

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Degradación de colorantes industriales (Azul de coomassie, Azul de bromofenol y Rojo congo), mediante una cepa transgénica de *Pichia pastoris* que expresa la lacasa de *Coriopsis gallica*.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ADRIANA ELIZABETH AVILA HERNANDEZ

ASESOR: JORGE LUIS FOLCH MALLOL

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada (618551)

Dedicatoria

Esta tesis va dedicada a mi abuelo Catarino Hernández Simental, quien fue el que me indujo a realizar la maestría fuera de mi estado de origen, gracias a su apoyo moral y económico yo pude viajar a Cuernavaca Morelos y realizar este proyecto.

De él aprendí muchas cosas a pesar de contar con un grado bajo de estudio desde pequeña me ayudo con tareas de matemáticas siempre fue muy bueno en esa rama. Además de eso me enseñó valores y lo más importante, me enseñó a ser una persona bondadosa, el siempre vio por los demás y ayudo a realizar las metas de algunos familiares, así como las mías y las de mi hermano. Siempre fue como un padre para nosotros, mi mamá fue madre soltera así que, él era nuestra figura paterna.

A pesar de que ya no se encuentre conmigo quiero dedicarle este nuevo éxito en mi vida y sé que el estará festejando desde el cielo conmigo.

Al ver que mi padre no estaba conmigo en momentos importantes como logros, cumpleaños, en situaciones difíciles, comencé a pensar que no tenía uno, quería sentir su apoyo y compañía. Pero estaba equivocada tu abuelo siempre fuiste mi padre.

El momento que escuche que habías muerto, pensé que ya no te volvería a ver, pero siempre estarías en mi corazón.

Muchas gracias abuelo por todo lo que me enseñaste y por este logro más en mi educación porque sin ti no habría logrado mi objetivo.

Agradecimientos

A mi madre María del Rosario Hernández Romano por haberme apoyado durante todo este proceso de la maestría.

A mi novio Arturo Guerrero Delgado por haberme apoyado y haberme seguido a realizar un posgrado en otro estado, gracias por nunca dejarme sola y haber estado en los momentos difíciles durante estos dos años de maestría.

A mi tutor de tesis Dr. Jorge Luis Folch Mallol, quien fue mi guía durante este largo proceso, él me brindó la oportunidad de trabajar con él, me abrió las puertas de su laboratorio. Le agradezco haber tenido la paciencia necesaria para ayudarme, y por transmitirme su conocimiento.

A la Dra. Marcela Ayala Aceves por haberme abierto las puertas de su laboratorio y permitido realizar los experimentos, además de apoyarme a diseñar mis experimentos y brindarme su ayuda durante el proyecto.

A mi comité representado por la Dra. Maria Laura Ortiz, Dra. Maria del Rayo Sanchez Carbente, Dr. Ramón Batista y el Dr. Luis Caspeta. Por asistir a mis seminarios y darme consejos para mejorar el proyecto.

A mis compañeros de maestría que estuvieron apoyándome durante el posgrado, en especial a Magdalena Urzua y Candelario Rodríguez que me ayudaron al realizar algunos experimentos.

A CONACYT por la beca otorgada, porque gracias a ello, fue posible mi estancia en este proyecto de investigación.

A la Universidad Autónoma de Morelos en especial al Centro de Investigación en Biotecnología por aceptarme en su posgrado.

Resumen	10
Capítulo I	14
Introducción	14
Capítulo II	17
Marco teórico	17
2.1 Colorantes:	17
2.1.1 Rojo Congo	18
2.1.2 Azul de bromofenol	18
2.1.3 Azul de coomassie	19
2.2 Contaminación por colorantes industriales	20
2.3 Producción y consumo de colorantes en México y en el mundo	21
2.4 Métodos convencionales para el tratamiento de aguas residuales con colorantes.	22
2.5 Procesos biológicos para el tratamiento de las aguas residuales con colorantes.	24
2.5.1 Biosorción	24
2.5.2 Biodegradación	25
2.5.3 Métodos enzimáticos	28
2.6 Ingeniería Genética aplicada a la degradación de colorantes	28
2.7 Bioquímica de lacasas	29
2.8 Biología molecular y estructura de las lacasas	33
2.8.1 Aplicaciones	34
2.9 <i>Coriolopsis gallica</i>	34
2.9.1 Lacasa de <i>Coriolopsis gallica</i>	35
2.10 Degradación de colorantes por lacasas	36
Capítulo III	40
Antecedentes	40
Capítulo IV	44

4.1 Justificación	44
4.2 Hipótesis	44
4.3 Objetivo general	45
4.4 Objetivos particulares	45
Capítulo V	46
Metodología	46
5.1 Cultivos en medio YPD	46
5.2 Cultivos en medio BMGY	46
5.3 Cultivos en medio BMM	46
5.4 Actividad de lacasa	47
5.5 Adición y degradación de los colorantes	47
5.6 Ensayo de degradación del colorante rojo congo por la lacasa mutante y silvestre.	48
5.7 Controles cepas X33 de <i>P. pastoris</i> con el vector PICZ vacío y sin vector	48
Capítulo VI	49
Resultados y discusión	49
6.1 Crecimiento en medio BMMGY	49
6.2 Crecimiento en medio BMM	50
6.3 Actividad de lacasa	57
6.4 Degradación de colorantes	62
6.5 Remoción total de los colorantes (adsorción)	65
Capítulo VII	71
Conclusiones	72
Anexos	74
Bibliografía	78

Lista de figuras

Figura 1 Estructura química del colorante rojo congo _____	18
Figura 2 Estructura química del colorante azul de bromofenol _____	19
Figura 3 Estructura química de azul de comassie. _____	20
Figura 4 Ciclo catalítico de oxidorrreducción de las lacasas _____	33
Figura 5 <i>Corioloopsis gallica</i> _____	35
Figura 6 Velocidad de degradación de los colorante _____	38
Figura 7 Espectros de absorbancia _____	38
Figura 8 Perfil de crecimiento de levadura <i>P. pastoris</i> _____	41
Figura 9 Perfil de crecimiento de <i>P. pastoris</i> donde se agregó el colorante azul de coomassie _____	52
Figura 10 Perfil de crecimiento en cultivos con azul de bromofenol _____	54
Figura 11 Perfil de crecimiento de cultivos donde se agregó rojo congo _____	57
Figura 12. Actividad de lacasa en cultivos con azul de coomassie _____	59
Figura 13 Actividad volumétrica en cultivos de <i>P. pastoris</i> con colorante azul bromofenol _____	61
Figura 14 Actividad volumétrica de lacasa en cultivos de <i>P. pastoris</i> con rojo congo ____	62
Figura 15 Porcentajes de degradación de los 3 colorantes por unidad enzimática ____	64
Figura 16 Remoción del colorante azul de coomassie _____	67
Figura 17 Remoción del colorante azul de bromofenol _____	69
Figura 18 Remoción del colorante rojo congo _____	70
Figura 19 Porcentaje de remoción total _____	71
Figura 20 Cultivos con azul de bromofenol de ambas cepas (WT a y mutante b) _____	74
Figura 21 Cultivos con azul de comassie de ambas cepas (WT a y mutante b) _____	74
Figura 22 cultivos con azul de comassie _____	74
Figura 23 cultivos con azul de bromofenol _____	74
Figura 24 cultivos de <i>P. pastoris</i> con la lacasa mutante y silvestre _____	75
Figura 25 cultivos de <i>P. pastoris</i> con la lacasa mutante y silvestre _____	75
Figura 26 Ensayo de decoloración del colorante rojo congo _____	76

Figura 27 Ensayo de la degradación del colorante rojo congo por la lacasa silvestre y mutante _____	76
Figura 28 Remoción de los colorantes azul bromofenol, azul de coomassie y rojo congo en control <i>P. pastoris</i> con el vector vacío _____	76
Figura 29 Remoción de los colorantes azul de coomassie, rojo congo y azul de bromofenol. En el control de <i>P. pastoris</i> sin el vector _____	77
Ilustración 30 Remoción total de los colorantes azul de coomassie, rojo congo, y azul de bromofenol por la cepa <i>P. pastoris</i> con la mutante de <i>Coriolopsis gallica</i> _____	77

Lista de tablas

Tabla 1 Tipos de colorantes por su grupo cromóforo _____	17
Tabla 2 Tipos de colorantes que se producen en México _____	21
Tabla 3 Países productores de colorantes a nivel mundial _____	21
Tabla 4 Procesos químicos para la remoción de colorantes en aguas residuales _____	23
Tabla 5 Métodos físicos para la remoción de colorantes en aguas residuales _____	23
Tabla 6 Lista de algunos microorganismos capaces de remover colorantes _____	26
Tabla 7 Tasa de crecimiento específica (día) comparativa de las cepas de <i>P. ostreatus</i> en presencia de colorantes recalcitrantes _____	36
Tabla 8 Crecimiento del hongo en el medio con cada uno de los colorantes _____	39
Tabla 9 Porcentajes de degradación de los colorantes _____	40
Tabla 10 Crecimiento de <i>P. pastoris</i> (WT) en medio BMGY _____	49
Tabla 11 Crecimiento de <i>P. pastoris</i> (mutante) en medio BMGY _____	49
Tabla 12 Crecimiento del control <i>P. pastoris</i> con vector vacío en medio BMGY _____	49
Tabla 13 Crecimiento del control <i>P. pastoris</i> sin vector en medio BMGY _____	50
Tabla 14 Crecimiento de <i>P. pastoris</i> WT donde se agregó azul de coomassie _____	51
Tabla 15 Crecimiento de <i>P. pastoris</i> F357L donde se agregó azul de coomassie _____	51
Tabla 16 Crecimiento del control <i>P. pastoris</i> con el vector vacío (azul coomassie) _____	51
Tabla 17 Crecimiento del control <i>P. pastoris</i> sin vector (azul de coomassie) _____	52
Tabla 18 Crecimiento de <i>P. pastoris</i> silvestre donde se agregó azul de bromofenol _____	53

Tabla 19 Crecimiento de <i>P. pastoris</i> F357L donde se agregó azul de bromofenol _____	53
Tabla 20 Crecimiento del control <i>P. pastoris</i> con el vector vacío (azul de bromofenol) _____	53
Tabla 21 Crecimiento del control <i>P. pastoris</i> sin vector (azul bromofenol) _____	54
Tabla 22 Crecimiento de <i>P. pastoris</i> (WT) donde se agregó el colorante rojo congo _____	55
Tabla 23 Crecimiento de <i>P. pastoris</i> (F357L) donde se agregó el colorante rojo congo _____	55
Tabla 24 Crecimiento del control <i>P. pastoris</i> con el vector vacío (rojo congo) _____	56
Tabla 25 Crecimiento del control <i>P. pastoris</i> sin vector (rojo congo) _____	56
Tabla 26 Actividad de lacasa en cultivos de <i>P. pastoris</i> WT (azul de coomassie) _____	58
Tabla 27 Actividad de lacasa en cultivos de <i>P. pastoris</i> F357L (azul de coomassie) _____	59
Tabla 28 Actividad de lacasa en cultivos de <i>P. pastoris</i> WT (azul de bromofenol) _____	60
Tabla 29 Actividad de lacasa en cultivos de <i>P. pastoris</i> F357L (azul de bromofenol) _____	60
Tabla 30 Actividad de lacasa en cultivos de <i>P. pastoris</i> WT (rojo congo) _____	61
Tabla 31 Actividad de lacasa en cultivos de <i>P. pastoris</i> F357L (rojo congo) _____	62
Tabla 32 Porcentajes de degradación por unidad enzimática en los tres colorantes (mutante y silvestre) _____	64
Tabla 33 Remoción de azul de coomassie (WT) _____	66
Tabla 34 Remoción de azul de coomassie (F357L) _____	66
Tabla 35 Remoción del colorante azul de coomassie (control vector vacío) _____	67
Tabla 36 Remoción del colorante azul de coomassie (control sin vector) _____	67
Tabla 37 Remoción del tinte azul de bromofenol (WT) _____	68
Tabla 38 Remoción del tinte azul de bromofenol (F357L) _____	68
Tabla 39 Remoción de azul de bromofenol (control vector vacío) _____	68
Tabla 40 Remoción de azul de bromofenol (control sin vector) _____	68
Tabla 41 Remoción del colorante rojo congo (WT) _____	69
Tabla 42 Remoción del colorante rojo congo (F357L). _____	69
Tabla 43 Remoción del colorante rojo congo (control vector vacío) _____	70
Tabla 44 Remoción del colorante rojo congo (control sin vector) _____	70
Tabla 45 Porcentaje de remoción total de los colorantes _____	71

Resumen

En la actualidad el uso de colorantes industriales, ha aumentado debido a la demanda de estos en varios sectores, provocando la contaminación de lagos y suelos por la ineficiencia del tratado de sus residuos. Debido a esta problemática se han realizado diversos estudios para la remoción de estos remanentes.

Por lo tanto se realizó el siguiente trabajo, en el cual se utilizaron tres colorantes importantes en la industria textil: azul de coomassie utilizado también en laboratorios de biología molecular para la cuantificación de proteínas, azul de bromofenol utilizado en tinciones histológicas y el colorante rojo congo, el cual se ha demostrado que es un potencial carcinogénico. La remoción de estos tintes fue llevada a cabo por dos lacasas de *Corioloopsis Gallica* (mutante y silvestre) expresadas en *Pichia pastoris*.

Los experimentos se realizaron en medios de cultivos con CuSO_4 el cual es un cofactor de la enzima, y metanol como fuente de carbono e inductor del vector α -fLcCg-pPICZB. Se utilizaron dos controles *P. pastoris* con el vector vacío y sin el vector. Durante el procedimiento se midió la actividad volumétrica de lacasa, el crecimiento de las cepas y la disminución de la absorbancia en los colorantes.

En los resultados se observó una degradación por unidad enzimática del colorante azul de coomassie de 2.47% por la lacasa silvestre y 19.4% por la lacasa mutante, la decoloración del tinte azul de bromofenol fue de 6.8% por la lacasa silvestre y por la mutante fue de 7%, en el caso del colorante rojo congo el porcentaje de degradación fue de 13.2% (lacasa silvestre) y 14.3% (lacasa mutante).

Un punto importante en esta investigación, fue la observación de la biosorción de la levadura por los colorantes, esto fue confirmado en los porcentajes de remoción total de los controles, donde se observa una remoción promedio del colorante azul de coomassie de 44.2%, 25% (colorante azul de bromofenol) y 68% (rojo congo).

Palabras clave: azul de coomassie, azul de brofomenol, rojo congo, *Coriolopsis gallica*, *Pichia pastoris*, lacasa silvestre, lacasa mutante, porcentajes de degradación, porcentajes de remoción total, biosorción.

Summary

Currently the use of industrial dyes has increased due to the demand of these in various sectors, causing the contamination of lakes and soils by the inefficiency of the treaty of their waste. Due to this issue several studies have been carried out for the removal of these remnants.

Therefore, the following work was carried out, using three important dyes in the textile industry: coomassie blue also used in molecular biology laboratories for the quantification of proteins, bromophenol blue used in histological stains and congo red dye, which has shown to be a carcinogenic potential.

The removal of these dyes was carried out by two laccases of *Coriolopsis Gallica* (mutant and wild) expressed in *Pichia pastoris*.

The experiments were performed in culture media with CuSO₄ which is a cofactor of the enzyme, and methanol as a carbon source and inducer of the vector α -fLcCg-pPICZB. Two *P. pastoris* controls were used with the empty vector and without the vector. During the procedure, the laccase volumetric activity, the growth of the strains and the decrease of the absorbance in the dyes were measured.

In the results, the degradation by enzymatic unit of the coomassie blue dye was 2.47% by the wild laccase and 19.4% by the mutant laccase, the discoloration of the bromophelon blue dye was 6.8% by the wild laccase and by the mutant was 7%, in the case of congo red dye, the degradation percentage was 13.2% (wild house) and 14.3% (mutant laccase).

An important point in this investigation was the observation of the biosorption of the yeast by the dyes, this was confirmed in the percentages of total removal of the controls, where an average removal of the coomassie blue dye was 44.2%, 25% was observed in the blue bromophenol dye and 68% Congo red.

Key words: coomassie blue, brofomenol blue, Congo red, *Coriolopsis gallica*, *Pichia pastoris*, wild laccase, mutant laccase, degradation percentages, total removal percentages, biosorption.

Capítulo I

Introducción

Actualmente la industrialización y la urbanización han generado una gran cantidad de desechos vertidos al medio ambiente. El agua es uno de los recursos fundamentales para la vida, que se ha visto severamente afectado por estos remanentes (Dwivedi y Singh, 2018).

Algunos de los contaminantes principales del agua son los desechos urbanos, agrícolas, industriales, y mineros. Dentro de los residuos generados por industrias textiles se encuentran las sales (NaCl y Na_2SO_4 provenientes del teñido), agentes surfactantes como fenoles, metales pesados que se encuentran presentes en los colorantes, compuestos orgánicos como solventes clorados provenientes del lavado y la limpieza de máquinas, biocidas como el pentaclorofenol proveniente de fibra de lana contaminada y aniones tóxicos como el sulfuro presente en algunos colorantes (Cortazar *et al.* 2010).

El agua residual que se libera de las industrias textiles es canalizada a los cuerpos de agua, siendo una de las principales causas de riesgo ambiental. El principal problema que genera la industria textil es el gran volumen de efluentes (Dwivedi y Singh, 2018).

Por otra parte, la industria textil es de gran importancia en el mercado nacional, debido a que presenta alta producción y genera gran cantidad de empleos en el país. De acuerdo con los datos de los censos económicos de 2010 reportados por INEGI, este sector contribuye con el 0.7% de la producción del PIB nacional y con el 4% del PIB manufacturero (Reyes, 2010).

Como se mencionó anteriormente la industria genera residuos como lo son los colorantes, éstos compuestos poseen la capacidad de dar color, o teñir sustancias, fibras, alimentos, fármacos entre otros. Los colorantes se han utilizado desde la antigüedad, donde se usaban sustancias vegetales, ahora la demanda de

producción ha generado que se utilicen colorantes de naturaleza sintética que dificultan su remoción (Mendéz, 2013).

Estos compuestos se diseñan para ser altamente resistentes, incluso a la degradación microbiana, por lo que son difíciles de eliminar en las plantas de tratamiento convencionales (Dwivedi y Singh, 2018).

Una gran cantidad de pigmentos y colorantes sintéticos son utilizados en diferentes industrias como la textil, del papel, cosmética y farmacéutica, entre otras. En consecuencia, muchas actividades industriales liberan grandes cantidades de efluentes contaminados con colorantes al ambiente (Cortazar *et al.* 2014).

Durante el procedimiento de teñido se originan gran cantidad de remanentes con tintes, ya que alrededor del 30% de estos compuestos se desaprovechan debido a las ineficiencias del proceso de aplicación de color. El uso de una amplia diversidad de colorantes químicos da como resultado, en periodos cortos de tiempo, a residuos extremadamente variados en su composición, que necesitan un tratamiento de agua muy complejo (Cortazar *et al.* 2010).

Más del 90% de colorantes son persistentes después de tratamientos con lodos activados. Este método consiste en un depósito agitado, aireado y alimentado con agua residual, en el cual se desarrollan cultivos microbianos capaces de metabolizar los contaminantes presentes en el agua asimilándolos como nutrientes. Además, los colorantes son recalcitrantes a acciones depurantes con dichos tratamientos (Cortazar *et al.* 2010). Así mismo muchas de las estructuras químicas de las moléculas de tintes toleran la exposición solar o el ataque químico, (Cortazar *et al.* 2010).

