.5           | 18289.0          |
| 26                  | 15.0          | 7.5           | 8677.5           |
| 27                  | 15.0          | 7.5           | 12521.3          |
| 28                  | 15.0          | 15.0          | 12397.5          |
| 29                  | 15.0          | 15.0          | 14422.5          |
| 30                  | 15.0          | 15.0          | 19323.8          |
| 31                  | 15.0          | 22.5          | 12581.3          |
| 32                  | 15.0          | 22.5          | 8190.0           |
| 33                  | 15.0          | 22.5          | 5673.8           |
| 34                  | 7.5           | 7.5           | 22125.0          |
| 35                  | 7.5           | 7.5           | 25162.5          |
| 36                  | 7.5           | 7.5           | 23925.0          |

**ANEXO VI-1.** Estudio de condiciones para el ensayo de fitotoxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa*.

Para la puesta a punto del ensayo de toxicidad aguda con *L. sativa* se debe tener en cuenta distintos aspectos como la procedencia y calidad del lote de semillas y las condiciones de germinación del mismo. Asimismo, se debe seleccionar el control negativo del ensayo en el cual debe ocurrir la germinación y el desarrollo normal de las plántulas, siendo el medio que se utiliza para preparar las distintas diluciones de las muestras a analizar. Para este trabajo fue necesario considerar además las condiciones requeridas para la biotransformación catalizada por la enzima lacasa de donde provienen algunas de las muestras a analizar con el ensayo de fitotoxicidad.

#### **Descripción del ensayo:**

Se utilizaron 2 variedades de lechuga (semillas proporcionadas por productores locales que practican agricultura orgánica) “mantecosa” y “crespa”, y distintas soluciones tampón para estudiar el efecto de iones y contraiones, fuerza iónica y valor de pH en la germinación y el crecimiento de las plántulas resultando en un ensayo con 18 tratamientos (**tabla 1**).

Para cada tratamiento se colocó en placa de Petri 5 semillas sobre papel de filtro embebido en 4.0 mL de la solución a analizar. Se selló con papel Parafilm e incubó durante 5 días en cámara a 20°C, en la oscuridad (condiciones verificadas previamente).

Las respuestas evaluadas fueron inhibición de la germinación y de la elongación de hipocótilo y de radícula con sus respectivos coeficientes de variación.

#### **Resultados:**

Se comprobó que la germinación y crecimiento de las plántulas de lechuga se ven afectados por los distintos componentes de los tampones así como por la concentración de iones, observándose una respuesta negativa al aumento de la fuerza iónica de la solución (**tabla 1**). En algunos tratamientos, si bien hubo germinación la misma no fue seguida por un desarrollo normal de las semillas germinadas, sino que solo se pudo observar un pequeño crecimiento de la radícula, como en el caso del tratamiento 7 (**fig. 1**).

Para Acetato de sodio pH 4.8 usado previamente en las reacciones de decoloración se observó la inhibición total de la germinación para las fuerzas iónicas 50 mM y 100 mM (**tabla 1**). Aunque en el tratamiento 4 se obtuvo un resultado aceptable para la variedad mantecosa, el mismo no fue de preferencia ya que la fuerza iónica resulta demasiado baja para asegurar que el sistema se mantenga tamponado y proporcione las condiciones necesarias para la reacción enzimática.

La mejor respuesta fue observada para la solución de fosfatos de sodio, siendo similar para pH 5.0 y pH 6.0 con fuerza iónica 50 mM (tratamientos 13, 14, 17 y 18), por lo que se selecciona el pH 5.0 de modo de favorecer la actividad enzimática y manteniendo este parámetro de la reacción de decoloración. Sin embargo, para este pH las respuestas de elongación de radícula e hipocótilo fueron superiores para la fuerza iónica 25 mM (tratamientos 15 y 16), por lo que esta solución fue la seleccionada como control negativo del ensayo.

En esta solución se obtuvo una menor variabilidad en la respuesta para la variedad de lechuga crespa, observándose un coeficiente de variación (CV) de 39 % para la longitud de radícula en la variedad mantecosa, mientras que en el protocolo de referencia se recomienda que el CV no sea superior a 30 %. Por lo que en base a estas observaciones se seleccionó el tratamiento 16.



**Figura 1.** Crecimiento de semillas de *L. sativa* variedad mantecosa, en Citrato-Fosfato de sodio 50 mM, pH 4.8 (tratamiento n°7), 120 h de incubación.