Se ha comprobado que ciertos colorantes de tipo “azo” (con un enlace $R-N=N-R$) pueden ser carcinogénicos, además de que sus productos de degradación pueden ser más tóxicos. Las aminas aromáticas que se forman de la ruptura del enlace azo son comúnmente conocidas por su potencial carcinógeno (Cortazar *et al.* 2014).

Existen diferentes procesos para la remoción de estas sustancias como lo son los métodos químicos y físicos, dentro de estos encontramos la ozonización, procesos oxidativos, oxidación por hipoclorito de sodio, procesos fotoquímicos, destrucción electroquímica, adsorción, intercambio iónico, membranas de filtración entre otros; estos sistemas suelen ser eficaces en cuanto a la remoción pero, sus costos son elevados y los productos de degradación que generan suelen ser más tóxicos y persistentes para el ambiente (Garzon, 2009).

También encontramos métodos biológicos para la degradación de estos compuestos en los cuales se han utilizado diferentes tipos de microorganismos como hongos, bacterias y algas, los cuales metabolizan estos compuestos utilizando mecanismos enzimáticos que les ayudan a degradar el contaminante y utilizarlo como fuente de energía (Garzon, 2009).

Muchos microorganismos producen enzimas oxidativas de baja especificidad que se denominan enzimas ligninolíticas. El uso de estas enzimas en procesos de degradación, ha demostrado ser más ventajoso y rápido. Debido a la baja especificidad por el sustrato y a las grandes capacidades oxidantes de las enzimas lacasas (cierto tipo de enzimas ligninolíticas que usan oxígeno ambiental para llevar a cabo su función), se ha ampliado el uso de estas en procesos industriales (Patrick *et al.*, 2009). En la industria textil, el desarrollo de procesos basados en lacasas mejora el potencial de degradación de colorantes con diversas estructuras químicas incluyendo colorantes sintéticos (Hou *et al.*, 2004; Mohorcic *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2007) y también en la obtención de colorantes menos tóxicos.

Actualmente las lacasas han sido estudiadas como modelos en la degradación de colorantes, mostrando excelentes resultados. Estas enzimas son fenol oxidasas multicobres que decoloran a los tintes azoicos a través de un mecanismo de radicales libres altamente inespecíficos que conforman compuestos fenólicos, evitando la formación de sustancias aromáticas de mayor toxicidad (Zille *et al.* 2005).

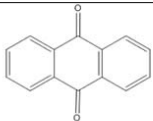
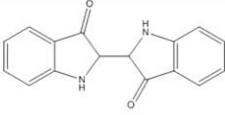
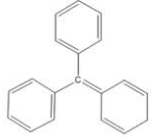
Capítulo II

Marco teórico

2.1 Colorantes:

En el campo de la química, se define colorante, a una sustancia que tiene la capacidad de absorción de distintas y concretas longitudes de onda dentro del espectro de la luz visible. Los colorantes se fijan en sustancias otorgándoles una coloración estable, por lo que no suelen ser alteradas por factores como la luz, oxidantes, agua, entre otros (Mendéz, 2013).

Los colorantes tiñen a una sustancia incolora, o bien un sustrato por medio de una absorción selectiva de luz, sus moléculas están formadas por tres grupos funcionales el cromóforo es el responsable de la absorción de la luz, confiriéndole la propiedad de color a la molécula. Los auxocromos, que dan la afinidad por la fibra e intensifican el color; y por último el solubilizador le otorga afinidad a diversos solventes y está dado por la presencia de iones como $-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$, $-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$, $-\text{SO}_2^-\text{NH}_2^+$, $-\text{O}^-\text{Na}^+$ (Garzon, 2009).

Familia	Grupo cromóforo	Gama de colores
Azoicos	$-\text{N}=\text{N}-$	Amarillo-Azul
Antraquinonas		Amarillo-Violeta
Indólicos		Azul-Violeta
Triarilmetano		Naranja-Violeta

Los grupos cromóforos más comunes son los azo ($-\text{N}=\text{N}-$), carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), metilo ($-\text{CH}_3$), nitro y grupos quinoides (tabla1). También pueden agruparse de acuerdo a su aplicación: directos, reactivos, dispersos, entre otros (Cortazar *et al.* 2010).

Tabla 1 tipos de colorantes por su grupo cromóforo (Cortazar *et al.* 2010).

2.1.1 Rojo Congo

El rojo congo es un colorante diazo-aniónico (figura 1), también conocido como sal del ácido naftilensulfónico 3,3'-(4,4'-bifenileno)bis (azo) bis (4-amino) disódico. Se prepara por una tetradiazotación con bencidina y ácido naftilsulfónico. Los enlaces covalentes en la molécula le confieren estabilidad, que junto con la estructura molecular compleja dificultan la biodegradación y fotodegradación (Martínez, 2012). Este colorante además de afectar la solubilidad de oxígeno en los cuerpos de agua y su transparencia, se ha reportado como altamente tóxico para los seres vivos por provocar carcinogénesis y teratogénesis, daños respiratorios, alergias y problemas durante el embarazo (Martínez, 2012).

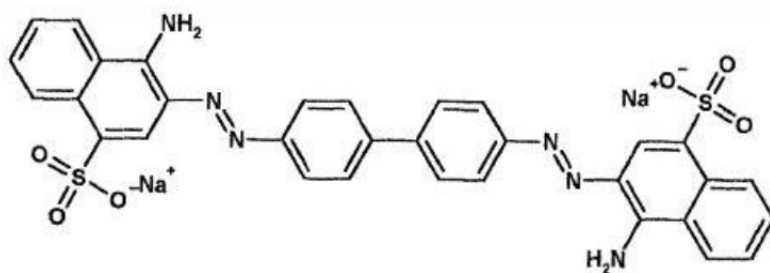


Figura 1 estructura química del colorante rojo congo (Mártinez, 2012).

El colorante aniónico puede ser metabolizado a bencidina conocida por ser carcinogénica. Los efluentes que contienen el colorante rojo congo provienen de la industria textil, teñido de plásticos, e imprentas, entre otras (Martínez, 2012).

Además, tiene usos como indicador de pH, en bioquímica e histología es utilizado en tinciones del citoplasma y los eritrocitos. Indica la presencia de fibras amiloides. También en bacteriología es usado para determinar la presencia de *Shigella flexneri* (EcuRed, 2014). Se adhiere también a fibras de celulosa por lo que también es indicador de la actividad de celulasas.

2.1.2 Azul de bromofenol

Es un compuesto orgánico usado en análisis de laboratorio como indicador de pH. También se le conoce como 3,3,5,5 -tetrabromofenol sulfonftaleína o "azul de tetrabromofenol" (figura 2). Es una sustancia sólida formada por un polvo cristalino

de color canela a naranja o rojizo a púrpura. Su punto de ebullición es de 279 °C (se descompone) y su temperatura de fusión es de 270-273 °C (Iriarte y Gavira, 2013).

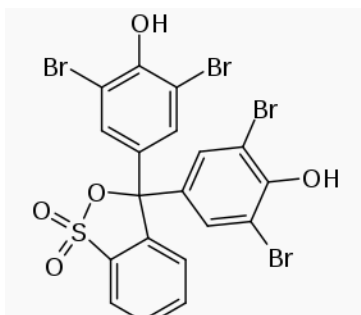


Figura 2 estructura química del colorante azul de bromofenol (Iriarte y Gavira, 2013).

El azul de bromofenol (BPB, por sus siglas en inglés) es un ejemplo de colorante industrial derivado de trifenilmetano. Su mayor concentración de las externalidades industriales podría alcanzar un máximo de 50 mg.L para períodos de intensas actividades industriales. Una cantidad sustancial de colorante se pierde durante el proceso de teñido, a su vez esto genera un problema importante para su eliminación; ya que se ha reportado que procesos como oxidación física, bioquímica y técnicas químicas no han tenido éxito en cuanto a su degradación en aguas residuales (Djepang *et al.* 2014).

2.1.3 Azul de coomassie

El azul de Coomassie es un colorante derivado del trifenilmetano no azoico (figura 3) comúnmente presente en los residuos de la industria textil y también se usa ampliamente como reactivo para determinar la concentración de proteínas (por ejemplo, el ensayo de proteínas de Bradford). Su vertido continuo en los ríos puede causar varios problemas al ecosistema, como la inhibición de la penetración de la luz solar en el agua (reducción de fotosíntesis) y el aspecto desagradable del agua (Canteli *et al.* 2014).

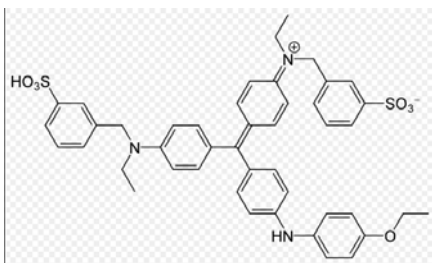


Figura 3 estructura química de azul de comassie (Canteli et al. 2014).

2.2 Contaminación por colorantes industriales

La coloración de aguas residuales se genera como consecuencia de los procesos que se llevan a cabo principalmente en industrias alimentarias, textiles, del papel y farmacéuticas. De los colorantes que se utilizan en industrias textiles un 2% es descargado directamente a los cuerpos de agua y el 10% se pierde durante el proceso de teñido. Los colorantes mayormente utilizados en las textileras son los de tipo azo (30%), los cuales son empleados para la tinción de fibras de celulosa (Garzon, 2009).

La mayoría de los colorantes son compuestos químicos xenobioticos, los cuales no están presentes de forma natural en el ambiente, es decir, que fueron sintetizados por el hombre, tienen una complejidad estructural, en consecuencia, las plantas de tratamiento convencionales remueven un porcentaje bajo de tintes, por lo tanto, estos suelen ser vertidos sin tener tratamiento previo (Garzon, 2009).

Los residuos provocan diferentes impactos al medio ambiente como la contaminación del agua generando variaciones como son sólidos suspendidos, carga iónica, toxicidad, concentración de oxígeno (Garzon, 2009).

Además, en la salud se ha visto que pueden contener sustancias como ácido benzóico y ácido acetilsalicílico que pueden generar alergias y reacciones en personas sensibles. También se ha observado que algunos pueden ser carcinogénicos (Garzon, 2009).

La toxicidad se ha evaluado empleando distintos bioindicadores como *Daphnia magna*, *Salmonella thyphimurium* y peces, También se han generado ensayos en ratas e incluso monitoreos biológicos a trabajadores de la industria textil (Cortazar

et al. 2012). También poseen alta capacidad de bioacumulación y una baja velocidad de despolimerización, provocando que sean persistentes (Garzon, 2009).

2.3 Producción y consumo de colorantes en México y en el mundo

La producción anual total para el año 1997 fue de 9,490 toneladas y el consumo para el mismo año alcanzó las 20,406 toneladas. La diferencia es cubierta por las importaciones, por lo que se importa más de lo que se produce. La tabla muestra el consumo de varias clases de colorantes producidos en México (tabla 2), en donde se puede observar que los colorantes dispersos son los que tienen mayor consumo (Piña, 2007).

Tabla 2 tipos de colorantes que se producen en México (Piña, 2007)

TONELADAS	Colorantes ácidos	Colorantes básicos	Colorantes directos	Colorantes dispersos	Colorantes para alimentos	Otros colorantes
Producción	250	2448	306	2137	1100	3205
Importación	1822	1137	1171	2363	161	6480
Exportación	155	1160	15	999	270	27
Consumo	1917	2425	1462	3501	991	9658

A nivel mundial, los colorantes más utilizados provienen de la industria textil, papelería, cosmética, y farmacéutica, estos son del tipo azo. Entre los principales países productores de colorantes, se encuentran: Alemania, Inglaterra, Suiza, Japón, Taiwán y Estados Unidos (tabla 3). Al inicio del siglo 20, el 85% de la producción mundial de colorantes fue fabricada en Alemania. Países europeos como Suiza, Reino Unido y Francia, aportaron más del 10% de la producción (Piña, 2007).

Tabla 3 países productores de colorantes a nivel mundial (Piña, 2007).

<i>Países</i>	Producción en miles de toneladas
Europa occidental (Alemania, Reino Unido, Suiza, Francia, Italia, España, Bélgica entre otros)	300
Estados Unidos de América	138
Euroasia (URSS, China)	200
Japón	68
Otros	44
Total	750

2.4 Métodos convencionales para el tratamiento de aguas residuales con colorantes.

Actualmente se utilizan métodos de remoción de naturaleza química, física y biológica, dentro de los procesos físicos y químicos (tabla 4 y 5) específicamente se han utilizado para la degradación de colorantes los procesos de adsorción, neutralización, coagulación, degradación química, degradación fotocatalítica, ozonación, filtración por membrana e intercambio iónicos. A pesar de que estos producen efluentes con alta remoción, tienen un elevado costo y pueden producir subproductos con mayor toxicidad, por lo cual se ha visto favorecido el uso de procesos biológicos (Garzon, 2009).

El método químico más utilizado debido a su simplicidad en su aplicación es el uso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual puede ser activado por diferentes factores como lo es la luz ultravioleta (UV). El método de decoloración variará dependiendo de la forma por la cual el peróxido de hidrógeno sea activado, con esto se prevé que posterior al mecanismo de oxidación se rompa un anillo aromático de la estructura del colorante (Garzon, 2009).

Tabla 4 procesos químicos para la remoción de colorantes en aguas residuales (Garzon, 2009).

MÉTODOS QUÍMICOS			
Reactivo Fenton	Tratamiento para aguas con biomasa viva. Uso de combinación de peróxido de hidrógeno y sulfato ferroso, presión y temperatura.	Produce cambio estructural de compuestos orgánicos, disminuye toxicidad. Producción de floculantes no deseados.	Martínez, <i>et al.</i> 2001 Robinson, <i>et al.</i> 2001
Ozonación	Oxidación de hidrocarburos, fenoles, pesticidas y aromáticos por medio de ozono.	Decoloración de efluente. Genera compuestos secundarios tóxicos, posee corto periodo de reacción.	Robinson, <i>et al.</i> 2001
Fotoquímicos	Degradación de colorantes por tratamiento con rayos UV, en presencia de peróxido de hidrógeno.	Oxidación de material orgánico, reducción de olores y ausencia de lodos. Altos costos.	Robinson, <i>et al.</i> 2001
Hipoclorito de sodio	Ataca por medio del cloro el grupo amino del colorante	No apto para colorantes dispersos. Producción de aminas aromáticas.	Robinson, <i>et al.</i> 2001
Curcubitúril	Permite procesos de adsorción de los colorantes	Remoción del colorante. Alto costo	Robinson, <i>et al.</i> 2001

Tabla 5 métodos físicos para la remoción de colorantes en aguas residuales (Garzon, 2009).

MÉTODOS FÍSICOS			
Adsorción	Decoloración por adsorción e intercambio iónico con el colorante	Eficiencia solo bajo condiciones específicas de temperatura pH, etc.	Robinson, <i>et al.</i> 2001

Turba	Decoloración por adsorción del colorante	No necesita activación y posee bajos costos. Puede ser reutilizada.	Robinson, <i>et al.</i> 2001
Viruta	Decoloración por adsorción del colorante	No es tan eficiente como otros sorbentes. Se necesitan repetidos tiempos de contacto.	Robinson, <i>et al.</i> 2001
Carbón y cenizas	Decoloración por adsorción del colorante	Alta superficie de adsorción.	Robinson, <i>et al.</i> 2001
Gel de silicona	Remoción de colorantes básicos por adsorción.	No tiene la misma eficiencia con todos los colorantes.	Robinson, <i>et al.</i> 2001
Materiales orgánicos	Decoloración por adsorción del colorante	Bajo costo, fácil regeneración, utilización posterior.	Robinson, <i>et al.</i> 2001
Membranas de filtración	Clarifica, concentra y separa los colorantes del efluente de manera constante.	Resistencia a temperatura, ambientes químicos y ataque microbiano. Residuos secundarios, taponamiento del filtro, no reutilización.	Robinson, <i>et al.</i> 2001

2.5 Procesos biológicos para el tratamiento de las aguas residuales con colorantes.

El proceso de biorremediación es llevado a cabo por el uso de organismos como plantas, hongos, bacterias y algas, los cuales son capaces de metabolizar compuestos tóxicos y utilizarlos como fuente de energía, provocando que estos contaminantes se vuelvan inofensivos para el ambiente (Cortazar *et al.* 2012). Actualmente estas técnicas han sido muy efectivas para el tratamiento degradativo de colorantes en aguas residuales, tienen ventajas, ya que estos procesos son amigables con el medio ambiente y son menos costosos (Cortazar *et al.* 2012).

2.5.1 Biosorción

Una técnica de gran importancia y novedosa para la remoción del color de efluentes es la adsorción o absorción de las sustancias coloridas en varios materiales como: aserrín, carbón activado, arcillas, suelos, composta, lodos activados, comunidades

vegetales, polímeros sintéticos o sales inorgánicas coagulantes. El proceso de biosorción se lleva a cabo con el uso de la biomasa. En este proceso la decoloración se realiza por la saturación y posterior biosorción del colorante sobre las células, ocurriendo esto con o sin biodegradación del contaminante. Varias especies de bacterias y hongos han sido reportadas por su capacidad para remover colorantes utilizando el proceso de adsorción (Cortazar *et al.* 2012).

Se ha documentado que la decoloración de una solución del colorante azo (rojo 23), utilizando una cepa de *Proteus mirabilis*, que fue aislada de lodos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales; el porcentaje de decoloración fue entre 13 y 17 %, debido al proceso de biosorción de estas células bacterianas (Chen *et al.* 1999).

También se ha visto que se puede lograr la eliminación del color mediante biosorción usando células de hongos. En algunos casos, el mecanismo de decoloración implica, además, un proceso de degradación enzimática. Estos métodos no se han aplicado al tratamiento de aguas residuales en gran escala, debido a problemas asociados con el manejo de la biomasa residual que se obtiene después de la biosorción (Cortazar *et al.* 2012).

2.5.2 Biodegradación

La biodegradación de tintes industriales es llevada a cabo por medio de diferentes procesos; como lo son el emplear cultivos mixtos que contengan dos grupos de especies, el primero formado por organismos que no participan en la degradación del colorante, pero que estabilizan el consorcio microbiano, y un segundo grupo que incluya a las especies encargadas en el rompimiento del grupo funcional de la molécula y la transformación de los productos metabólicos resultantes. Otra manera de llevar a cabo la biodegradación es mediante microorganismos aislados que son capaces de degradar los colorantes. Y finalmente el uso de remediación enzimática (Cortazar *et al.* 2012).

Se puede observar en la tabla 6 una gran variedad de microorganismos capaces de degradar colorantes. Algunos de ellos como los actinomicetos han demostrado que

pueden degradar compuestos xenobióticos por su capacidad de producir enzimas ligninolíticas. La capacidad de los actinomicetos, principalmente especies de *Streptomyces*, para decolorar y mineralizar colorantes textiles se ha comprobado en diferentes estudios. También una gran cantidad de bacterias reducen los enlaces azo de los colorantes textiles, este proceso es el paso inicial en la degradación bacteriana de colorantes de tipo azo (Stolz 2001; Pandey *et al.* 2007).

Tabla 6 lista de algunos microorganismos capaces de remover colorantes (Cortazar *et al.* 2012).

	Especie	Mecanismo
BACTERIAS	<i>Citrobacter sp.</i>	Biodegradación- bioabsorción
	<i>Proteus mirabilis</i>	Biodegradación- bioabsorción
	<i>Streptomyces sp.</i>	Peroxidasa
	<i>S. chromofuscus</i> ,	Peroxidasa
	<i>Shewanella decolorationis</i>	Reducción anaeróbica
	<i>Proteus vulgaris</i>	Reducción anaeróbica
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Biodegradación aerobia
	<i>Bacillus subtilis</i>	Biodegradación aerobia
HONGOS	<i>Funalia trogii</i>	Adsorción- biodegradación
	<i>Aspergillus niger</i>	Adsorción- biodegradación
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Lignina peroxidasa
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Peroxidasa
	<i>Trametes versicolor</i>	Biosorción Ligninasa

La decoloración de colorantes azo se puede realizar de manera aerobia o anaeróbica, dependiendo del tipo de bacteria que lo lleve a cabo. Hay otros estudios sobre el metabolismo aerobio de colorantes azo utilizando diferentes cepas de bacterias *Aeromonas sp*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas luteola* (Cortazar *et al.* 2012).

La azorreducción puede ser estimulada por la adición de inductores como el CaCl_2 (Dawkar *et al.* 2009) o co-sustratos como la glucosa (Haug *et al.* 1991). Además de colorantes azo, también esta reportada la degradación bacteriana de otro tipo de colorantes. *Citrobacter sp.* es capaz de decolorar varios colorantes recalcitrantes de tipo azo y trifenilmetano, por medio de mecanismos de biosorción y biodegradación. El cristal violeta (colorante trifenilmetano) puede ser degradado a través de una mineralización aeróbica por bacterias como *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas putida* (An *et al.* 2002).

Se ha visto que algunas bacterias tienen la capacidad de romper el enlace azo de algunos colorantes en condiciones anaerobias, dando lugar a la decoloración y formación de aminas aromáticas. En algunos casos, la remoción puede estar acompañada no sólo de la degradación del colorante, sino de la producción de aminas aromáticas. Se ha obtenido la completa mineralización de colorantes de tipo azo utilizando consorcios microbianos en condiciones anaerobias (Cortazar *et al.* 2012).

También algunos consorcios son capaces de mineralizar completamente colorantes en sistemas aerobios-anaerobios o bien bajo condiciones anóxicas. Se logró la completa mineralización de un colorante azo bajo condiciones anaerobias, utilizando un consorcio bacteriano crecido en condiciones aeróbicas. La velocidad de degradación dependerá de diferentes factores, como: la temperatura, los nutrientes, el pH, así como de la especificidad de la enzima por el sustrato (Cortazar *et al.* 2012).

Por otro lado, también se han estudiado hongos como posibles organismos para biorremediación de colorantes industriales. Los hongos de mayor relevancia son de la podredumbre blanca en cuanto a la remoción de colorantes, debido a que presentan la capacidad de degradar sustratos complejos a través de un sistema enzimático no específico. La decoloración por estos hongos fue mencionada por primera vez por Glenn y Gold en 1983, quienes evaluaron la decoloración de tintes poliméricos sulfonados utilizando *Phanerochaete chrysosporium*. Hasta la actualidad se han publicado varios estudios en los cuales se evalúa la capacidad de *P. chrysosporium* y de otros hongos como *Cyathus bulleri*, *Trametes versicolor*, *Phlebia tremellosa*, *The-lephora* sp. para degradar colorantes (Cortazar *et al.* 2012).

Además, la pared celular de los hongos es mucho más compleja que la pared celular bacteriana. Como suele ser de polisacáridos, existen múltiples grupos funcionales (especialmente hidroxilos, ácidos orgánicos y grupos amino, que al estar cargados pueden favorecer tanto la adsorción como la degradación de los colorantes). También es el caso de que los hongos presentan vacuolas (de las que carecen las

bacterias) en donde suelen acumularse compuestos tóxicos dándole a los hongos una mayor tolerancia a altas concentraciones de colorantes

2.5.3 Métodos enzimáticos

Las células vivas son consideradas como un reactor de decoloración en miniatura. Esta decoloración puede ser en consecuencia por la retención física del colorante en la biomasa o de la transformación enzimática del colorante a través del metabolismo celular. Algunas de las enzimas más importantes usadas en la degradación de colorantes son lacasas, peroxidasas, monooxigenasas y dioxigenasas entre otras. Enzimas extracelulares como las lacasas y peroxidasas por lo general son producidas por hongos de la podredumbre blanca cuya función natural es degradar la lignina. Estos son capaces de remover colorantes y otros compuestos xenobióticos debido a su naturaleza inespecífica del sistema enzimático (Cortazar *et al.* 2010). Se ha descrito la remoción de una mezcla de colorantes, simulando un efluente real, por medio de una lacasa comercial, además se obtuvo el modelo cinético de esta degradación (Cristóvão *et al.* 2009).

2.6 Ingeniería Genética aplicada a la degradación de colorantes

Los microorganismos usados en la degradación de colorantes se pueden recolectar de hábitats previamente contaminados por colorantes. Normalmente no se trata de aislar las cepas que por su adaptación natural tienen la capacidad de degradar colorantes, si no que se aprovechan de los beneficios de su presencia (Cortazar *et al.* 2012).

También, se pueden construir cepas genéticamente modificadas mediante ingeniería genética, que son capaces de degradar colorantes. Se han reportado una gran variedad de genes que les dan capacidad de degradar colorantes (Chang *et al.* 2000). Estas técnicas permiten disminuir los tiempos que se utilizarían para adaptar un cultivo apropiado y luego aislarlo. En un estudio realizado por Chang y colaboradores en el 2000 clonaron y expresaron un fragmento de ADN genómico de *Rhodococcus sp.* en *E. coli*. Este fragmento de 6.3 kb contiene los genes

encargados de la decoloración de colorantes azo. La cepa recombinante que se obtuvo tiene la capacidad de decolorar colorantes azo. (Chang & Lin 2001).

2.7 Bioquímica de lacasas

En una gran variedad de organismos se encuentran las proteínas lacasas estas son capaces de realizar reacciones de oxidación. Forman parte de las metaloproteínas llamadas oxidasas multicobre, entre las que, además se incluyen otras enzimas como la ascorbato oxidasa de plantas o la ceruloplasmina presente en el plasma sanguíneo de mamíferos (Rodríguez, 2006-a).

Las lacasas fueron encontradas por primera vez en exudados del árbol japonés del barniz (*Rhus vernicifera*) (Yoshida, 1883). Están distribuidas tanto en organismos eucariotas como en eubacterias, actinomicetos e incluso arqueobacterias, presentando una función muy variada que depende del tipo de organismo. En plantas, las lacasas se ven implicadas en una respuesta primaria a heridas; posterior a la herida, el árbol del barniz secreta un látex que, al hacer contacto con el aire, polimeriza en una reacción dependiente de lacasa, formándose una película protectora (Davies y Ducros, 2001). En tejidos leñosos forman parte del sistema de síntesis de lignina (Ranocha *et al.*1999).

En el reino de los hongos, presentan otras funciones. Por ejemplo, el ascomiceto *Aspergillus nidulans* tiene, al menos, dos lacasas, una de ellas relacionada en la coloración verde de los conidios (Aramayo y Timberlake, 1990), y otra expresada en los extremos de la hifa, con una posible función en la síntesis de la pared celular (Scherer y Fischer, 2001).

Además, se han reportado en el proceso de ataque inicial al hospedador en hongos fitopatógenos (Lewis y Yamamoto, 1990). En un estudio del hongo patógeno humano *Cryptococcus neoformans*, causante de la criptocociosis, y uno de los principales patógenos oportunistas en enfermos inmunodeprimidos, la función de la lacasa; forma parte como uno de los principales factores de virulencia (Zhu y Williamson, 2004).

Uno de los temas de mayor relevancia es la función de lacasa en la degradación de lignina por hongos de la podredumbre blanca ya que varios hongos lignolíticos con capacidad de degradar lignina y otros compuestos recalcitrantes sólo presentan este tipo de enzimas. Además, presentan mayores niveles de expresión y lacasas con potenciales de oxidorreducción más altos, factores muy importantes a la hora de desarrollar aplicaciones biotecnológicas (Rodríguez, 2006-a).

Estas enzimas podrían estar implicadas en la participación a través de la activación de mediadores de bajo peso molecular o bien, junto con oxidasas productoras de H_2O_2 , en la formación de especies activas de oxígeno, como radical hidroxilo, que actuaría como un agente oxidante difusible. Por otra parte, podrían ejercer una función protectora, facilitando la polimerización de especies reactivas producidas durante el proceso de degradación de la lignina y así proteger al hongo de la acción de estos radicales, función que sería suplementada en cepas no productoras de esta enzima mediante la secreción de glucano (Rodríguez, 2006-a).

Las lacasas son proteínas N-glicosiladas con un contenido en carbohidratos que representa entre el 10% y el 45% de la masa de la molécula. Generalmente son encontradas en forma monomérica, con una masa molecular entre 36 kDa y 80 kDa, aunque la mayoría se encuentra entre 50-70 kDa (Thurston, 1994).

También se han identificado formas multiméricas, como la lacasa de *Agaricus bisporus*, descrita como dímeros de subunidades idénticas, o la lacasa 1 de *Podospora anserina*, que aparece en forma de tetrámeros (Thurston, 1994).

Las lacasas son enzimas muy estables. Presentan un pI entre 2.6 y 4.5, y su máxima actividad varía en un amplio rango de pH, entre 2.0 y 8.5 (Thurston, 1994).

Estas enzimas catalizan la eliminación de un electrón y un protón de grupos hidroxilo fenólicos o de grupos amino aromáticos, para formar radicales fenoxilo y amino, respectivamente (Leonowicz *et al.* 2001). Pueden oxidar una gran cantidad de compuestos como p-difenol, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, y aril diaminas presentando un potencial de oxidorreducción. Los productos iniciales de oxidación son muy inestables, en consecuencia, pueden sufrir reacciones espontáneas de

hidratación y desprotonación, dando lugar a compuestos insolubles de tipo melanina o produciendo radicales que pueden reaccionar entre sí originando dímeros, oligómeros o polímeros covalentemente unidos mediante enlaces C-C, C-O y C-N. (Thurston, 1994).

Además, pueden realizar reacciones de desmetilación en el polímero de lignina y sobre ácidos metoxifenólicos (Kirk y Farrell, 1987). En caso de compuestos sustituidos, la reacción puede estar acompañada de deshalogenaciones, característica en la que se basa el uso potencial de las lacasas para detoxificar compuestos contaminantes. Al contrario que otras oxidorreductasas, las lacasas oxidan directamente el oxígeno molecular a agua por medio de un mecanismo de transferencia de cuatro electrones (Rodríguez, 2006-a).

Las oxidasas multicobre se caracterizan por la presencia de varios átomos de cobre en su estructura, en estado Cu^{2+} de oxidación. Estos átomos de cobre se agrupan en tres tipos diferentes de centros de cobre: tipo 1, tipo 2 y tipo 3. Las lacasas son el miembro más sencillo dentro de las oxidasas multicobre, presentando un único centro de cobre de cada tipo (Páez, 2012).

Estos centros de cobre se caracterizan de la siguiente manera:

- Tipo 1 (T1 o cobre azul): presenta un color azul característico (también llamadas oxidasas de cobre azul) debido a una unión covalente del átomo de cobre con un residuo de cisteína del esqueleto proteico. El pico de absorbancia máximo está alrededor de 600 nm (Claus, 2004).
- Tipo 2 (T2): no confiere ningún color, aunque si es detectable por técnicas de resonancia paramagnética electrónica (Rodríguez, 2006-a).
- Tipo 3 (T3): se trata de un centro de cobre binuclear, es decir, con dos átomos de cobre asociados (Rodríguez, 2006-a).

En las lacasas y otras oxidasas de cobre azul los centros T2 y T3 se asocian formando un centro de cobre trinuclear considerado como un híbrido T2/T3 (McGuirl y Dooley, 1999).

En la figura 4 se observa el ciclo catalítico de oxidorreducción llevado a cabo por las lacasas. En estas enzimas, los diferentes centros de cobre actúan conduciendo electrones desde un sustrato reductor hasta el oxígeno molecular de una manera controlada, sin la formación de intermediarios tóxicos (Rodríguez, 2006-a).

Esta reacción se lleva a cabo a través de cuatro oxidaciones monoelectrónicas del sustrato catalizadas en el centro de cobre T1, el cual, regula la transferencia electrónica hasta el centro T2/T3, donde tiene lugar la unión y reducción del oxígeno molecular a agua. Este primer paso de reducción del centro T1 por el sustrato constituye el paso limitante en el ciclo global de oxidorreducción de las lacasas. Con respecto a la reducción del O₂, el centro trinuclear T2/T3, reducido completamente reacciona con el oxígeno formando un intermediario tipo peróxido, en un paso de reducción con 2 electrones, donde el átomo de cobre de tipo 2 y uno de los átomos de cobre de tipo 3 se unirán mediante un enlace hidropéroxido. (Solomon *et al.* 1996).

Este intermediario se activa para formar una reducción adicional, generando un intermediario nativo el cual en los dos átomos de cobre anteriores se unirán por medio de un producto tipo oxo o tipo hidroxilo. La formación del intermediario nativo implica la ruptura del enlace O-O de la molécula de dioxígeno mediante la transferencia de 2 electrones. A su vez la reducción del oxígeno con 4 electrones tendrá lugar a través de dos pasos de reducción con 2 electrones cada uno. Al final, el intermediario nativo se relajará lentamente permitiendo a la enzima estar en reposo (Rodríguez, 2006-a).

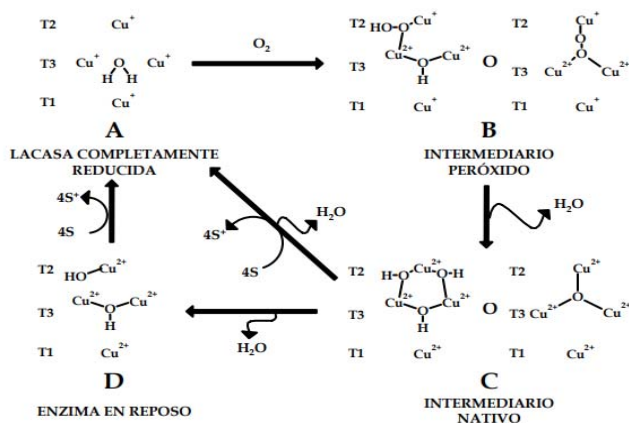


Figura 4 ciclo catalítico de oxidorreducción de las lacasas (Rodríguez, 2006-a)

2.8 Biología molecular y estructura de las lacasas

La primera secuencia de cDNA de lacasas fúngicas fue reportada por Germamm y Lerch en 1986. Ésta se encontró en el hongo *Neurospora crassa*. Posteriormente se encontraron numerosas secuencias, éstas muestran un patrón común ya que codifican para una cadena polipeptídica de entre 520-50 aminoácidos, incluyendo el péptido de secreción en el extremo terminal (Rodríguez, 2006-a).

El alineamiento de secuencias de lacasas de hongos ha mostrado que los dominios de unión al cobre se muestran altamente conservados (Kumar *et al.*, 2002), inclusive cuándo el resto de la secuencia de aminoácidos tiene baja similitud (Claus, 2003). Dentro de los dominios conservados hay diez residuos de histidina y un residuo de cisteína relacionados en la coordinación de los átomos de cobre. Estos aminoácidos y su distribución a lo largo de la cadena polipeptídica (dos histidinas cerca del extremo amino terminal y el resto cerca del extremo carboxilo), están muy conservados en las secuencias de lacasas y también en la ascorbato oxidasa (Thurston, 1994). A pesar de su amplia variedad, las oxidasas multicobre tienen un plegamiento común formado por tres bloques que pudieron evolucionar de un ancestro común (Murphy *et al.*, 2000).

2.8.1 Aplicaciones

Debido a su poca especificidad de sustrato y poder oxidativo, las lacasas son utilizadas en la remoción de herbicidas, pesticidas y compuestos xenobioticos como hidrocarburos aromáticos policíclicos. Algunos de sus usos más importantes, son la participación en la degradación de colorantes industriales, biorremediación de residuos agroindustriales (Días, 2010).

Además, se está siendo usada en la industria alimentaria para eliminar la turbidez de zumos de frutas, cerveza y vino. En el campo de la cosmética se ha aplicado como iluminador de piel y sustituyendo el peróxido de hidrógeno como agente oxidante en las fórmulas de los tintes (Días, 2010).

2.9 Coriolopsis gallica

Es un hongo que se encuentra en la madera (figura 5) en descomposición pertenece al grupo de basidiomicetos. Su descripción es la siguiente:

Tiene un “sombrero” semicircular, convexo, de 5 a 12 cm de largo, sin pie, adherido lateralmente al sustrato, a veces algo extendido en forma de costra, imbricado y superpuesto a otros; margen relativamente grueso, ondulado. Cutícula densamente vellosa en los ejemplares maduros y pelosa hacia la base, de color blanco crema con leves tonos rosados de joven, después pardo más o menos oscuro (MICOEX, 2016).

Una de las características principales de este hongo es, la capacidad de degradar componentes que se encuentran en la madera, principalmente la lignina y, en menor cantidad la celulosa, debido a esto pertenece al grupo de hongos de "podredumbre blanca". Tiene un alto interés biotecnológico en las industrias de papel (reciclaje y blanqueo), producción de cerveza y caña de azúcar o para la biorremediación de aguas residuales, debido a sus actividades ligninolíticas relacionadas con la actividad de enzimas tales como lacasas, peroxidasas de manganeso y peroxidasas de lignina (MICOEX, 2016).



Figura 5 *Coriolopsis gallica*

2.9.1 Lacasa de *Coriolopsis gallica*

Generalmente la lacasa fúngica es una proteína de aproximadamente 60-70 kDa con un punto isoeléctrico ácido de alrededor de pH 4.0, y con un óptimo de actividad entre 50°C y 70°C (Baldrian, 2006). Es una glicoproteína cuya glicosilación es responsable de la estabilidad estructural de la enzima (Vite Vallejo *et al.*, 2009).

En el caso de las lacasas producidas por el basidiomiceto *Coriolopsis gallica*, se observan algunos estudios como lo son el de Calvo y colaboradores en 1998 en el cual reportaron la producción de lacasa en *Coriolopsis gallica*; la enzima resultó interesante por su capacidad de transformar diferentes colorantes industriales. Ésta fue caracterizada bajo condiciones desnaturalizantes y se determinó un peso de 84.1 kDa. Se identificaron 4 isoenzimas con puntos isoeléctricos de 4.15, 4.20 y 4.27 (dos de ellas tienen el mismo *pI*). Su actividad máxima se obtuvo a pH 3, y a una temperatura de 70°C, con actividad estable a 28°C. Su vida media fue de 32 días a 37°C y 8 días a 60°C.

Otro estudio de la lacasa proveniente de la cepa de *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 del herbario de la Universidad de Alberta presentó una sola isoenzima con un punto isoeléctrico de 3.4, un peso molecular de 66 kDa determinado por SDS-PAGE, y de 56.6 kDa determinado por MALDI-TOF, un contenido de carbohidratos de 21% y 3.3 átomos de cobre por molécula de lacasa (Vandertol-Vanier *et al.*, 2002).

Además, en el instituto de biotecnología de la UNAM se realizó la producción de lacasa del hongo ligninolítico *Coriolopsis gallica* a escala piloto en un fermentador

de 100 L. La fermentación se realizó en un medio muy económico consistente de 3% de bran flakes en un amortiguador de fosfatos de sodio 60 mM, pH 6.0, conteniendo 0.8 mM de sulfato de cobre. Se realizó la purificación de la enzima y se logró obtener una actividad específica de 313 U/mg (Roman, 2010).