**Tabla 1.** Estudio de condiciones para la selección del control negativo en germinación de semillas y desarrollo de plántulas de *L. sativa* (120 horas de incubación).

| Variables                               |                  |               |                     | Respuestas               |                        |                           |          |
|---|------------------|---------------|---------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|----------|
| Sistema buffer                          | pH               | Fuerza iónica | Variedad de lechuga | Longitud hipocótilo (CV) | Longitud radícula (CV) | Inhibición de germinación | N° trat. |
| Acetato [Na <sup>+</sup> ]              | 4.8              | 0.100 M       | Mantecosa           | 0                        | 0                      | 100 %                     | 1        |
|   |                  | 0.050 M       | Mantecosa           | 0                        | 0                      | 100 %                     | 2        |
|   |                  |               | Crespa              | 0                        | 0                      | 100 %                     | 3        |
|   |                  | 0.002 M       | Mantecosa           | 2,7 cm (17 %)            | 2,9 cm (33 %)          | 0 %                       | 4        |
| Acetato [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] | 4.8              | 0.050 M       | Mantecosa           | 0                        | 0                      | 100 %                     | 5        |
| Citrato - Fosfato [Na <sup>+</sup> ]    | 4.8              | 0.100 M       | Mantecosa           | 0                        | 0                      | 100 %                     | 6        |
|   |                  | 0.050 M       | Mantecosa           | 0 <sup>1</sup>           | 0,4 (11 %)             | 0 %                       | 7        |
|   |                  |               | Crespa              | 0,2 cm (20 %)            | 0,2 cm (0 %)           | 0 %                       | 8        |
|   |                  | 0.020 M       | Mantecosa           | 1,4 cm (29 %)            | 0,7 cm (11 %)          | 0 %                       | 9        |
| Crespa                                  | 1,5 cm (8 %)     |               | 0,7 cm (10 %)       | 20 %                     | 10                     |                           |          |
| Citrato - Fosfato [K <sup>+</sup> ]     | 4.8              | 0.100 M       | Mantecosa           | 0                        | 0                      | 100 %                     | 11       |
|   |                  | 0.050 M       |                     | 0 <sup>1</sup>           | 0,3 cm (20 %)          | 0 %                       | 12       |
| Fosfato [Na <sup>+</sup> ]              | 5.0 <sup>2</sup> | 0.050 M       | Mantecosa           | 1,7 cm (17 %)            | 0,9 cm (17 %)          | 0 %                       | 13       |
|   |                  |               | Crespa              | 2,0 cm (9 %)             | 1,5 cm (11 %)          | 0 %                       | 14       |
|   | 0.025 M          | Mantecosa     | 3,5 cm (8 %)        | 2,5 cm (39 %)            | 20 %                   | 15                        |          |
|   |                  | Crespa        | 3,6 cm (6 %)        | 3,4 cm (11 %)            | 0 %                    | 16                        |          |
|   | 6.0              | 0.050 M       | Mantecosa           | 1,9 cm (8 %)             | 0,7 cm (24 %)          | 0 %                       | 17       |
|   |                  |               | Crespa              | 1,7 cm (5 %)             | 1,1 cm (5 %)           | 0 %                       | 18       |

*Notas:* Se indica el contraión del sistema tampón entre paréntesis rectos. CV: Coeficiente de variación. <sup>1</sup> Semillas germinadas pero sin desarrollo de hipocótilo. <sup>2</sup> Este no es un sistema tampón ya que el pH mínimo que se obtiene con el tampón Fosfato es 6.0, en este trabajo se hace referencia al mismo como solución de sales fosfato de sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), pH 5.0.

## Anexo VI-2. Procedimiento del Bioensayo Microtox® empleado en el Laboratorio Ambiental de DINAMA



### 6059UY

Evaluación de la ecotoxicidad aguda de muestras ambientales como ser aguas residuales domésticas e industriales, aguas naturales superficiales o subterráneas, lixiviados de residuos sólidos industriales, mediante el test de bacterias luminiscentes (Sistema Microtox®)

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <b>Elaborado</b>             | Gabriela Pistone<br>Analista Ecotoxicidad            |
| <b>Modificado y Revisado</b> | Gabriela Pistone<br>Jefa de Sección Ecotoxicidad     |
| <b>Aprobado</b>              | QF Natalia barboza<br>Director Laboratorio Ambiental |

---

## 1 APLICACIÓN

---

- 1.1 Esta normativa técnica se utiliza para evaluar la toxicidad aguda de muestras ambientales como ser aguas residuales domésticas e industriales, aguas naturales superficiales o subterráneas, lixiviados de residuos sólidos industriales, etc., mediante el Sistema Microtox®. Este es un bioensayo normalizado, que emplea como organismo indicador una cepa liofilizada de la bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri*.