2.10 Degradación de colorantes por lacasas

En el 2006 se realizó un estudio por Rodríguez y colaboradores^b, en el cual, se seleccionaron cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. Se estudió el crecimiento de ocho cepas en un medio suplementado con colorantes, azul de bromofenol y rojo fenol. Los mayores índices de crecimiento correspondieron a las cepas 3022, 3024 y 3035 para los cultivos con azul de bromofenol, y las cepas 3022, 3024 y 3028 para el medio suplementado con rojo fenol (tabla 7).

En el caso de las cepas crecidas en cultivos con azul de bromofenol se observó una estimulación del crecimiento a diferencia del rojo fenol que presentó un poco de toxicidad en las cepas dificultando su crecimiento (Rodríguez *et al.* 2006-b).

Tabla 7 tasa de crecimiento específica (día) comparativa d las cepas de *P. ostreatus* en presencia de colorantes recalcitrantes (Rodríguez *et al.* 2006-b).

Cepas	Control (APD)	Rojo fenol (0.1 %)	Bromofenol azul (0.1 %)
3022	9.4	3.3	14.8
3023	9.6	1.9	7.9
3024	6.8	3.1	13.5
3026	1.9	2.0	5.3
3028	5.9	3.1	10.9
3035	6.1	2.5	14.4

En el 2008 se publicó un trabajo acerca de la degradación de colorantes por hongos ligninolíticos. Utilizaron tintes de la industria de la mezclilla y el teñido de algodón como Rojo Cibacrón, Rojo Erionyl, Turquesa Erionyl y Azul Terasil. Se usaron siete cepas de hongos de la podredumbre Blanca, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete sordida*, *Polyporus ciliatus*, *Phlebia radiata*, *Lentinus tigrinus*, *Stereum hirsutum*, *Anthracophyllum discolor* (Cardona *et al.* 2009).

Se realizó un ensayo previo en el cual se sembraron los hongos adicionándole al medio un colorante adicional Orange II a una concentración de 100 mgL⁻¹, cada 12 hrs fue medido el halo de decoloración y se determinó la velocidad de remoción en cm/d. posteriormente se seleccionaron los dos hongos con mayor capacidad lignolítica, siendo estos *P. chrysosporium* y *P. sordida* y fueron sembrados en cajas Petri sobre medios que contenían los colorantes previamente mencionados a una concentración de 100 mg/L (Cardona *et al.* 2009).

Se midieron los diámetros de los halos formados por la decoloración en los hongos crecidos con el colorante en cajas Petri. Además, los hongos fueron sembrados en medio líquido para realizar la cuantificación del porcentaje de degradación de los colorantes, evaluar la adsorción en el micelio. Su efecto sobre la degradación y saber el perfil de crecimiento y el consumo de sustrato de cada hongo (Cardona *et al.* 2009).

Se tomaron muestras de los cultivos y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 485 nm y la concentración del colorante se obtuvo mediante una recta de calibrado Concentración de colorante (g/L) vs. absorbancia (485 nm) que fue elaborada previamente. Para determinar el grado de decoloración en los tratamientos con la mezcla de los colorantes industriales, se determinaron los perfiles espectrofotométricos de cada muestra en el rango de 450 a 650 nm, para abarcar todas las longitudes de onda en las que los colorantes absorben estando puros (Cardona *et al.* 2009).

Para cada colorante la absorbancia fue 505 nm para Rojo Cibacrón, 508 nm para Rojo Erionyl, 580 para Azul Terasil y 616 para Turquesa Erionyl. El porcentaje de decoloración se asoció con la diferencia de las áreas bajo la curva entre el tiempo inicial y final del tratamiento (Cardona *et al.* 2009).

En los resultados se observó que en el crecimiento de ambos hongos en medio sólido con los colorantes se alcanzó una velocidad 6,4 cm. de diámetro, valor similar encontrado sobre los controles en los cuales se inoculó al hongo sin los colorantes. Esto indicó que el crecimiento no fue inhibido por los tintes. Además, mostraron una

gran capacidad de degradación de los colorantes formando halos de decoloración entre 2 y 2.5 cm de diámetro. El comportamiento en la degradación (figura 6) de todos los colorantes fue similar hubo una completa remoción del tinte en 6 días (Cardona *et al.* 2009).

Se confirma la remoción del colorante por los datos del espectrofotómetro. Al final del tratamiento en el día 9 (figura 7) se muestra la ausencia de los picos característicos en el espectro del día 0. El porcentaje de decoloración fue calculado con la relación del área bajo la curva del día final respecto al área bajo la curva del día cero. Esto fue del 86% para *P. chrysosporium* y 82% para *P. sordida* (Cardona *et al.* 2009).

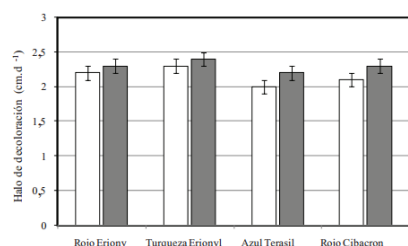


Figura 6 velocidad de degradación de los colorantes en placas Petri a 100 mg. L⁻¹, empleando los hongos *P. chrysosporium* (barra blanca) y *P. sordida* (barra oscura) Cardona *et al.* 2009.

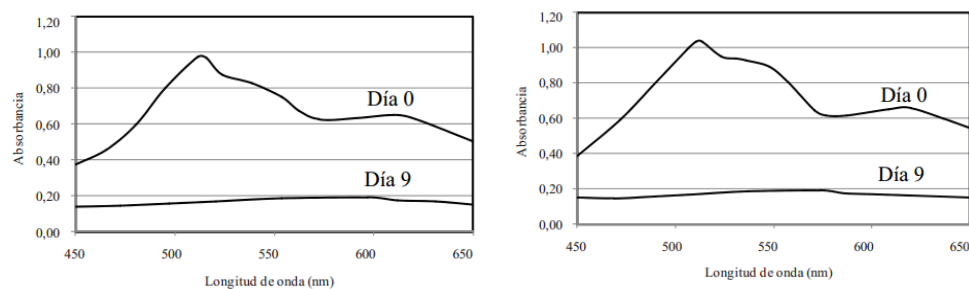


Figura 7 Espectros de absorbancia de muestras tomadas durante el tratamiento de decoloración de los colorantes en medio líquido a una concentración individual de 100 mg. L⁻¹ empleando los hongos *Phanerochaete chrysosporium* (Izquierda) y *Phanerochaete sordida* (derecha) Cardona *et al.* 2009.

Lokendra y colaboradores en 2010 publicaron un trabajo acerca de la biodegradación de colorantes rojo congo y azul de bromofenol por *Aspergillus flavus*. La cepa fue crecida en medio PDA y se le agregaron los colorantes al 1%. Se utilizaron dos controles, el primero sin colorantes para comparar el crecimiento

del hongo con y sin tintes y el segundo fue sólo medio con colorantes para observar la decoloración del medio inoculado.

La decoloración de los tintes en cajas Petri inoculadas con *A. flavus* se evaluaron mediante el cambio en el color original (en comparación con el control) y por la desaparición visual de color de las placas. El crecimiento radial del micelio fúngico (tabla 8) y el cambio en el color se midió después de un intervalo fijo de 48 horas. En los resultados se mostró la desaparición de color en las cepas inoculadas durante el crecimiento del micelio fúngico. En el caso del colorante azul de bromofenol, la placa se tornó a un color amarillo. Mientras que en la remoción de rojo congo ésta fue más eficiente, se observó la desaparición del color en los cultivos (Lokendra *et al.* 2010).

Tabla 8 crecimiento del hongo en el medio con cada uno de los colorantes (Lokendra *et al.* 2010).

Dyes tested	Fungal growth in Control (in cm) as C	Fungal growth in sample (in cm) as T	Inhibition (in %)
Bromophenol blue	2.1 (± 0.05)	1.6 (± 0.05)	23.80
Congo red	2.1 (± 0.05)	1.4 (± 0.05)	33.33

Capítulo III

Antecedentes

Balcázar y colaboradores realizaron un estudio en el 2016 en el cual expresaron una lacasa de *Trametes (Pycnoporus) saungineus* en el hongo filamentoso *Trichoderma atroviride*. Se determinó su potencial de biorremediación de la cepa transgénica probando la remoción de varios contaminantes presentes en aguas residuales, entre los cuales se hicieron pruebas con colorantes industriales (Rojo Congo (CR), Azul de Bromofenol (BPB), Azul Brillante de Coomasie (CBB) y Azul de Tripán (TB) (Balcázar *et al.* 2016).

Las pruebas de decoloración se llevaron a cabo con el extracto de la proteína utilizando inicialmente 1.7 unidades de lacasa. Se prepararon soluciones de tinte al 0,1% en tampón citrato pH 4, La absorbancia se controló a 507 nm, 592, 554 y 598 nm, respectivamente, después de una incubación de 12 horas. Se cuantificó el porcentaje de decoloración usando la fórmula: (absorbancia inicial - absorbancia final) / absorbancia inicial x 100. Finalmente se observó que la lacasa disminuyó la concentración de BPB y CR en 67.7 y 18.01% respectivamente y en el caso de CBB (tabla 9) y TB no se observó ningún efecto en la decoloración (Balcázar *et al.* 2016).

Tabla 9 porcentajes de degradación de los colorantes (Balcazar *et al.* 2016).

Dye	Wavelength (nm)	Discoloration (%)
BPB	592	67.73 ± 5.83
CR	504	18.01 ± 1.46
CBB	554	3.97 ± 1.52
TB	598	1.38 ± 0.86

Avelar y colaboradores en 2017 realizaron un estudio titulado “Expresión recombinante de una lacasa de *Corioloopsis gallica* en *Pichia pastoris* usando un “preproleader” α -factor modificado”. En este proyecto se realizó el uso de un péptido señal de preprocesador factor- α de *Saccharomyces cerevisiae* para una mejor secreción de la proteína usando el vector con el promotor pAOX1, inducible por metanol.

La secuencia del gen LcCg (secuencia génica de cDNA de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260 cultivada en condiciones de producción de lacasa) fue optimizada para su secreción incluyendo las mutaciones en el péptido señal obtenidas por Avelar et al, (2018). El gen fue sintetizado por GenScript en el vector pPICZB para probar el nivel de secreción de proteína activa en *Pichia pastoris* (Avelar et al. 2017).

En los resultados se obtuvo la producción recombinante y la purificación de la lacasa de *Corioloopsis gallica* en *P. pastoris*, un huésped heterólogo que no produce naturalmente la lacasa. Al mejorar algunos factores en las condiciones de cultivo como la temperatura, la concentración de metanol y la concentración de cobre, se logró una actividad volumétrica de 250 U/L, correspondiente a aproximadamente 3,75 mg/L de lacasa en el sobrenadante crudo. La proteína recombinante es funcionalmente similar a la enzima de tipo silvestre, como se refleja en los valores de las constantes catalíticas, lo que sugiere una adecuada coordinación de cobre y plegamiento de proteínas (Avelar et al. 2017).

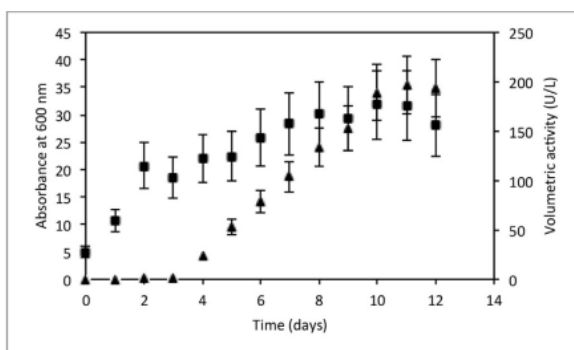


Figura 8 Perfil de crecimiento de levadura (cuadrado) y actividad volumétrica de lacasa (triángulo) para cultivo realizado en matraces de Fernbach, a 0,5 mM de cobre, 1% de metanol, 28 ° C y 250 rpm. (Avelar et al. 2017).

Además, En el 2018, Avelar y colaboradores realizaron por medio de simulaciones dinámicas moleculares predicciones de los residuos de aminoácidos en la segunda esfera de coordinación del sitio T1 Cu, esto debido a que los residuos cerca del sitio de producción de radicales libres serían objetivos para la oxidación y, en consecuencia, conducirían a la inactivación de la enzima. El objetivo era reemplazar aquellos residuos por otros menos oxidables para mejorar la estabilidad operativa de la lacasa en reacciones que involucran la formación de radicales libres, como la oxidación de fenoles, aminas y tioles. Posterior a las simulaciones se obtuvieron 3

residuos de fenilalanina: F357, F413 y F475 que son posibles objetivos oxidables de la oxidación de fenol catalizada por lacasa. Estos residuos de Phe son parte de la cavidad hidrofóbica T1 y, por lo tanto, podrían jugar un papel importante durante la catálisis.

Para el cambio de aminoácidos por residuos menos oxidables se realizó una mutagénesis dirigida. Con el fin de favorecer el plegamiento de proteínas, se seleccionaron residuos de reemplazo entre los residuos encontrados frecuentemente en otras oxidasas multicobre (MCO) de hongos y plantas. La alineación de la secuencia muestra que F357 está altamente conservado entre los MCO fúngicos, siendo la leucina un residuo menos común pero también menos oxidable. Por otro lado, los residuos alifáticos como la alanina están frecuentemente presentes en la posición F413. Se observó una alta preferencia por los residuos aromáticos en la posición 475, siendo el triptófano el residuo más frecuente en las MCO fúngicas. Debido al carácter oxidable del triptófano, se realizó una alineación con los MCO de las plantas para seleccionar un mejor candidato, encontrando que los residuos tales como valina, alanina, leucina e isoleucina están frecuentemente presentes en la posición equivalente. Después de estos análisis decidieron construir las variantes F357L y F413A. Para la posición 475 se seleccionó la isoleucina, dado que la cadena lateral de isoleucina es un buen reemplazo para la fenilalanina en términos de hidrofobicidad y volumen, y podría ayudar a preservar un plegamiento adecuado de la proteína mutante.

Se observó que las mutantes F357L y F413A se inactivan a una tasa más baja que la enzima de tipo salvaje, lo que resulta en un mayor rendimiento: más moléculas de sustrato se convierten por molécula de enzima antes de que se vuelva inactiva. Por otro lado, el mutante F475I se comporta de manera similar a lo salvaje.

La variante F475I mostró una actividad más alta que la enzima de tipo salvaje con un sustrato modelo, aunque de baja estabilidad operativa. Mientras que el caso de la variante F357L a pesar de ser menos eficiente (según los parámetros cinéticos determinados para la siringaldazina) mantuvo una buena actividad hacia el 4-metoxifenol siendo esta capaz de transformar el 4-metoxifenol a una tasa

ligeramente más baja que la enzima de tipo salvaje, además, , la actividad residual durante la oxidación del 4-metoxifenol fue mayor, lo que dio como resultado un catalizador más eficiente en términos de mostrar una mayor estabilidad operativa,

Capítulo IV

4.1 Justificación

Los efluentes que contienen grandes cantidades de tintes paulatinamente ingresan en ríos y lagos provocando la contaminación de estos, las poblaciones marinas se ven afectadas debido a que son muy propensos a la intoxicación (Manikandan *et al.*, 2012). Estas aguas no tratadas tienden a tener baja biodegradabilidad y calidad perjudicial. Los residuos pueden llegar a presentar otros contaminantes de mayor toxicidad como son las aminas (Díaz, 2017). Éstas se conocen por ser altamente mutagénicas. La remoción de estos tintes se ha llevado a cabo mediante algunos métodos físicos como son: adsorción, intercambio de moléculas, estrategia oxidativa, ozonización y coagulación, estos procedimientos pueden llegar a ser ineficientes, caros y en algunas ocasiones producen subproductos peligrosos. Actualmente se ha estudiado la biorremediación como una estrategia importante para la remoción de colorantes. La decoloración biológica es un método ecológico y rentable, por lo que es una buena alternativa. El proceso de biodegradación se lleva a cabo por las actividades metabólicas de organismos, estos utilizan a los contaminantes como fuente de carbono. Además, el uso de hongos ligninolíticos que poseen ciertas enzimas como lacasas capaces de degradar gran variedad de contaminantes por su alta inespecificidad incrementa la eficiencia de los procesos de biorremediación.

4.2 Hipótesis

La mutante F357L de la lacasa de *Coriolopsis gallica* será más eficaz en la degradación de los colorantes insustriales: azul de coomassie, azul de bromofenol y rojo congo a diferencia de la lacasa silvestre (WT) expresadas en *Pichia pastoris*.

4.3 Objetivo general

Evaluar la degradación de colorantes industriales por cepas de *P. pastoris* que expresan las lacasas de *Corioloopsis gallica* mutante F357L y silvestre, respectivamente.

4.4 Objetivos particulares

- Evaluar la biodegradación de los colorantes industriales por la lacasa silvestre producida por *P. pastoris*.
- Evaluar la biodegradación de los colorantes industriales por la lacasa f357L producida por *P. pastoris*.
- Medir actividad enzimática de la lacasa producida por ambas cepas.
- Realizar una comparación de ambas cepas y observar cual fue la que mejor removió los colorantes.

Capítulo V

Metodología

5.1 Cultivos en medio YPD

Se sembraron las cepas en cajas Petri pertenecientes a *Pichia pastoris* X33 con el vector PICZ vacío y sin el vector (controles), la mutante F357L y la silvestre que contenían el vector α -fLcCg-pPICZB con el promotor AOX1, sensible a metanol, en medio YPD (por litro: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de glucosa). Se le adicionó zeocina a una concentración de 100 μ g/mL. Las levaduras fueron crecidas a 28° C por tres días.

5.2 Cultivos en medio BMGY

Se tomaron colonias de los cultivos crecidos en placas (mutante, silvestre y controles). Éstos se resembraron por separado en 300 ml de medio líquido BMGY (por litro: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, tampón de fosfato de potasio 100 mM pH 6, 13.4 g de base de nitrógeno de levadura con sulfato de amonio y sin aminoácidos, 400 μ g de biotina y 10 g de glicerol). Las levaduras se incubaron a una temperatura de 28° C en matraces Fernbach de 2800 ml a 200rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 8-10

5.3 Cultivos en medio BMM

Las células se recuperaron después de la centrifugación a 8000 rpm a 4° C durante 15 minutos, se hizo un lavado con agua destilada para eliminar el glicerol. Se volvió a centrifugar y posteriormente las células controles, mutante y silvestre fueron resuspendidas en 200 ml de medio BMM (por litro: buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 6, 13.4 g de base de nitrógeno de levadura con sulfato de amonio y sin aminoácidos, 400 mg de biotina y 10 ml de metanol) con 0,5 mM CuSO₄ y 0,8% de alanina.

En matraces de 250 ml se agregó 30 ml del medio con las cepas ya mencionadas por separado, esto se realizó por triplicado. Se dejaron crecer las células a 28° C a 200 rpm. Se tomó la absorbancia a 600 nm de las levaduras diariamente hasta que se añadió el colorante, debido que la absorbancia del colorante interfería con la medida de absorbancia de la densidad óptica (600 nm).

Se agregó 300 µl (1%) de metanol diariamente como fuente de carbono e inducción de la lacasa.

5.4 Actividad de lacasa

Al cuarto día se realizó una prueba de actividad de lacasa utilizando siringaldazina como sustrato de la enzima y buffer de reacción (buffer de succinato 60 mM pH 4). También se midió la absorbancia (530nm) en el espectrofotómetro durante 7 días por triplicado.

5.5 Adición y degradación de los colorantes

Se agregaron los colorantes al 0.1% por separado a cada uno de los matraces previamente sembrados en medio BMM, en el día 7 cuando se observó que el crecimiento de las levaduras estaba en la fase estacionaria.

Los ensayos se realizaron por triplicado para cada colorante. Se midió la absorbancia inicial para el colorante azul de coomassie a 553 nm, la absorbancia inicial para el colorante azul de bromofenol a 591 nm y para el colorante rojo congo la absorbancia a 507 nm al añadir los colorantes y posteriormente se realizaron las mediciones diariamente por tres días.

Al cuarto día se dejó de inducir la lacasa, y se recolectaron muestras. Se midió la absorbancia del colorante para observar si había algún proceso de biosorción.

Se midieron los porcentajes de degradación por unidad enzimática utilizando como el 100% la absorbancia inicial del colorante. Esta fue la ecuación utilizada: $\frac{\text{absorbancia inicial} - \text{absorbancia final}}{\text{absorbancia inicial}} \times 100$ / unidades

enzimáticas. Se tomó como absorbancia final la del día tres donde aún se inducía la lacasa.

Posteriormente para calcular los porcentajes de remoción total de las cepas se utilizó la siguiente ecuación: $\text{absorbancia inicial} - \text{absorbancia final} / \text{absorbancia inicial} \times 100$. La absorbancia final fue la tomada el último día de medición (día cuatro).

5.6 Ensayo de degradación del colorante rojo congo por la lacasa mutante y silvestre

Al realizar el ensayo de degradación del colorante rojo congo, por ambas lacasas por el método anterior, se observó que al centrifugar la muestra, el colorante se adsorbía en la pastilla, lo que dificultaba la medición de la absorbancia, por lo que se realizó lo siguiente: en tubos de ensayo se agregó el sobrenadante recolectado el día 7 cuando se añadió el colorante, se adicionó el colorante rojo congo al .1%. Se midió la absorbancia inicial y posteriormente fue medida los dos 3 días siguientes.

5.7 Controles cepas X33 de *P. pastoris* con el vector PICZ vacío y sin vector

Se utilizó como controles las cepas de *P. pastoris* X33 con el vector vacío y sin el vector. Esta cepa fue cultivada en los medios ya mencionados, se agregó cada uno de los colorantes siguiendo el mismo procedimiento de la cepa mutante y silvestre. Se tomaron muestras y fueron centrifugadas, posteriormente se midió la absorbancia.

Capítulo VI

Resultados y discusión

6.1 Crecimiento en medio BMMGY

La levadura se dejó crecer previamente en un medio rico hasta alcanzar una absorbancia (600 nm) de 7-10. El crecimiento de la cepa silvestre (WT) fue más rápido, alcanzando la absorbancia requerida a las 22 horas mientras que la mutante (F357L), alcanzó la absorbancia a las 25 horas, los controles alcanzaron la absorbancia requerida en un promedio de 24 hrs. Los resultados se muestran en las tablas (10-13).

Tabla 10 crecimiento de *P. pastoris* (WT) en medio BMGY.

tiempo (h)	abs(600 nm)	FD	abs/real
0	0	0	0
18	0.74	10	7.4
22	0.745	10	7.5

Tabla 11 Crecimiento de *P. pastoris* (mutante) en medio BMGY

tiempo (h)	abs (600 nm)	FD	abs/real
0	0	0	0
18	0.662	2	1.244
22	0.382	10	3.82
25	0.75	10	7.5

Tabla 12 Crecimiento del control *P. pastoris* con vector vacío en medio BMGY

tiempo (h)	abs (600 nm)	FD	abs/real
0	0	0	0
12	0.248	10	2.48
24	0.781	10	7.81

Tabla 13 Crecimiento del control *P. pastoris* sin vector en medio BMGY

tiempo (h)	abs (600 nm)	FD	abs/real
0	0	0	0
12	0.216	10	2.16
24	0.764	10	7.64

6.2 Crecimiento en medio BMM

En este medio se llevó a cabo la inducción de la lacasa agregando metanol cada 24 hrs. El desarrollo de la levadura *P. pastoris* presentó un crecimiento similar, para ambas cepas la mutante y WT, en los 7 días de medición. La toma de datos se hizo antes de agregar el colorante. El colorante fue agregado después, al observar que las levaduras ya comenzaban su fase estacionaria, esto debido a que en reportes anteriores presentados por Avelar y colaboradores en 2017, se observa que durante la fase estacionaria, incluso también al comienzo de la fase de muerte, la actividad de lacasa sigue aumentando, es decir, la levadura podría estarse acabando algún nutriente del medio, pero la agregación continua del metanol, además de servir como fuente de carbono perdura la inducción de la enzima.

En el caso de la cepa silvestre tuvo un crecimiento promedio de 61.40 (absorbancia 600 nm) y el crecimiento de la mutante fue de 62.05 (absorbancia 600 nm).

Los controles tuvieron un crecimiento similar a las cepas anteriores de 60.28 (absorbancia 600 nm).

A continuación, se muestran los resultados en las tablas siguientes (14-25). La absorbancia real indica la absorbancia tomada a 600 nm multiplicada por el factor de dilución, los datos se tomaron por triplicado, por lo tanto, se tomó el promedio de estos.

Tabla 14 Crecimiento de *P. pastoris* WT donde se agregó azul de coomassie al día 7

<i>P. pastoris</i> WT (Azul de coomassie)				
DÍA	ABS (600NM)	FD	ABS/REAL	Log
0	0.6256	5	3.128	1.140393823
1	0.317	50	15.85	2.7631695
2	0.739	50	36.95	3.609565647
3	0.788	50	39.4	3.673765816
4	0.9566	50	47.83	3.867653058
5	0.538	100	53.8	3.985273467
6	0.596	100	59.6	4.087655574
7	0.6058	100	60.58	4.103964806

Tabla 15 crecimiento de *P. pastoris* F357L donde se agregó azul de coomassie al día 7

<i>P. pastoris</i> F357L (Azul de coomassie)				
DÍA	ABS (600NM)	FD	ABS/REAL	Log
0	0.389	5	1.945	0.665261977
1	0.882	20	17.64	2.870169051
2	0.5966	50	29.83	3.395514599
3	0.7426	50	37.13	3.614425268
4	0.8723	50	43.615	3.775401128
5	0.5256	100	52.56	3.961955374
6	0.563	100	56.3	4.030694535
7	0.6196	100	61.96	4.126489016

Tabla 16 crecimiento del control *P. pastoris* con el vector vacío (azul coomassie)

control <i>P. pastoris</i> vector vacío (azul de coomassie)				
DÍA	ABS (600NM)	FD	ABS/REAL	Log
0	0.251	10	2.51	0.920282753
1	0.951	10	9.51	2.252343877
2	0.756	20	15.12	2.716018371
3	1.008	20	20.16	3.003700443
4	0.738	50	36.9	3.608211551
5	0.891	50	44.55	3.796612154
6	0.552	100	55.2	4.010962953
7	0.607	100	60.7	4.105943698

Tabla 17 crecimiento del control *P. pastoris* sin vector (azul de coomassie)

control <i>P. pastoris</i> X33 sin vector (azul coomassie)				
DÍA	ABS (600NM)	FD	ABS/REAL	Log
0	0.238	10	2.38	0.867100488
1	0.972	10	9.72	2.274185618
2	0.746	20	14.92	2.702702595
3	0.986	20	19.72	2.981633349
4	0.756	50	37.8	3.632309103
5	0.885	50	44.25	3.789855371
6	0.564	100	56.4	4.032469159
7	0.615	100	61.5	4.119037175

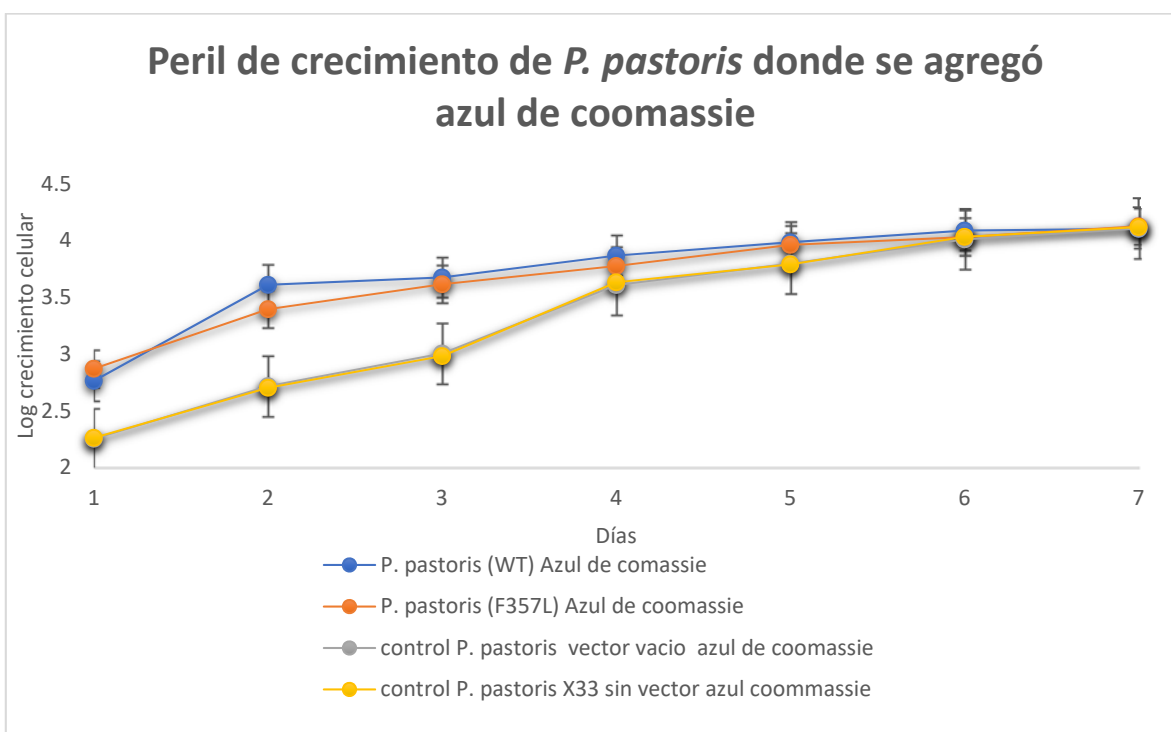


Figura 9 perfil de crecimiento de *P. pastoris* donde se agregó el colorante azul de coomassie al día 7 (WT, F357L y controles).

En la figura 9 se muestra el crecimiento de las cepas donde se agregó el colorante azul de coomassie al día 7. El cual se observa que comienza la fase estacionaria, esto debido a que resultados anteriores por Avelar demostraron que la producción de lacasa es mayor que en la fase exponencial, en el perfil se representan los crecimientos de la cepa con la lacasa silvestre que mostró un tiempo de duplicación (dt) de 5.50 horas y una velocidad específica de crecimiento de 0.126 h⁻¹.

La cepa con la lacasa mutante presento un tiempo de duplicación de 4.28 horas y una velocidad de 0.16 h⁻¹.

Los controles presentaron un tiempo de duplicación de 1.74 horas (vector vacío) y 1.7 horas (sin vector) y una velocidad de 0.39 h⁻¹ (vector vacío), 0.4 h⁻¹ (sin vector).

Tabla 18 crecimiento de *P. pastoris* silvestre donde se agregó azul de bromofenol al día 7

<i>P. pastoris</i> WT (Azul de bromofenol)				
DÍA	ABS (600NM)	FD	ABS/REAL	Log
0	0.6733	5	3.3665	1.213873629
1	0.47	50	23.5	3.157000421
2	0.7106	50	35.53	3.57037741
3	0.758	50	37.9	3.634951112
4	0.966	50	48.3	3.877431561
5	0.5866	100	58.66	4.071758064
6	0.657	100	65.7	4.185098925
7	0.634	100	63.4	4.149463861

Tabla 19 crecimiento de *P. pastoris* F357L donde se agregó azul de bromofenol al día 7

<i>P. pastoris</i> F357L (Azul de bromofenol)				
DÍA	ABS (600NM)	FD	ABS/REAL	Log
0	0.4436	5	2.218	0.796605889
1	0.744	20	14.88	2.700018029
2	0.562	50	28.1	3.335769576
3	0.688	50	34.4	3.538056564
4	0.9366	50	46.83	3.846524023
5	0.584	100	58.4	4.06731589
6	0.618	100	61.8	4.123903364
7	0.6376	100	63.76	4.155126034

Tabla 20 crecimiento del control *P. pastoris* con el vector vacío (azul de bromofenol)

control <i>P. pastoris</i> vector vacío (azul de bromofenol)				
DÍA	ABS /60nm	FD	ABS/REAL	Log
0	0.289	10	2.89	1.061256502
1	1.034	10	10.34	2.336019869
2	0.729	20	14.58	2.679650727
3	0.996	20	19.92	2.991724252
4	0.795	50	39.75	3.682609841

5	0.938	50	46.9	3.848017675
6	0.568	100	56.8	4.039536326
7	0.609	100	60.9	4.109233175

Tabla 21 crecimiento del control *P. pastoris* sin vector (azul bromofenol)

control <i>P. pastoris</i> X33 sin vector (azul de bromofenol)				
DÍA	ABS (600NM)	FD	ABS/REAL	Log
0	0.295	10	2.95	1.08180517
1	1.007	10	10.07	2.309560707
2	0.693	20	13.86	2.629006994
3	0.982	20	19.64	2.977568303
4	0.805	50	40.25	3.695110004
5	0.942	50	47.1	3.852273001
6	0.568	100	56.8	4.039536326
7	0.605	100	60.5	4.102643365

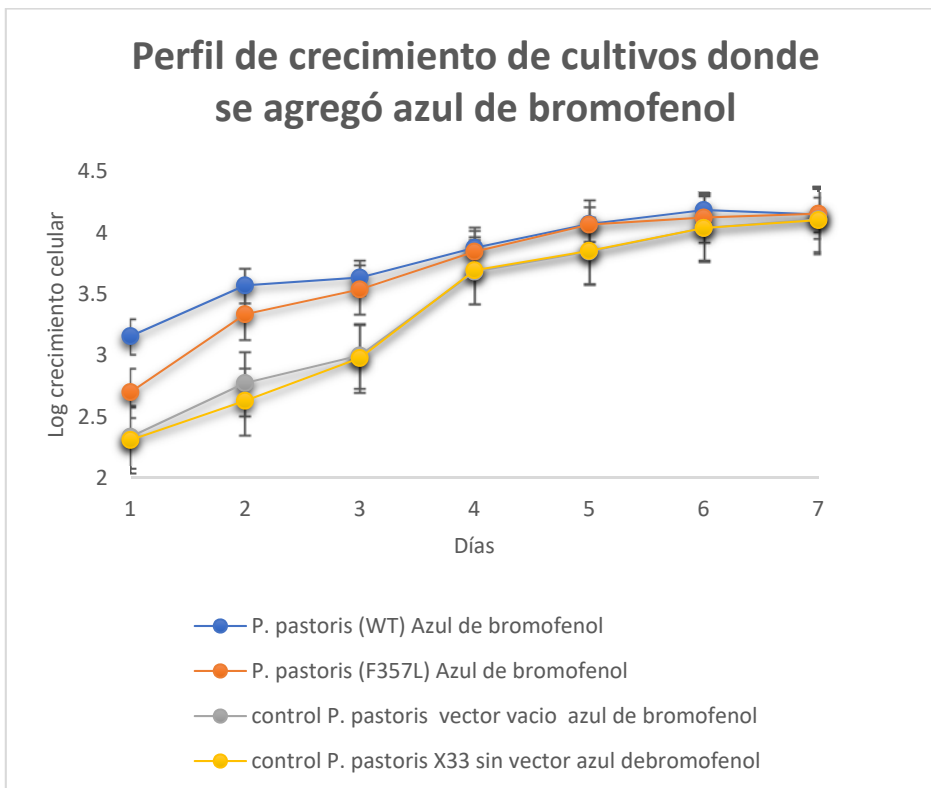


Figura 10 Perfil de crecimiento en cultivos con azul de bromofenol

En la figura 10 se representa el perfil de crecimiento de las cepas donde se agregó azul de bromofenol al día 7 donde se muestra que comienza la fase estacionaria,

en la gráfica se observa la cepa que expresa la lacasa silvestre, la cual presentó un tiempo de duplicación de 4.17 horas y una velocidad de 0.16 h⁻¹.

En la cepa con la lacasa mutante mostró un tiempo de duplicación de 2.77 horas y una velocidad de 0.25 h⁻¹. Los controles presentaron un tiempo de duplicación de 1.76 horas (vector vacío), y 1.6 horas (sin vector) y una velocidad de 0.39 h⁻¹ (vector vacío), 0.41 h⁻¹ (sin vector).