## 2 REFERENCIAS

---

- 2.1 Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA  
2.2 Manual de Gestión de Calidad– Laboratorio Ambiental DINAMA  
2.3 Manual de Calidad– Laboratorio Ambiental DINAMA  
2.4 Rutas de análisis códigos: RET03.  
2.5 Instructivos de equipo INE41 (fotómetro)  
2.6 Instructivo de equipo INE50 (analizador de pH)  
2.7 Instructivo de equipo INE36 (destilador Barnstead)  
2.8 Instructivo de equipo INE82 (desionizador Thermo Scientific)  
2.9 Instructivo de equipo INE94 (balanza analítica)

## 3 RESUMEN DEL MÉTODO

---

- 3.1 Es un bioensayo estandarizado a nivel internacional, que emplea como organismo a testear una cepa liofilizada de la bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri*, la cual se encuentra registrada en el NRRL como B-11177. Para el ensayo se emplea una densidad de bacterias viables de 10<sup>6</sup> cél/mL.
- 3.2 Bajo condiciones adecuadas el microorganismo emplea aproximadamente 10% de su energía en una vía metabólica que produce luz. Este hecho está intrínsecamente vinculado a la respiración del mismo. Cualquier alteración del ritmo respiratorio debida a un cambio en el metabolismo o a daños en la estructura celular causará decrecimiento de la luminiscencia.
- 3.3 La toxicidad aguda se expresa través del parámetro EC50 que indica la concentración capaz de inhibir en un 50% la emisión de luz en un tiempo dado. Se puede medir la inhibición a los 5, 15, o 30 minutos, en cuyos casos el parámetro se denomina EC50(5 min), EC50(15 min) EC50(30 min). Para medir el decrecimiento en la luminiscencia se utiliza un fotómetro Microtox® modelo 500, el cual mide la luz remanente a una longitud de onda de 490nm.

## 4 PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

---

- 4.1 El analista debe utilizar equipo de seguridad apropiado (guantes descartables y túnica) de acuerdo a la naturaleza de la muestra bajo estudio.

## 5 INTERFERENCIAS

---

- 5.1 Turbidez. En caso de aguas con gran turbidez, centrifugar la muestra a 4000 rpm durante

30 minutos. Transferir el sobrenadante a un nuevo recipiente limpio y etiquetado, y realizar el test con dicha fracción de la muestra.

- 5.2 pH. Las bacterias son sensibles al pH, pero el efecto es mínimo dentro del rango 6-8.5. Siempre medir el pH de la muestra. Realizar el test sin ajustar el pH de la muestra para determinar el efecto tóxico total. Si el pH de la muestra es menor a 6.0 o mayor a 8.5, es aconsejable determinar también la toxicidad de la muestra sin el efecto del pH, es decir, ajustando el pH y realizando nuevamente la determinación analítica.

Cuando se esté trabajando con matrices artificiales como lixiviados, se aconseja ajustar el pH de la muestra entre 7 y 7.5.

- 5.3 Oxígeno disuelto. No se requiere aireación de la muestra. Bajos niveles de oxígeno en agua no afecta los resultados del test. La manipulación normal de las muestras, y las diluciones al 50% con soluciones aireadas, se considera suficiente para proveer de oxígeno adecuado para el test, a pesar de la deficiencia de la muestra en oxígeno. Sin embargo la aireación de la muestra puede ser una opción si y solo si, el oxígeno disuelto en la muestra es < al 40% o > al 100% de la saturación en aire.
- 5.4 Color. Si la muestra posee color, realizar el test básico y determinar la EC50 de la misma. Comprobar si a esta concentración la muestra tiene color visible. Si se detecta color, indicar en las observaciones.
- 5.5 Muestras cloradas. Las bacterias, al igual que la mayoría de los microorganismos, son sensibles al cloro. Para neutralizar el cloro residual en una muestra de agua, agregar una parte de la solución stock de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) a 100 partes de la muestra. De esta forma la concentración final de tiosulfato de sodio en la muestra es de 100 mg/l. Solución stock de tiosulfato de sodio: pesar 1g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  y agregar a 100 ml de diluyente. Almacenar a 4°C hasta por 2 meses.