Tabla 22 crecimiento de *P. pastoris* (WT) donde se agregó el colorante rojo congo al día 7

<i>P. pastoris</i> WT (Rojo congo)				
DÍA	ABS (600NM)	FD	ABS/REAL	Log
0	0.47033333	5	2.351667	0.855124298
1	0.92966667	20	18.59333	2.922803092
2	0.56766667	50	28.38333	3.345802117
3	0.69133333	50	34.56667	3.542889828
4	0.86466667	50	43.23333	3.766611802
5	0.509	100	50.9	3.929862924
6	0.56	100	56	4.025351691
7	0.60233333	100	60.23333	4.098225908

Tabla 23 crecimiento de *P. pastoris* (F357I) donde se agregó el colorante rojo congo al día 7

<i>P. pastoris</i> F357L (Rojo congo)				
DÍA	ABS (600NM)	FD	ABS/REAL	Log
0	0.45966667	5	2.298333	0.832184221
1	0.82166667	20	16.43333	2.79931179
2	0.59533333	50	29.76667	3.3933892
3	0.70533333	50	35.26667	3.562938232
4	0.88233333	50	44.11667	3.786837641
5	0.48366667	100	48.36667	3.878810872
6	0.56366667	100	56.36667	4.031877968
7	0.60433333	100	60.43333	4.101540829

Tabla 24 crecimiento del control *P. pastoris* con el vector vacío (rojo congo)

control <i>P. pastoris</i> vector vacío (rojo congo)				
DÍA	ABS /60nm	FD	ABS/REAL	Log
0	0.335	10	3.35	1.208960346
1	1.073	10	10.73	2.373043557
2	0.748	20	14.96	2.705379973
3	1.031	20	20.62	3.026261479
4	0.69	50	34.5	3.540959324
5	0.775	50	38.75	3.657130756
6	0.528	100	52.8	3.966511191
7	0.571	100	57.1	4.044804117

Tabla 25 crecimiento del control *P. pastoris* sin vector (rojo congo)

control <i>P. pastoris</i> X33 sin vector (rojo congo)				
DÍA	ABS (600NM)	FD	ABS/REAL	Log
0	0.4364	5	2.182	0.780241887
1	0.8943	20	17.886	2.884018284
2	0.5298	50	26.49	3.276767303
3	0.68224	50	34.112	3.529649229
4	0.86138	50	43.069	3.762803481
5	0.5043	100	50.43	3.920586236
6	0.5682	100	56.82	4.039888376
7	0.61007	100	61.007	4.110988612

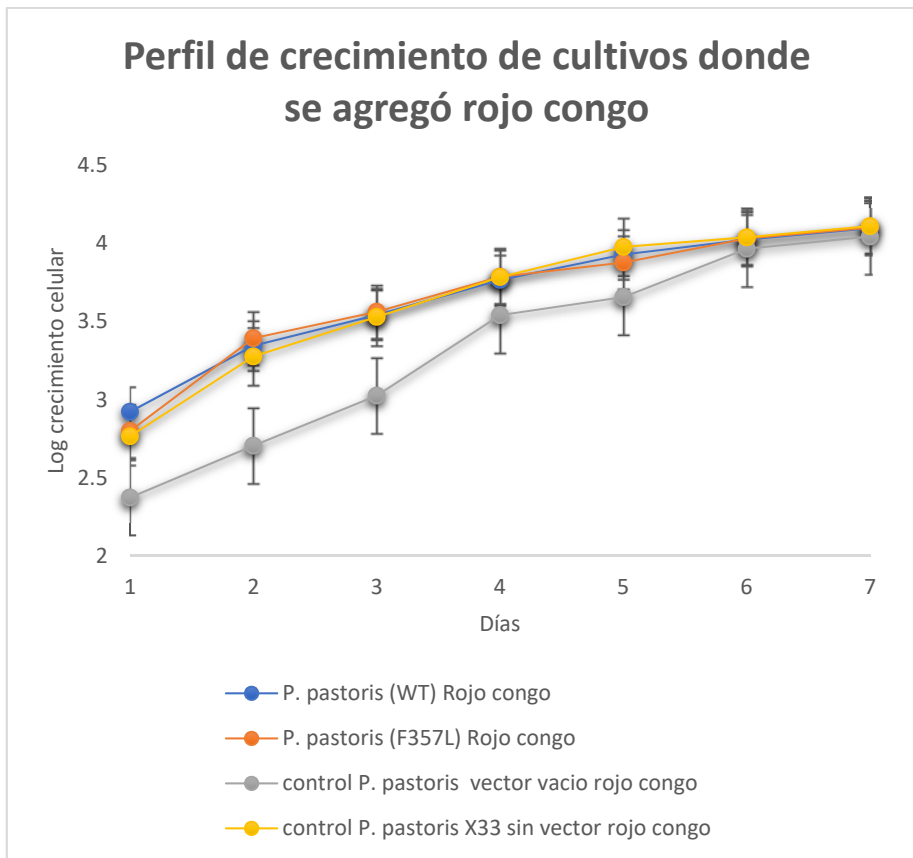


Figura 11 Perfil de crecimiento de cultivos donde se agregó rojo congo

En la figura 11 se representa los perfiles de crecimiento de las cepas donde se agregó el colorante rojo congo al día 7, la cepa con la lacasa silvestre y mutante presentaron una velocidad de crecimiento de 0.17 h^{-1} (cepa silvestre) y $.15 \text{ h}^{-1}$ (mutante), en el caso del tiempo de duplicación fue de 3.98 horas (silvestre) y 4.35 (mutante).

Los controles mostraron una velocidad de 0.32 h^{-1} (vector vació) y 0.23 h^{-1} (sin vector) y un tiempo de duplicación de 2.14 horas (vector vació) y 2.93 horas (sin vector).

6.3 Actividad de lacasa

La actividad de lacasa fue medida a partir del cuarto día para el caso de WT y a partir del día quinto en la mutante debido a que no presentaba alta actividad y los valores eran muy bajos.

Este ensayo se realizó utilizando siringaldazina un sustrato específico de la enzima, en un buffer de reacción de pH 4 (buffer de succinato).

En los resultados se observó una mayor actividad volumétrica en la cepa WT la cual alcanzó 0.16 UE/ml en cultivos con azul de comassie, y 0.17 UE/ml en cultivos con azul de bromofenol. Para el caso de la mutante ésta obtuvo 0.097 UE/ml en cultivos con azul de comassie y 0.12 UE /ml en cultivos con azul de bromofenol.

En los resultados de la actividad volumétrica de los cultivos con el colorante rojo congo se mostró 0.14 UE /ml en la lacasa silvestre y 0.11 UE /ml en la lacasa mutante F357L.

Se observan datos similares a los ya reportados por Avelar y colaboradores en los cuales utilizaron las mismas condiciones de cultivo (0.5 mM CuSO₄ y 1% metanol). La actividad volumétrica de la cepa mutante fue de aproximadamente 190 UE/L en el día 10, mientras que en comparación con este trabajo que es de 123.3 UE/L, se observa menor actividad, esto podría ser generado por la adición del colorante, ya que el hongo estaría presentando un estado de estrés y la producción de lacasa disminuiría.

En las siguientes tablas (26-31) se muestran los datos, la absorbancia real representa el dato ya multiplicado por el factor de dilución. Las unidades enzimáticas fueron multiplicadas por la cantidad del cultivo total (30ml).

Tabla 26 actividad de lacasa en cultivos de *P. pastoris* WT (azul de coomassie)

Actividad de lacasa azul de coomassie WT					
DÍA	ABS(600NM)	FD	ABS/REAL	UE/ml	UE/30ml
4	0.1717	10	1.717	0.026828	0.804844
5	0.3286	10	3.286	0.051344	1.540313
6	0.5288	10	5.288	0.082625	2.47875
7	0.7513	10	7.513	0.117391	3.521719
8	0.8535	10	8.535	0.133359	4.000781
9	0.9234	10	9.234	0.144281	4.328438
10	1.037	10	10.37	0.162031	4.860938

Tabla 27 actividad de lacasa en cultivos de *P. pastoris* F357L (azul de coomassie)

Actividad de lacasa, azul de coomassie F357L					
DÍA	ABS(600NM)	FD	ABS/REAL	UE/ml	UE/30ml
4					
5	0.1509	10	1.509	0.023578	0.707344
6	0.2389	10	2.389	0.037328	1.119844
7	0.3955	10	3.955	0.061797	1.853906
8	0.4773	10	4.773	0.074578	2.237344
9	0.4873	10	4.873	0.076141	2.284219
10	0.6261	10	6.261	0.097828	2.934844

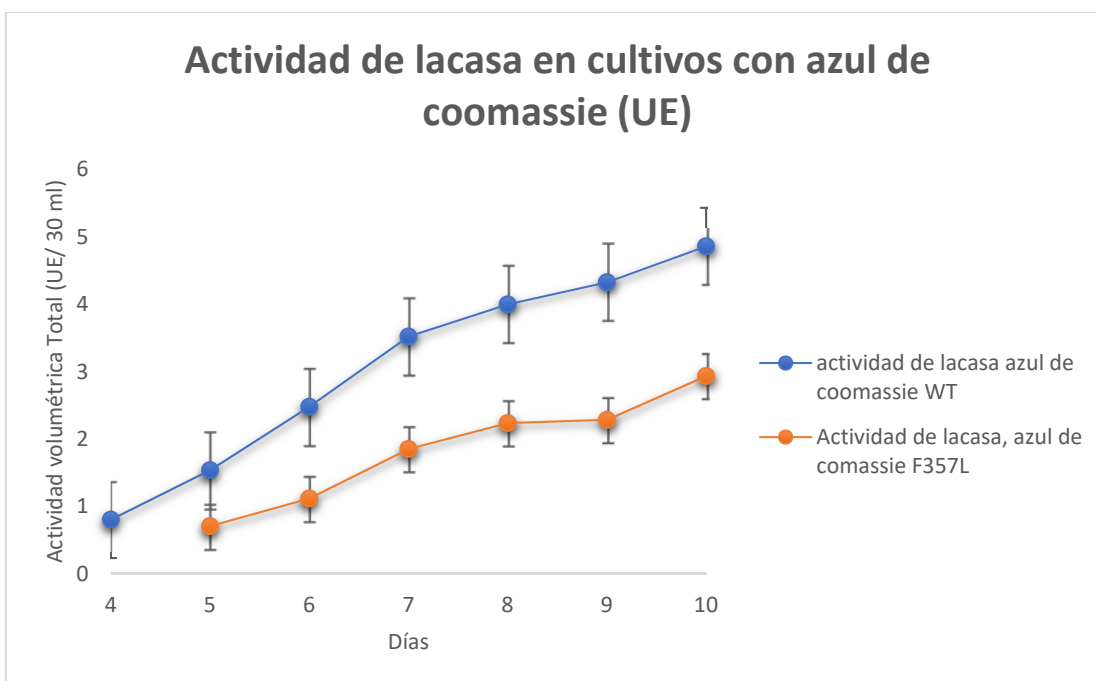


Figura 12. Actividad de lacasa en cultivos con azul de coomassie

En la figura 12 representa la actividad volumétrica de ambas lacasa (silvestre y mutante) en cultivos de *P. pastoris* con el colorante azul de coomassie. Se muestra que la lacasa silvestre tiene casi el doble de actividad (4.8 UE) a diferencia de la mutante (2.9 UE).

Tabla 28 actividad de lacasa en cultivos de *P. pastoris* WT (azul de bromofenol)

Actividad de lacasa azul de bromofenol Wt					
DÍA	ABS(600NM)	FD	ABS/REAL	UE/ml	UE/30ml
4	0.1919	10	1.919	0.029984	0.899531
5	0.3673	10	3.673	0.057391	1.721719
6	0.5632	10	5.632	0.088	2.64
7	0.7698	10	7.698	0.120281	3.608438
8	0.9881	10	9.881	0.154391	4.631719
9	0.8566	10	8.566	0.133844	4.015313
10	1.0911	10	10.911	0.170484	5.114531

Tabla 29 actividad de lacasa en cultivos de *P. pastoris* F357L (azul de bromofenol)

Actividad de lacasa azul de bromofenol F357L					
DÍA	ABS(600NM)	FD	ABS/REAL	UE/ml	UE/30ml
4					
5	0.1529	10	1.529	0.023891	0.716719
6	0.256	10	2.56	0.04	1.2
7	0.3814	10	3.814	0.059594	1.787813
8	0.5178	10	5.178	0.080906	2.427188
9	0.4777	10	4.777	0.074641	2.239219
10	0.7897	10	7.897	0.123391	3.701719

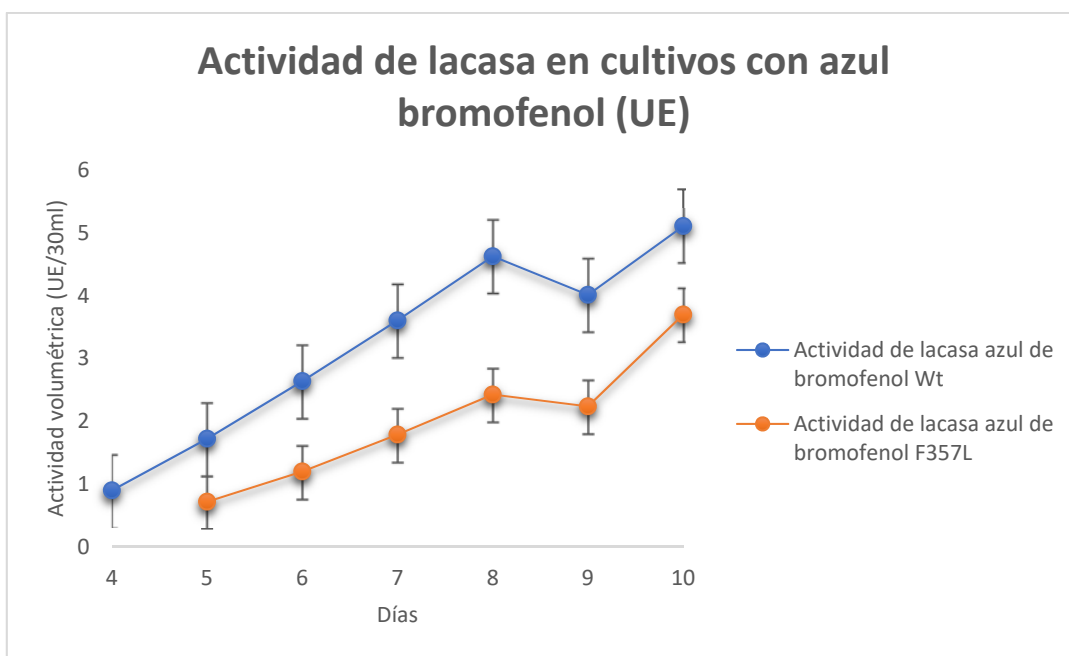


Figura 13 actividad volumétrica en cultivos de *P. pastoris* con colorante azul bromofenol

En la figura 13 se observa la actividad volumétrica de la lacasa mutante y silvestre en cultivos de *P. pastoris* con colorante azul de bromofenol, también se observa que hay mayor actividad de la lacasa silvestre con (5.1 UE) a diferencia de la mutante (3.7 UE).

Tabla 30 actividad de lacasa en cultivos de *P. pastoris* WT (rojo congo)

Actividad de lacasa Rojo congo (WT)					
DÍA	ABS(600NM)	FD	ABS/REAL	UE/ml	UE/30ml
4	0.1673	10	1.673	0.026141	0.784219
5	0.3453	10	3.453	0.053953	1.618594
6	0.5153	10	5.153	0.080516	2.415469
7	0.626	10	6.26	0.097813	2.934375
8	0.735	10	7.35	0.114844	3.445313
9	0.8486	10	8.486	0.132594	3.977813
10	0.955	10	9.55	0.149219	4.476563

Tabla 31 actividad de lacasa en cultivos de *P. pastoris* F357L (rojo congo)

Actividad de lacasa Rojo congo F357L					
DÍA	ABS(600NM)	FD	ABS/REAL	UE/ml	UE/30ml
4					
5	0.135	10	1.35	0.021094	0.632813
6	0.2976	10	2.976	0.0465	1.395
7	0.4633	10	4.633	0.072391	2.171719
8	0.571	10	5.71	0.089219	2.676563
9	0.668	10	6.68	0.104375	3.13125
10	0.762	10	7.62	0.119063	3.571875

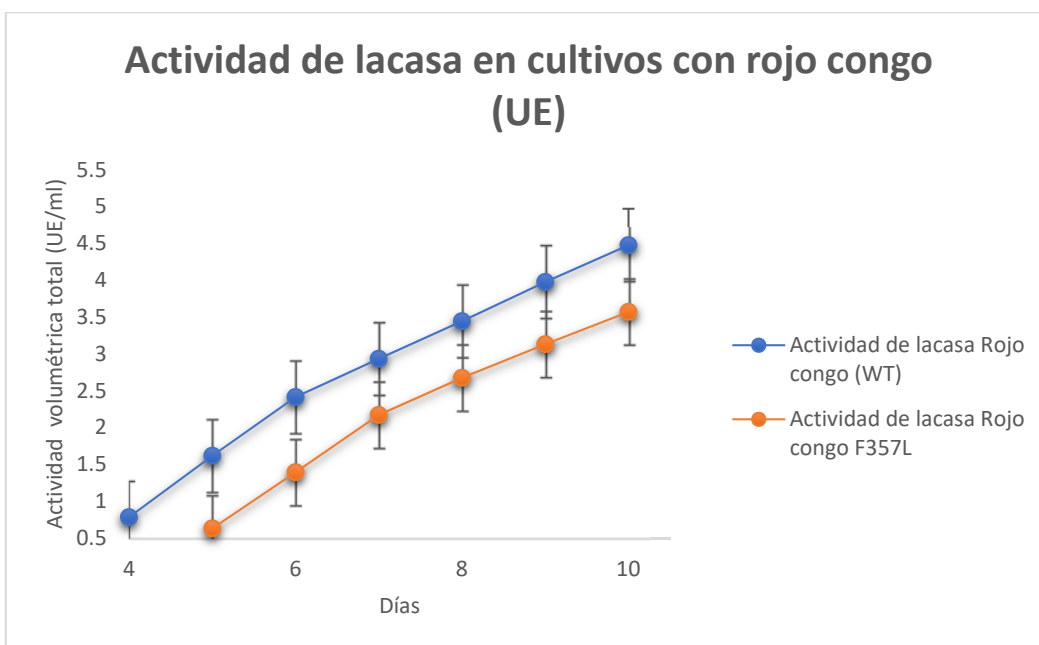


Figura 14 actividad volumétrica de lacasa en cultivos de *P. pastoris* con rojo congo

En la gráfica 14 se muestra la actividad volumétrica de las lacasas (silvestre y mutante) de *Coriolopsis gallica* con el colorante rojo congo, se observa un comportamiento similar a los colorantes ya mencionados ya que la lacasa mutante presentó menor actividad (3.5 UE) a diferencia de la silvestre (4.4 UE).

6.4 Degradación de colorantes

En los resultados de la degradación de los colorantes por unidad de lacasa, se logró una remoción de azul de coomassie por la cepa mutante del 19.44%, mientras que

en la WT se observa una remoción del 2.47%. Comparando ambas se muestra que la mutante es más eficaz para la degradación de este tinte, que la cepa silvestre.

A diferencia de los resultados obtenidos por Balcázar y colaboradores en 2016, donde utilizaron una lacasa de *Trametes (Pycnoporus) sanguineus* expresada en *Trichoderma atroviride*, la cual reportó 3.97% de decoloración, una remoción menor a la obtenida por la lacasa mutante F357L de *Corioloopsis gallica*. Por lo tanto, se observa que cultivos de *Pichia pastoris* que expresan la lacasa de *Corioloopsis gallica* tienen un potencial mayor de degradación en el colorante azul de comassie a diferencia de la lacasa de *T. sanguineus* en solución.

En el caso de la degradación del colorante azul de bromofenol, los resultados fueron similares para ambas lacasas presentando un porcentaje de degradación de 6.8 en la lacasa silvestre y 7.02% en la mutante.

Se observan porcentajes de degradación más bajos por la mutante a diferencia del colorante anterior, esto podría indicar que al degradar este compuesto fenólico, la mutante de *Corioloopsis gallica* tendría una desestabilización por la formación de radicales libres como fue reportado anteriormente por Avelar en el 2018.

Comparado con lo obtenido por Balcázar y colaboradores en el 2016, obtuvieron mejores resultados en cuanto a la degradación de este colorante con la lacasa soluble expresada heterológicamente de *Trametes sanguineus*, el porcentaje de decoloración fue de 67.73%, siendo más efectiva ésta lacasa.

Se registró mayores porcentajes de degradación por unidad enzimática del colorante rojo congo a diferencia de los demás tintes a excepción de la mutante en la degradación de azul de coomassie. Éstos fueron de 13.17% para la lacasa silvestre y 14.85% para la lacasa mutante no hubo gran diferencia en la decoloración de este colorante por ambas lacasas. A continuación se muestran los resultados en la tabla siguiente (32).

En comparación con la lacasa de *Trametes sanguineus*, esta tuvo un porcentaje de degradación por unidad de lacasa del colorante rojo congo de 10.6%, datos

similares a los obtenidos en este trabajo donde la mutante presento 13.17% y la silvestre 14.85%.