## 6 MUESTREO Y PRESERVACIÓN

---

- 6.1 La muestra debe ser colectada en frascos de 125 ml de vidrio, o de polipropileno, con tapa de rosca. El frasco debe llenarse sin dejar cámara de aire, para mantener los materiales volátiles presentes en la solución. Debe estar debidamente etiquetado, e ingresar al laboratorio acompañado de la ficha de ingreso con los datos que se indican en la misma.
- 6.2 Cuando la muestra es de agua de ríos, arroyos, lagos o reservorio, recolectar la muestra por lo menos 15 cm debajo de la superficie y si es posible, contra corriente.
- 6.3 Es recomendable analizar la muestra antes de las 24 horas de ser colectada. De ser necesario puede conservarse a  $4 \pm 2$  °C en oscuridad por un período máximo de 72 horas.

## 7 INSTRUMENTAL Y MATERIALES

---

- 7.1 Fotómetro Microtox Modelo 500 (comercializado por Modern Water), con el respectivo software (MicrotoxOmni™ Software for Windows versión 1,15 95/98/NT o equivalente).
- 7.2 Freezer a  $-20 \pm 2$  °C.
- 7.3 Heladera a 2-8°C.
- 7.4 Analizador de pH.

- 7.5 Cubetas cilíndricas de 12 x 50 mm, de vidrio borosilicato comercializadas por Modern Water.
- 7.6 Micropipetas de 10µL, 500µL y 1000µL, con sus correspondientes punteros descartables.
- 7.7 Balanzas de precisión.
- 7.8 Timer.
- 7.9 Destilador de agua (Barnstead o similar)
- 7.10 Desionizador de agua (Milli-Q o similar)
- 7.11 Pinza
- 7.12 Centrífuga

## 8 REACTIVOS

---

- 8.1 Viales liofilizados de la bacteria *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177) comercializada por Modern water, y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Reactivo)
- 8.2 Solución de reconstitución del Reactivo bacteriano, comercializada por Modern Water. Puede almacenarse hasta por un año a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 8.3 Cloruro de sodio (NaCl) sólido
- 8.4 Diluyente: solución de NaCl 2% (p/v) en agua desionizada, pH 6.0 - 8.5. Agregar 2g de NaCl a 100 ml de agua desionizada. Puede almacenarse hasta por un año a  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- 8.5 Solución de ajuste osmótico (OAS): solución de NaCl 22% (p/v) en agua desionizada. Agregar 22g de NaCl a 100 ml de agua desionizada. Puede almacenarse hasta por un año a  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- 8.6 Fenol cristalino grado reactivo (tóxico de referencia).
- 8.7 Sulfato de zinc heptahidratado,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (tóxico de referencia).
- 8.8 Soluciones para ajuste de pH.  
Solución hidróxido de sodio (NaOH), 0.1N: pesar 0,2 gr de NaOH y agregar a un recipiente conteniendo 50 ml de agua desionizada.  
Solución de ácido clorhídrico (HCl), 1.2N: pesar 2,18 gr de HCl y agregar a un recipiente conteniendo 50 ml de agua desionizada.
- 8.9 Agua desionizada grado reactivo 2 (según norma ISO 3696:1987).

## 9 PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

---

- 9.1 No es aconsejable reutilizar las cubetas de vidrio. Trazas de detergentes u otros contaminantes pueden interferir con el resultado del test.
- 9.2 Se aconseja realizar el test dentro de las 3 horas después de haber reconstituido el vial de bacterias. Dentro de este tiempo el organismo responde de forma consistente a un amplio espectro de tóxicos. Pasado dicho tiempo la respuesta de las bacterias puede verse modificada. Si se utiliza el reactivo luego de las 3 horas de su reconstitución, se aconseja chequear la respuesta de las bacterias corriendo un test básico con un estándar de referencia como el fenol. En la práctica se ha constatado que un vial reconstituido y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 hs, no cambia su respuesta frente al tóxico de referencia.

- 9.3 Es aconsejable que la temperatura ambiente en el laboratorio donde se realiza el ensayo sea de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- 9.4 Se debe tener especial precaución en el modo de pipetear, ya que esto condiciona los resultados obtenidos.