Tabla 32 Porcentajes de degradación por unidad enzimática en los tres colorantes mencionados para ambas lacasas (mutante y silvestre)

levadura	UE /ml	UE Total/30ml	% de degradación total	% degradación X UE
P-ACWT	0.111	3.33	8.71%	2.47%
P-ACF357L	0.06	1.8	36.04%	19.44%
P-ABWT	0.12	3.6	24.73%	6.80%
P-ABF357L	0.059	1.77	12.50%	7.07%
P-RCWT	0.09	2.7	38.62%	13.17%
P-RCF357L	0.072	2.16	28.57%	14.28%

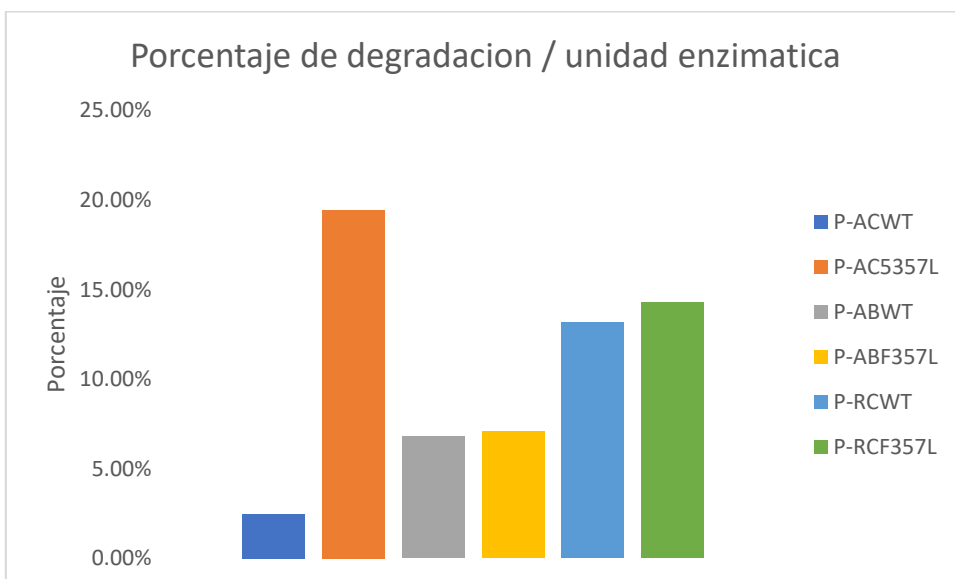


Figura 15 porcentajes de degradación de los 3 colorantes por unidad enzimática

P-ACWT: cultivos de *Pichia* (lacasa silvestre) con azul de coomassie, P-ACF357L: cultivos de *Pichia* (lacasa mutante) con azul de coomassie, P-ABWT: cultivos de *Pichia* (lacasa silvestre) con azul de bromofenol, P-ABF357L: cultivos de *Pichia* (lacasa mutante) con azul de bromofenol, P-RCWT: cultivos de *Pichia* (lacasa silvestre) con rojo congo, P-RCF357L: cultivos de *Pichia* (lacasa mutante) rojo congo

La figura 15 muestra los porcentajes de degradación por unidad de lacasa de los tres colorantes por la lacasa mutante y silvestre. Se observa que los porcentajes más altos son representados por la mutante de esta forma se concluye que el porcentaje más alto de degradación fue del colorante azul de coomassie (19.4%) y

el más bajo fue la decoloración del tinte azul de comassie por la lacasa silvestre (2.5%).

6.5 Remoción total de los colorantes (adsorción)

En el día cuatro se tomaron los datos de la absorbancia del colorante sin la inducción de lacasa que fue interrumpida el día anterior. Estos datos mostraron una disminución del colorante a un porcentaje de 72% por la cepa WT y un 75.58% por la mutante para el colorante azul de comassie (tabla 33 y 34).

En el caso del colorante azul de bromofenol se observó la disminución del tinte a 83.9% por la WT y 75% por la cepa mutante (tabla 37 y 38).

En la remoción del tinte rojo congo hubo un porcentaje de remoción total de 38.62% por la lacasa silvestre, y 28.37% por la lacasa mutante (tabla 43 y 44). Previamente se mencionó que en el caso de este colorante se mostraba una adsorción de la levadura por lo que dificultaba la medición de la absorbancia por lo que se recurrió a utilizar el sobrenadante, la absorbancia final fue tomada el día tres a diferencia de los demás tintes, en este caso aún se inducía la lacasa.

Este decrecimiento del colorante azul de coomassie y bromofenol al cuarto día fue debido al proceso de biosorción de la levadura; como se mencionaban algunos organismos tienen la capacidad de realizar este proceso, donde la decoloración se alcanza por la saturación y posterior biosorción del colorante sobre las células, ocurriendo esto con o sin biodegradación. Se ha reportado en *Proteus mirabilis*, que fue aislada de lodos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales; el porcentaje de decoloración del colorante rojo 23 fue entre 13 y 17 %, debido al proceso de biosorción de estas células bacterianas. Mientras que en este proyecto el porcentaje de adsorción fue para la mutante en el colorante azul de coomassie 39.5% y para el colorante azul de bromofenol el 62.5%, en el caso de la silvestre la adsorción del colorante azul de coomassie fue de 63.3% y para el porcentaje de adsorción en el colorante azul de bromofenol fue de 59%.

En los controles se observó una disminución de la absorbancia lo que demuestra que la levadura podría estar adsorbiendo los colorantes, la mayor adsorción se registró en los controles del colorante rojo congo donde de muestra un porcentaje promedio de remoción del 68%, el cual hace a esta levadura un organismo potencial para la remoción de este colorante.

En el caso de los controles del colorante azul de coomassie se mostró una adsorción promedio de 44 %. En el colorante azul de bromofenol se observó una adsorción menor a los demás colorantes de 25%.

Se ha observado la adsorción de colorantes industriales en otras levaduras como es el caso de la investigación realizada por Barreda en 2015 donde demuestra que una levadura aislada de suelo contaminado con aguas residuales de la industria textil fue capaz de biosorber el colorante azoico naranja ácido 10 a pH 2, alcanzado capacidades de biosorción en la saturación de 87,4 mg.

Tabla 33 Remoción de azul de coomassie (WT)

Remoción de azul de coomassie en cultivos con la WT		
fecha	día	abs (553nm)
09-oct-18	0	0.7
10-oct-18	1	0.639
11-oct-18	2	0.634
12-oct-18	3	0.6397
13-oct-18	4	0.1965

Tabla 34 Remoción de azul de coomassie (F357L)

Remoción de azul de coomassie en cultivos con la mutante F357L		
fecha	día	abs (553nm)
09-oct-18	0	0.86
10-oct-18	1	0.55
11-oct-18	2	0.53
12-oct-18	3	0.54
13-oct-18	4	0.21

Tabla 35 Remoción del colorante azul de coomassie (control vector vacío)

Fecha	Día	abs(553)
16-dic-18	0	0.685
17-dic-18	1	0.423
18-dic-18	2	0.419
19-dic-18	3	0.42

Tabla 36 Remoción del colorante azul de coomassie (control sin vector)

Fecha	Día	abs (591)
16-dic-18	0	0.709
17-dic-18	1	0.551
18-dic-18	2	0.497
19-dic-18	3	0.499

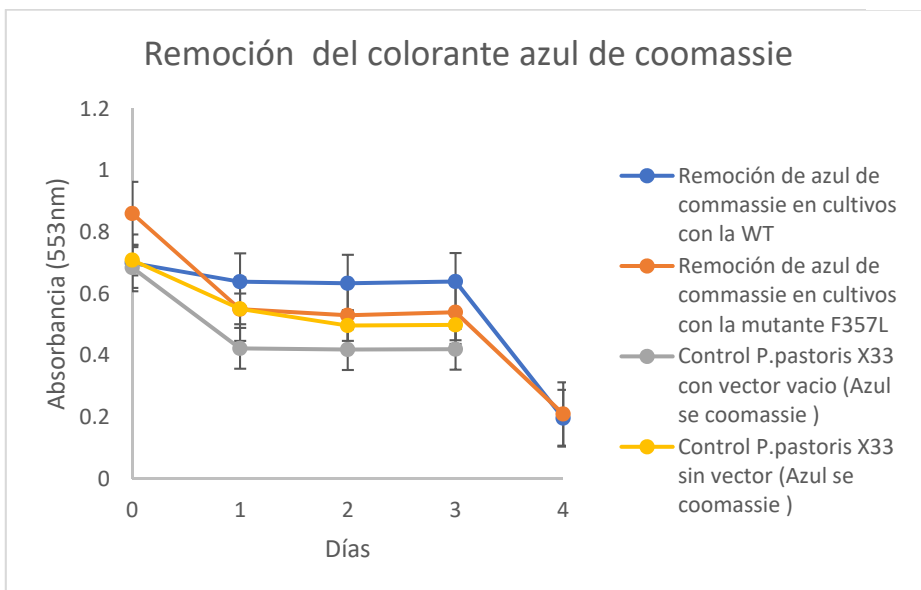


Figura 16 Remoción del colorante azul de coomassie

En la figura 16 se representa la remoción del colorante azul de coomassie por ambas cepas, en el día uno alcanzó la máxima remoción en ambos casos, para el día dos y tres la absorbancia del colorante se mantuvo igual hasta el día 4 en el cual se dejó de inducir la actividad de lacasa, por lo tanto, esto se le atribuye a la adsorción del colorante por la lavadura, esto se comprueba por la disminución de la absorbancia en ambos controles.

Tabla 37 Remoción del tinte azul de bromofenol (WT)

Remoción de azul de bromofenol en cultivos con la WT		
fecha	día	abs (591nm)
09-oct-18	0	1.31
10-oct-18	1	0.984
11-oct-18	2	0.989
12-oct-18	3	0.986
13-oct-18	4	0.21

Tabla 38 Remoción del tinte azul de bromofenol (F357L)

fecha	día	abs (591nm)
09-oct-18	0	1.2
10-oct-18	1	1.035
11-oct-18	2	1.032
12-oct-18	3	1.05
13-oct-18	4	0.3

Tabla 39 Remoción de azul de bromofenol (control vector vacío)

Fecha	Día	abs (591)
16-dic-18	0	1.383
17-dic-18	1	1.07
18-dic-18	2	1.093
19-dic-18	3	1.087

Tabla 40 Remoción de azul de bromofenol (control sin vector)

Fecha	Día	abs (591)
16-dic-18	0	1.376
17-dic-18	1	0.998
18-dic-18	2	1.002
19-dic-18	3	0.996

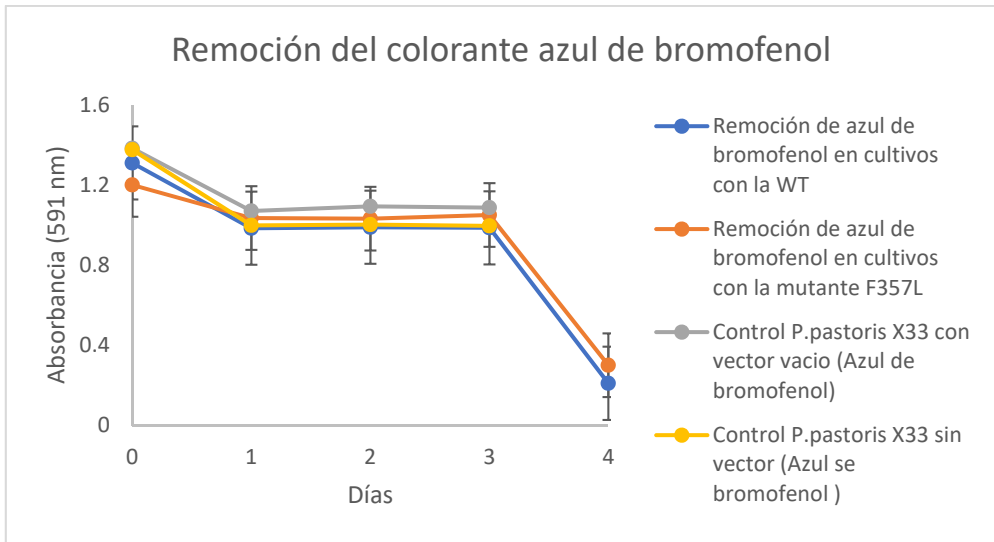


Figura 17 Remoción del colorante azul de bromofenol

En la gráfica anterior (figura 17) se muestran datos similares a la remoción del colorante anterior, el día uno fue donde se muestra el mayor porcentaje de degradación por ambas lacasas, en los días 2 y 3 se mantiene, en el día 4 al dejar de inducir la lacasa se observa un declive en la absorbancia, esto se debe a la remoción del colorante por el proceso de biosorción por la levadura, los controles también muestran una disminución en la absorbancia, lo cual confirma el proceso de biosorción.

Tabla 41 Remoción del colorante rojo congo (WT)

fecha	día	abs (507)
16-dic-18	0	2.689
17-dic-18	1	1.6216
18-dic-18	2	1.666
19-dic-18	3	1.6458

Tabla 42 Remoción del colorante rojo congo (F357L)

fecha	día	abs (507)
16-dic-18	0	2.558
17-dic-18	1	1.846
18-dic-18	2	1.818
19-dic-18	3	1.827

Tabla 43 Remoción del colorante rojo congo (control vector vacío)

Fecha	Día	abs (507)
16-dic-18	0	2.735
17-dic-18	1	0.9846
18-dic-18	2	0.985
19-dic-18	3	0.9848

Tabla 44 Remoción del colorante rojo congo (control sin vector)

Fecha	Día	abs (507)
16-dic-18	0	2.79
17-dic-18	1	0.7641
18-dic-18	2	0.7637
19-dic-18	3	0.7645

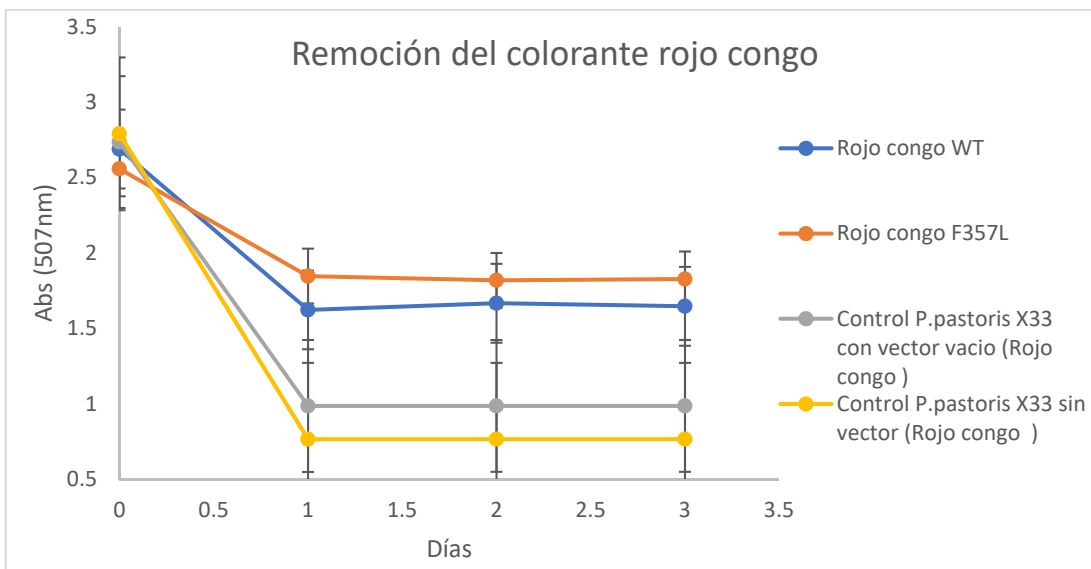


Figura 18 Remoción del colorante rojo congo

En esta figura 18 se muestra la disminución en la absorbancia por la decoloración del colorante rojo congo por ambas lacasas (mutante y silvestre). En el caso de los controles se observó una disminución menor debido a la adsorción del colorante por la levadura. El colorante rojo congo presentó porcentajes de remoción más altos a diferencia de los demás colorantes.

Porcentajes de remoción total del colorante

Tabla 45 % de remoción total de los colorantes

levadura	% remoción total
P-ACWT	72%
P-AC5357L	75.58%
P-ABWT	83.96%
P-ABF357L	75%
P-RCWT	38.62%
P-RCF357L	28.57%
C-VVAC	38.68%
C-SVAC	49.97%
C-VVAB	22.63%
C-SVAB	27.61%
C-VVRC	64%
C-SVRC	72%

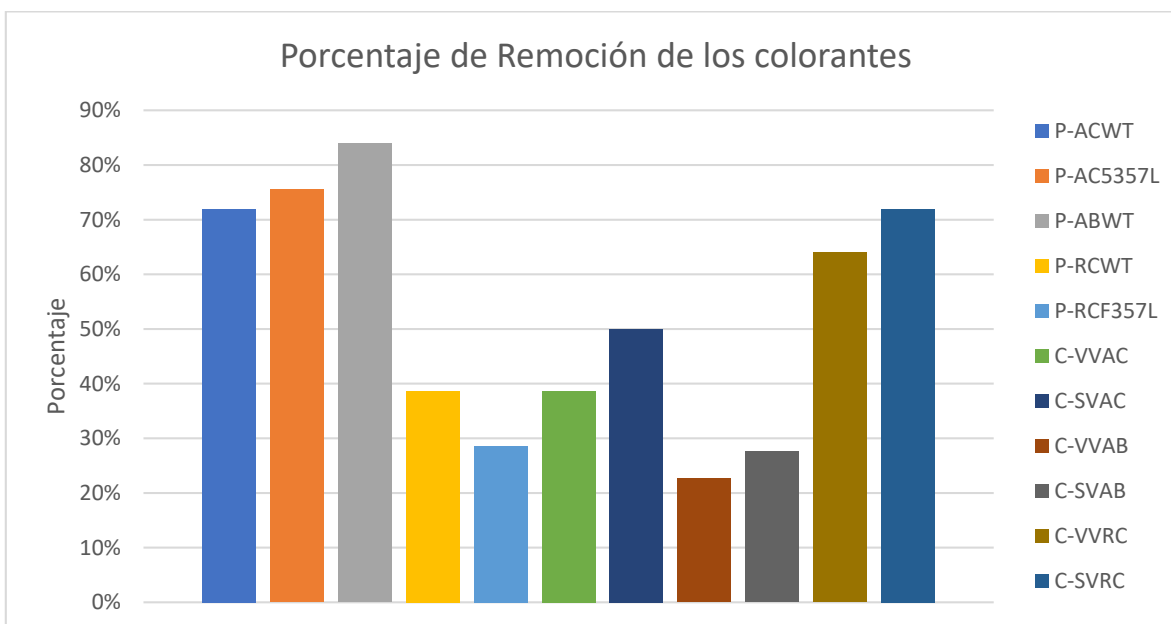


Figura 19 Porcentaje de remoción total. P-ACWT: cultivos de *Pichia* (lacasa silvestre) con azul de coomassie, P-ACF357L: cultivos de *Pichia* (lacasa mutante) con azul de coomassie, P-ABWT: cultivos de *Pichia* (lacasa silvestre) con azul de bromofenol, P-ABF357L: cultivos de *Pichia* (lacasa mutante) con azul de bromofenol, P-RCWT: cultivos de *Pichia* (lacasa silvestre) con rojo congo, P-RCF357L: cultivos de *Pichia* (lacasa mutante) rojo congo, C-VVAC: control vector vacío con azul de coomassie, C-SVAC: control sin vector con azul de coomassie, C-VVAB: control vector vacío con azul de bromofenol, C-SVAB: control sin vector con azul de bromofenol, C-VVRC: control vector vacío con rojo congo, C-SVRC: control sin vector con rojo congo,

En la figura anterior (19) muestra los porcentajes de remoción totales de los tres colorantes por las cepas mutante y silvestre, así como de los controles (vector vacío y sin vector). Se observa que el colorante azul de bromofenol presentó el porcentaje de remoción más alto de 83.9%, mientras que el porcentaje de remoción más bajo fue de 22.6% en la cepa control (vector vacío) con el colorante azul de bromofenol.