## 10 OPERACIONES PREVIAS

---

### Preparación del tóxico de referencia

- 10.1 Se utilizan soluciones de fenol (o de sulfato de zinc) de 100 mg/l, como tóxico de referencia para chequear la performance de las bacterias y el método en su totalidad.
- 10.2 Para preparar soluciones stock (100 mg/l) de los tóxicos de referencia, se pesan 50 mg de la sustancia química y se colocan en un matraz aforado. Enrasar a 500 ml con diluyente (NaCl 2%). Se mezcla el contenido invirtiendo el recipiente al menos 10 veces. El estándar de fenol puede conservarse en frasco color ámbar para evitar la luz y en heladera entre  $2-8^{\circ}\text{C}$ , durante 4 meses. El estándar de zinc puede almacenarse en iguales condiciones por 3 meses.

## 11 ANÁLISIS DE LA MUESTRA

---

- 11.1 Encender el aire acondicionado de la sala donde se encuentra el equipo Microtox para mantener temperatura ambiente a  $20^{\circ}\text{C}$ .
- 11.2 Conectar el fotómetro a una fuente de corriente. El display muestra una luz roja que luego de estabilizada la temperatura (aproximadamente en 15 minutos) se apaga y prende una luz verde. En ese momento el equipo está listo para usar.
- 11.3 Se enciende el PC y se ingresa al software MicrotoxOmni, indicando el nombre de usuario y el password ("MANAGER"). Se elige la opción "Run a test" y el protocolo de ensayo "Basic Test". Allí se completan los siguientes parámetros según se desee: número de controles, número de replicas de los controles, número de muestras, número de réplicas por muestra, número de diluciones por muestra.

El resto de los parámetros quedan establecidos automáticamente:

Inicial Concentration: 45.5  
Dilution Factor: 2  
Concentration Units: %  
Test Times: 5 y 15  
Time Units: Mins.  
Zero Time Reading: Click  
Reading Method: Click Instrument

- 11.4 La disposición de los pocillos en el fotómetro es la siguiente: cuanta con 5 columnas (denominadas del 1 al 5) y 6 filas (denominadas de la A a la F). Además hay un pocillo a la derecha que es para el reactivo bacteriano y otro abajo que es para realizar la medición.

A continuación se detalla procedimiento para analizar una muestra, empleando el test básico (cabe mencionar que el software tiene una guía de procedimiento para cada test que se quiera llevar a cabo):

- 11.5 Colocar cubetas limpias en los pocillos desde A1 a B5. Colocar una cubeta en el pocillo para reactivo bacteriano (termostatizado a  $5.5\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) con 1000  $\mu\text{L}$  de la solución de reconstitución. El resto de los pocillos se encuentran termostatizados a  $15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- 11.6 Colocar 500  $\mu\text{L}$  de diluyente en las cubetas B1 a B5. Colocar 1000  $\mu\text{L}$  de diluyente en las cubetas A1 a A4.
- 11.7 Colocar 2500  $\mu\text{L}$  de la muestra en la cubeta A5 y agregar 250  $\mu\text{L}$  de OAS. Mezclar aspirando y descargando con la pipeta. Descartar 750  $\mu\text{L}$ .
- 11.8 Preparar diluciones seriadas 1:2 de la muestra haciendo transferencias de 1000  $\mu\text{L}$  desde A5 a A4, desde A4 a A3, y desde A3 a A2. Mezclar con pipeta antes de cada transferencia. Descartar 1000  $\mu\text{L}$  de la cubeta A2. De esta forma, las concentraciones de la muestra en cada una de las cubetas de la fila A es la siguiente: A5 (100%), A4 (50%), A3 (25%), y A2 (12,5%). En la cubeta A1 solo encontramos el diluyente.
- 11.9 Esperar 5 minutos para que todas las soluciones alcancen los  $15^{\circ}\text{C}$ .
- 11.10 Reconstituir un vial de reactivo bacteriano: Tomar un vial del freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  con la menor manipulación posible de manera de evitar el calentamiento de las bacterias liofilizadas. Quitar el tapón con una pinza y verter rápidamente en él los 1000  $\mu\text{L}$  de la solución reconstituyente pre-enfriada, para suspender las bacterias. Tapar el vial y agitarlo suavemente 3 o 4 veces de manera de homogeneizar la suspensión. Inmediatamente transferir la suspensión a la cubeta de reconstituyente. Si la adición es lenta, puede ocurrir la lisis de la bacteria. Mezclar con pipeta de 500  $\mu\text{L}$  aspirando y expulsando muy lentamente sin generar burbujas no menos de 20 veces para asegurar una dispersión uniforme del reactivo.
- 11.11 Inmediatamente, transferir 10  $\mu\text{L}$  de reactivo a las cubetas B1 a B5, apoyando el puntero de la pipeta sobre la pared interna de la cubeta, y sin tocar la solución. Agitar suavemente las cubetas para asegurar que el reactivo entre en contacto con la solución.
- 11.12 Esperar 15 minutos para lograr el desarrollo de luminiscencia y que la producción de luz llegue a un estado estable.
- 11.13 Transcurrido ese tiempo, se realizan las lecturas a tiempo cero: colocar la cubeta B1 en el pocillo de lectura, presionar el botón SET del fotómetro para setear el instrumento, y luego proceder con las lecturas del resto de las cubetas según lo va indicando el programa, presionando cada vez el botón READ en el instrumento. Con esto se obtienen las medidas de luminosidad a tiempo cero ( $I_0$ ).
- 11.14 Inmediatamente transferir 500  $\mu\text{L}$  de solución desde A1 a B1, A2 a B2, A3 a B3, A4 a B4, y A5 a B5. De esta forma, la concentración de la muestra en cada una de las cubetas de la fila B es: B5 (45,50%), B4 (22,75%), B3 (11,38%), B2 (5,68%), y B1 conteniendo solamente diluyente.
- 11.15 Cuando el monitor lo indique, realizar las lecturas para tiempo 5 minutos y 15 minutos.

## 12 ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1 Los datos de luminiscencia obtenidos son utilizados por el software para calcular el punto final del bioensayo: la concentración de la muestra que causa 50% de inhibición de la luz emitida por la bacteria *Vibrio fischeri* (EC50). Se mide la EC50 para 5 y 15 min. También indica el rango de confianza al 95% para dicho valor. Cuanto más estrecho sea el rango de confianza, más preciso son los resultados.
- 12.2 La información desplegada en el monitor incluye: las concentraciones analizadas, las lecturas a tiempo 0 ( $I_0$ ) y tiempo t ( $I_t$ ), o sea 5 y 15 min, y el cálculo del parámetro "Gamma" para cada concentración y tiempo de exposición, que es el cociente entre la luz perdida y la luz remanente luego que se expuso el reactivo a la muestra. Gamma es calculado según la siguiente ecuación:

$$\text{Gamma} = \frac{R_5 \cdot I_0 - I_t}{I_t}$$

donde,  $R_5$  es la razón del blanco (luz emitida en la cubeta del blanco a tiempo t con respecto a la luz emitida a tiempo cero), que corrige por la pérdida natural de luz que se produce con el paso del tiempo en la cubeta del blanco (conteniendo solamente diluyente y reactivo).

$$R_5 = \frac{\text{control } I_t}{\text{control } I_0}$$

También se muestra el porcentaje de efecto (o porcentaje de pérdida de luz) de cada concentración de la muestra, comparado con el blanco.

- 12.3 El valor de EC50 y el intervalo de confianza al 95% aparece al pie del reporte. Se calcula a partir de la serie de concentraciones testeadas y por definición  $EC50 = \text{Gamma } 1$ . (cuando el valor de Gamma se iguala a la unidad, la luz perdida es igual a la luz remanente, lo que equivale a decir que la mitad de la luz producida por las bacterias se ha perdido por exposición a la muestra). El valor de EC50 se determina por interpolación cuando Gamma vale 1 a partir del gráfico de  $\log(\text{Gamma})$  vs.  $\log(\text{concentración})$ , en el cual existe relación lineal entre ambas variables.
- 12.4 Se incluye en el reporte otro gráfico además del anteriormente mencionado: "porcentaje de efecto vs. concentración", señalándose la línea utilizada para el cálculo de EC50.
- 12.5 Se expresan los resultados como EC50, 15 min. También se puede convertir el resultado a unidades de toxicidad (UT), siendo  $UT = 100/EC50$ . En el siguiente cuadro se muestra la clasificación de la muestra según la EC50 y correspondiente unidad de toxicidad:

| EC50     | UT          | CLASIFICACION        |
|----------|-------------|----------------------|
| < 25%    | > 4         | Muy tóxica           |
| 25 a 50% | 2 a 4       | Tóxica               |
| 51 a 75% | 1,33 a 1,99 | Moderadamente tóxica |
| 76 a 99% | 1,32 a 1.01 | Levemente tóxica     |
| >100%    | <1.00       | No Tóxica            |

Fuente: Qureshi 1990, p3-89. Microbiology methods manual. Alberta Environmental Centre.

---

## 13 CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

---

### 13.1 Chequeo de la sensibilidad del reactivo con el tóxico de referencia:

Como forma de asegurar la validez de los análisis, es aconsejable que cada vez que se reconstituye un vial de reactivo bacteriano (o al menos mensualmente), se ejecute el protocolo del Test Básico empleando una solución de 100 mg/L de fenol como tóxico de referencia. La EC<sub>50</sub>(5min.) de la solución de fenol, debe encontrarse entre 13 y 26 mg/L. La empresa proveedora emite a su vez un certificado de performance para cada lote de reactivo, que indica el valor exacto de EC<sub>50</sub> (5 min) que se obtiene al efectuar un test básico con fenol.

### 13.2 Gráficos de control con el tóxico de referencia: Adicionalmente, para asegurar que el procedimiento analítico se está llevando a cabo correctamente, deben chequearse los valores obtenidos de EC<sub>50</sub> para el tóxico de referencia (100 mg/L de fenol) con el gráfico de control de calidad. Este gráfico debe establecerse periódicamente hallando la media y la desviación estándar de al menos 20 valores de EC<sub>50</sub>(5 min.) obtenidos a partir de ejecutar el protocolo de Test Básico con el tóxico de referencia. La suma de la media más dos desviaciones estándar es el límite superior de advertencia (LSA). La suma de la media más tres desviaciones estándar se denomina límite superior de control (LSC). Análogamente, se toman límites inferiores de advertencia (LIA), y control (LIC) restando desviaciones estándar a la media.

La EC<sub>50</sub> del tóxico de referencia no debería encontrarse fuera de los límites de advertencia más de 1 vez en 20 y no deberían encontrarse fuera del rango de control más de 1 vez en 100. Sin embargo, un laboratorio que produzca datos variables para el tóxico de referencia puede tener límites de control muy amplios. Por lo tanto se sugiere que los datos generados con el tóxico de referencia, a partir de los cuales se genera el gráfico de control, presenten un coeficiente de variación menor al 30% ( $CV = \text{Desv. estándar}/\text{Media} * 100$ )

### 13.3 Es deseable que el rango de confianza al 95% para el valor de EC<sub>50</sub> (el cual aparece al pie del reporte) no excede el 30% de la EC<sub>50</sub> (cuanto más estrecho sea el rango de confianza, más preciso son los resultados). Se calcula de la siguiente forma:

$$\% = ((EC_{50}/\text{min}.EC_{50}) - 1) * 2 * 100$$

### 13.4 El valor de R<sup>2</sup> obtenido de la curva concentración vs. respuesta debe ser mayor o igual a 95%

## 14 BIBLIOGRAFÍA

---

14.1 ENVIRONMENT CANADA. PACIFIC ENVIRONMENTAL SCIENCE CENTRE, ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY SECTION. Standard Operating Procedure for the Liquid-Phase Toxicity Test Using Luminescent Bacteria (*Vibrio fischeri*). EC50ML12.SOP. June, 2001. pp 2-19.

14.2 ENVIRONMENT CANADA. Biological test Method: Toxicity Test Using Luminescent Bacteria (*Photobacterium phosphoreum*). Report EPS 1/RM/24. November 1992. pp 1-61.

14.3 AZUR ENVIRONMENTAL. MicrotoxOmni™ Software for Windows® 95/98/NT. User Manual. Julio 1999. pp 1-31.

14.4 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22ed. APHA, AWWA, WPCF, 2012. Sección 8050.



## ANEXO VI – 4 A. Hojas de datos de seguridad del colorante Acid Red 88

Fabricante: SIGMA-ALDRICH (Producto número 195227 )

| <b>SIGMA-ALDRICH</b>   |   | <a href="http://sigma-aldrich.com">sigma-aldrich.com</a>  |
|--|---|---|
|  |   | <b>SAFETY DATA SHEET</b>  |
|  |   | according to Regulation (EC) No. 1907/2006<br>Version 5.1 Revision Date 05.09.2013<br>Print Date 13.03.2017 |
| GENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA                                 |   |   |
| <b>SECTION 1: Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking</b> |   |   |
| <b>1.1 Product identifiers</b>   |   |   |
| Product name   | : Acid Red 88   |   |
| Product Number   | : 195227  |   |
| Brand  | : Sigma-Aldrich   |   |
| REACH No.  | : A registration number is not available for this substance as the substance or its uses are exempted from registration, the annual tonnage does not require a registration or the registration is envisaged for a later registration deadline. |   |
| CAS-No.  | : 1658-56-6   |   |
| <b>1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against</b> |   |   |
| Identified uses  | : Laboratory chemicals, Manufacture of substances   |   |
| <b>1.3 Details of the supplier of the safety data sheet</b>                              |   |   |
| Company  | : Sigma-Aldrich<br>3050 Spruce Street<br>SAINT LOUIS MO 63103<br>USA  |   |

|  |  |
|--|--|
| <b>SECTION 12: Ecological information</b>      |  |
| <b>12.1 Toxicity</b>                           | no data available  |
| <b>12.2 Persistence and degradability</b>      | no data available  |
| <b>12.3 Bioaccumulative potential</b>          | no data available  |
| <b>12.4 Mobility in soil</b>                   | no data available  |
| <b>12.5 Results of PBT and vPvB assessment</b> | PBT/vPvB assessment not available as chemical safety assessment not required/not conducted |
| <b>12.6 Other adverse effects</b>              | no data available  |

## ANEXO VI – 4 B. Hojas de datos de seguridad del colorante Acid Red 88

Fabricante: MP Biomedicals

|   |   |  |  |
|---|---|--|--|
|  <p><b>Material Safety Data Sheet</b></p> <p>Catalog Number: 152608<br/>Revision date: 24-Apr-2006</p> |   |  |  |
| <b>1. IDENTIFICATION OF THE SUBSTANCE/PREPARATION AND COMPANY INFORMATION</b>   |   |  |  |
| Catalog Number: 152608  |   |  |  |
| Product name: ACID RED 88   |   |  |  |
| Supplier:<br>MP Biomedicals, LLC<br>29525 Fountain Parkway<br>Solon, OH 44139<br>tel: 440-337-1200  |   |  |  |
| <b>12. ECOLOGICAL INFORMATION</b>   |   |  |  |
| Mobility:   | No data available   |  |  |
| Bioaccumulation:  | No data available   |  |  |
| Ecotoxicity effects:  | No data available   |  |  |
| Aquatic toxicity:   | May cause long-term adverse effects in the aquatic environment. |  |  |
| Components  | U.S. DOT - Appendix B - Marine Pollutan                         | U.S. DOT - Appendix B - Severe Marine Pollutants | United Kingdom - The Red List:         |
| ACID RED 88   | Not Listed  | Not Listed                                       | Not Listed                             |
| Components  | Germany VCI (WGK)   | World Health Organization (WHO) - Drinking Water | Ecotoxicity - Fish Species Data        |
| ACID RED 88   | Not Listed  | Not Listed                                       | Not Listed                             |
| Components  | Ecotoxicity - Freshwater Algae Data                             | Ecotoxicity - Microtox Data                      | Ecotoxicity - Water Flea Data          |
| ACID RED 88   | Not Listed  | Not Listed                                       | Not Listed                             |
| Components  | EPA - ATSDR Priority List                                       | EPA - HPV Challenge Program Chemical List        | California - Priority Toxic Pollutants |
| ACID RED 88   | Not Listed  | Not Listed                                       | Not Listed                             |
| Catalog Number: 152608  | Product name: ACID RED 88                                       |  | Page 3 of 5                            |

**Trabajos publicados en base a los resultados obtenidos durante esta tesis**

L. Gioia; Rodriguez-Couto, S.; P. Menéndez; C. Manta; Ovsejevi, K. Reversible covalent immobilization of *Trametes villosa* laccase onto thiosulfinate-agarose: an insoluble biocatalyst with potential for decolouring recalcitrant dyes. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.:62 4, p.: 502 - 513, **2015**.

L. Gioia; C. Manta; Ovsejevi, K.; Burgueño, J.; P. Menéndez; Rodriguez-Couto, S. Enhancing laccase production by a newly-isolated strain of *Pycnoporus sanguineus* with high potential for dye decolouration. *RSC Advances*, v.: 4 64, p.: 34096 - 34103, **2014**.