Capítulo VII

Conclusiones

Se obtuvieron cantidades más bajas de actividad volumétrica de lacasa a diferencia de los obtenidos en 2017 utilizando las mismas condiciones, esto se le podría atribuir a la adición de colorante provocando un estrés en la levadura y no permitiendo que tenga la misma actividad.

En la decoloración del colorante azul de coomassie por unidad de la lacasa se obtuvieron los siguientes porcentajes de degradación: 2.47% para el caso de la lacasa silvestre y 19.4% para la lacasa mutante.

En el caso de la degradación del colorante azul de bromofenol, se observó un porcentaje de degradación similar en ambas lacasas, la lacasa silvestre obtuvo un porcentaje de 6.8% y la mutante obtuvo un porcentaje de 7%.

Para el colorante rojo congo se obtuvieron porcentajes mayores a diferencia de los demás colorantes, la lacasa mutante silvestre registró una degradación de 13.2% y la lacasa mutante obtuvo una decoloración de 14.3%.

A diferencia de la lacasa de *Trametes sanguineus*, la mutante demostró tener una mejor eficiencia en la degradación del colorante azul de coomassie mientras que en la degradación de azul de bromofenol es más eficaz la lacasa de *T. sanguineus*. En la decoloración del colorante rojo congo ambas lacasas (*C. gallica* y *T. sanguineus*) presentaron porcentajes de degradación similares.

La cepa con la mutante F355L presentó una mayor remoción del colorante azul de comassie con un porcentaje de 75.58% a diferencia de la silvestre que presento un porcentaje de 72%. En la Remoción del colorante azul de bromofenol, la cepa con la lacasa silvestre presentó mayor porcentaje de degradación del 83.9%, mientras que la cepa mutante F357L presentó un porcentaje de remoción de 75%. En el colorante rojo congo se obtuvo un porcentaje de degradación de 38.6% con la lacasa silvestre y 28.6% con la lacasa mutante.

Además de la degradación por parte de la lacasa se observó la adsorción del colorante por la levadura. Esto se confirmó con los controles donde hubo una disminución de la absorbancia en los días siguientes, en el colorante azul de comassie se observó una disminución de aproximadamente de 44.3%, en el colorante azul de bromofenol fue de 25%. Y en el caso del rojo congo éste colorante presento la mayor adsorción de la levadura de 68.3%

Perspectivas

A partir de los estudios realizados en la tesis de maestría, las perspectivas de los trabajos futuros podrían orientarse en la degradación de otros colorantes u otros compuestos químicos (hidrocarburos aromáticos policíclicos, bisfenol A, pesticidas, compuestos de petróleo etc.) que generan problemáticas ambientales como su difícil degradación y su toxicidad.

También sería importante probar las demás mutantes de la lacasa de *Corioloopsis gallica* y comparar con la lacasa silvestre y la lacasa mutante ya probada en este proyecto.

Anexos

Experimentos de la degradación de los colorantes azul bromofenol y azul de coomassie

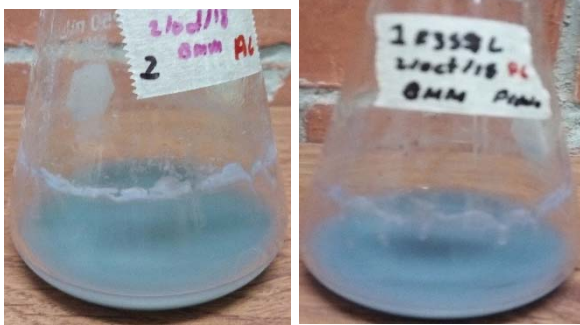


Figura 20 cultivos con azul de bromofenol de ambas cepas (WT a y mutante b). Día 0 donde se le agregó el colorante.

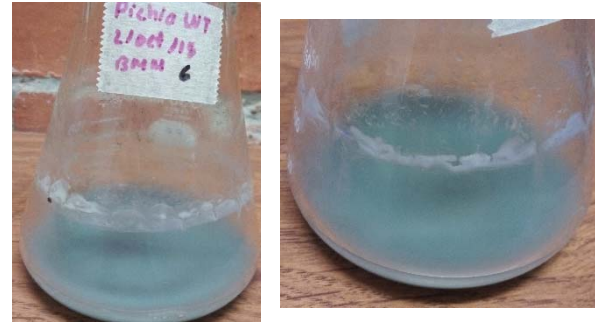


Figura 21 cultivos con azul de coomassie de ambas cepas (WT a y mutante b). Día 0 donde se le agregó el colorante.



Figura 22 cultivos con azul de coomassie el segundo día de agregar el colorante (WT a y mutante b).



Figura 23 cultivos con azul de bromofenol el segundo día de agregar el colorante (WT a y mutante b).

Experimento de la degradación del colorante rojo congo



Figura 24 cultivos de *P. pastoris* con la lacasa mutante (izquierda) y silvestre (derecha). Día donde se añadió el colorante rojo congo



Figura 25 cultivos de *P. pastoris* con la lacasa mutante (izquierda) y silvestre (derecha). Día 3 de agregar el colorante

Ensayo de degradación del colorante rojo congo



Figura 26 Ensayo de decoloración del colorante rojo congo, usando el sobrenadante con la lacasa silvestre (izquierda) y mutante (derecha). Día 0 cuando se agregó el colorante.

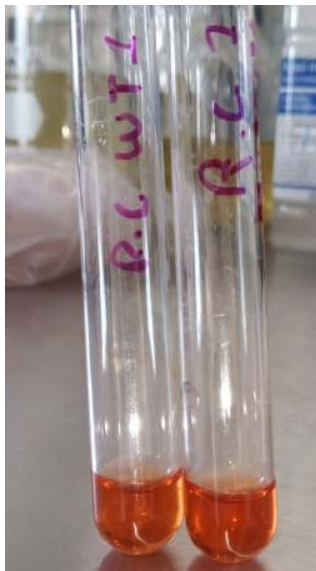


Figura 27 Ensayo de la degradación del colorante rojo congo por la lacasa silvestre (izquierda) y mutante (derecha). Día 3.

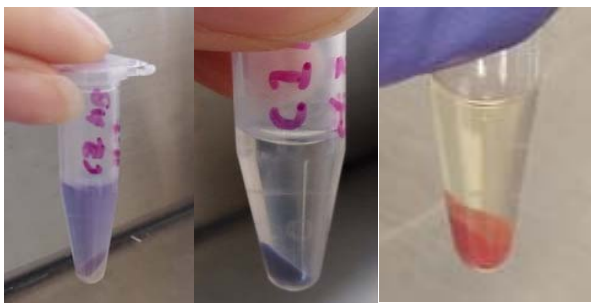


Figura 28 Remoción de los colorantes azul bromofenol (izquierda), azul de coomassie (en medio) y rojo congo (derecha) en control-*P. pastoris* con el vector vacío.

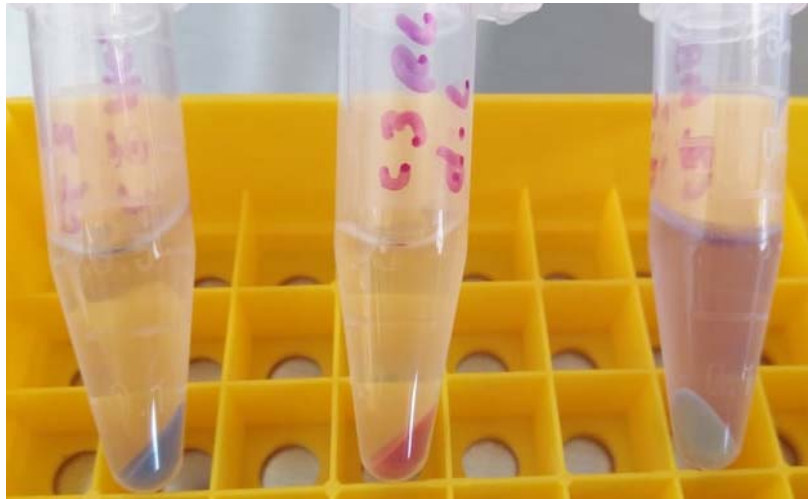


Figura 29 Remoción de los colorantes azul de coomassie (izquierda), rojo congo (en medio), y azul de bromofenol (derecha). En el control de *P. pastoris* sin el vector.

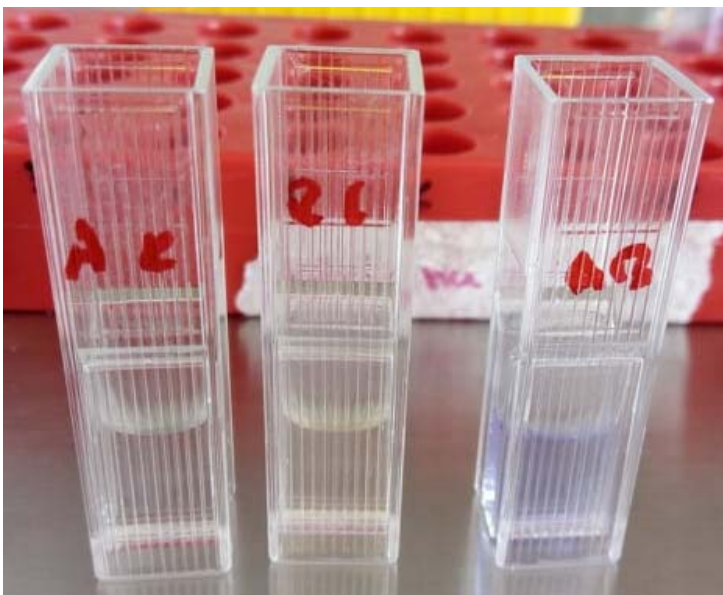


Ilustración 30 Remoción total de los colorantes azul de coomassie (izquierda), rojo congo (en medio), y azul de bromofenol (derecha). Por la cepa *P. pastoris* con la mutante de *Coriopsis gallica*.

Bibliografía

An SY, Min SK, Cha IH, Choi YK, Cho YS, Kim CH, Lee YC (2002) *Decolorization of triphenylamine and azo dyes by Citrobacter sp.* Biotechnol. Lett. 24: 1037-1040.

Aramayo, R. y Timberlake, W. E. (1990). *Sequence and molecular structure of the Aspergillus nidulans yA (laccase I) gene.* Nucleic Acids Res., 18:3415

Avelar M., Olvera C., Aceves D., Folch J. Ayala M. (2017). *Recombinant expression of a laccase from Coriolopsis gallica in Pichia pastoris using a modified a-factor preproleader.* Rev. Protein Expression and Purification pp. 14-19.

Balcázar E., Méndez H., Batista R., Esquivel E., Ayala M., Vinoth V., Kumar O., Cabana H., 5, Herrera A., Folch J. (2010). *Xenobiotic Compounds Degradation by Heterologous Expression of a Trametes sanguineus Laccase in Trichoderma atroviride.* PLoS ONE 11(2): e0147997. doi: 10.1371/journal.pone.0147997

Baldrian P., (2006). *Fungal laccases: occurrence and properties.* FEMS Microbiology pp. 215-242.

Calvo A.M., J.L. Copa-Patiño, O. Alonso, A.E. González, 1998. *Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete Coriolopsis gallica, an efficient decolorizer of alkaline effluents.* Archives of Microbiology 171 pp.31-36.

Canteli, M., Takashina T. Scheer A., Igarashi L. (2015) *photo-fenton and adsorption combined process for degradation and removing of coomassie brilliant blue dye from aqueous solution* COBEQ pp1-5.

Cardona M., Osorio J., Quintero J. (2009) *Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos.* Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia N.º 48. pp. 27-37.

Chang JS, Lin YC (2000) *Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a Pseudomonas luteola strain.* Biotechnol. Prog. 16: 979-985.

Chang JS, Lin YC (2001) *Decolorization kinetics of a recombinant Escherichia coli strain harboring azo-dye-decolorizing determinants from Rhodococcus sp.* Biotechnol. Lett. 23: 631-636.

Chen KC, Huang WT, Wu Y, Hounq JY (1999) *Microbial decolourization of azo dyes by Proteus mirabilis.* J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 23: 686-690.

Claus, H. (2003). *Laccases and their occurrence in prokaryotes.* Arch. Microbiol., 179: pp.145-150.

Claus, H. (2004). *Laccase: structure, reactions, distribution.* Micron, 35: pp.93-96.

Cortazar, A., González C., Coronel C, Escalante C., Castro J., Villagómez J. (2012) *Biología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil.* Universidad y ciencia Vol.28 No.2 pp. 187-199.

Cortazar, A. Coronel C., Escalante A., González C. (2014) *Contaminación generada por colorantes de la industria textil.* Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Escuela Preparatoria No. 4 vida Científica Volumen 2* No. 3

Cristóvão, R., Tavares A., Ferreira L., Loureiro J., Bouventura R., Macedo E. (2009) *Modeling the discoloration of a mixture of reactive textile dyes by commercial laccase.* Bioresour. Technol. 100: 1094-1099.

Davies, G. J. y Ducros, V. (2001). Laccase. En: Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T. y Wieghardt, K. (Eds). Handbook of metalloproteins. John Wiley and Sons, Ltd. Chichester, West Sussex.

Dawkar VV, Jadhav UU, Ghodake GS, Govindwar SP (2009) *Effect of inducers on the decolorization and biodegradation of textile azo dye Navy blue 2GL by Bacillus sp. VUS.* Biodegradation. 20: PP. 777-787

Díaz F. (2017). *Los residuos peligrosos en México. Evaluación del riesgo para la salud*

Días R. (2010). *Caracterización y papel biorremediador de la lacasa producida por el hongo lignolítico Colioloopsis rijida en alpeorujo*. Tesis doctoral Universidad de Granada España.

Djepang, S., Laminsi S., Njoyim T., Cedrik Ngnintedem, C., Brisset L. (2014) Plasma-Chemical and Photo-Catalytic Degradation of Bromophenol Blue. Chemical and Materials Engineering pp. 14-23.

Dwivedi, P., Singh T. (2018) *Bioremediation of textile effluent for degradation and decolourization of synthetic dyes: a review*. India, International Journal of Current Research in Life Sciences Vol. 07, No. 04, pp.1948-1951.

EcuRed, (2014) *Rojo Congo*. Recuperado octubre 2018. https://www.ecured.cu/Rojo_Congo

Garzon, R. (2009) *cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave tequilana Webber var.* Tesis de licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana. Bogota Colombia.

IriarteM. Gavira, J. (2013) *azul de bromofenol: amarillo, verde, azul... e incoloro*. Recuperado octubre 2018. <https://triplenlace.com/2013/12/15/azul-de-bromofenol-amarillo-verde-azul-e-incoloro/>.

Glenn JK, Gold MH (1983). *Decolorization of several polymeric dyes by the lignin degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1741-1747.

Haug W, Schmidt A, Nörtemann B, Hempel DC, Stolz A, Knackmuss HJ (1991) *Mineralization of the sulfonated azo dye mordant yellow 3 by 6-aminonaphtalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium*. Appl. Environ. Microbiol. 57: pp.3144-3149

Hou, H., Zhou, J., Cuihong, J. & Yan, D. (2004). *Enhancement of laccase production by Bibliografía Pleurotus ostreatus and its use for the decolorization of anthraquinone dye*. *Process Biochem.*, 39: 1415-1419.

Barreda, K., Mendoza, I., Ortega, A., Martínez, M., Netzahuatl, Alma. (2015). *Biosorción de colorante naranja ácido 10 por biomasa de levadura aislada de suelo contaminado*. *Rev Cubana Química* vol.27 pp. 216-227.

Kirk, T. K. y Farrell, R. L. (1987). *Enzymatic 'combustion': the microbial degradation of lignin*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 41: pp.465-505

Kumar, S. V. S., Phale, P. S., Durani, S., y Wangikar, P. P. (2002). *Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family*. *Biotechnol. Bioeng.*, 83: pp. 386-394.

Leonowicz, A., Cho, S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., y Rogalski, J. (2001). *Fungal laccase: properties and activity on lignin*. *J. Basic Microbiol.*, 3-4: pp.185-227.

Lewis, N. G. y Yamamoto, E. (1990). *Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation*. *Annu. Rev. Plant Phys.*, 41 pp.455-496

Lokendra S. y Singh P. (2010) *Biodegradation of Textile Dyes, Bromophenol Blue and Congo Red by Fungus Aspergillus Flavus Environ. We Int. J. Sci. Tech.* 5 pp. 235-242.

V. Manikandan, J.T. Winowlin Jappes, S.M. Suresh Kumar, P. Amuthakkannan *Investigation on effect of Surface Modification in Mechanical properties of Basalt Fiber Reinforced Polymer Composites Composites Part B* 43 (2012) 812–818

Martínez, T. (2011) *Biosorción del colorante congo en sistemas en lote utilizando biomasa de chlorella sp.* Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

McGuirl, M. A. y Dooley, D. M. (1999). *Copper-containing oxidases*. Curr. Opin. Chem. Biol., 3: pp.138-144.

Méndez, A. (2013) *Colorantes químicos y alimentarios*. La guía química. Recuperado octubre 2018. <https://quimica.laguia2000.com/general/colorantes-quimicos-y-alimentarios>.

MICOEX, (2016). *Corioloopsis gallica*. Sociedad Micológica Extremeña. Recuperado octubre 2018 <http://micoex.org/2016/09/17/corioloopsis-gallica/>.

Mohorcic, M., Teodorovic, S., Golob, V. & Friedrich, J. (2006) *Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths*. Chemosphere, 63: 1709-1717.

Murphy, M. E., Lindley, P. F., y Adman, E. T. (2000). *Structural comparison of cupredoxin domains: domain recycling to construct proteins with novel functions*. Protein Sci., 6:761-770.

Páez, LI. M. (2012) *Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de de aguas residuales de la industria textil*. Tesis para ingeniería escuela Politécnica del Ejercito Sangolquí Ecuador.

Pandey A, Singh P, Lyengar, L (2007). *Bacterial decolorization and degradation of azo dyes*. Int. J. Biodeterioration Biodegradation. 59(2): 73-84.

Patrick, F., Mtui, G., Mshandete, A., Johansson, G. & Kivaisi, A. (2009). *Purification and characterization of a laccase from the basidiomycete Funalia trogii (Berk.) isolated in Tanzania*. African J. of Biochem. Res., 3(5): 250-258.

Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A. M., y Goffner, D. (1999). *Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases a divergent gene family in poplar*. Eur. J. Biochem., 259:485-495.

Reyes, A. (2010) *Textil y vestido*. Secretaría de economía. Recuperado octubre 2018. <http://www.2006-2012.economia.gob.mx/economia-para-todos/abc-de-economia/mercado-interno/365-textil-y-vestido>.

Rodríguez- Couto, S., Sanromán, M., Hofer, D. & Gübitz, G.M. (2004). *Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilization of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes*. *Bioresource Technol.*, 95: 67-72.

Rodríguez E. (2006-a) *Caracterización molecular de lacasas de *pleurotus eryngii*: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos*. Tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid.

Rodríguez S., Bermúdez R., Díaz S., Kourouma A. (2006-b). *Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales*. *Revista Mexicana de Micología*, num. 23, pp. 915.

Roman R., Torres C., Ayala M., Vázquez R. (2010). *Producción a escala piloto de lacasa de *Coriolopsis gallica**. *Rev. Mex. Mic* vol.32 pp.19-27.

Scherer, M. y Fischer, R. (2001). *Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans**. *FEMS Microbiol. Lett.*, 199 pp. 207-213.

Solomon, E. I., Sundaram, U. M., y Machonkin, T. E. (1996). *Multicopper oxidases and oxygenases*. *Chem. Rev.*, 96:2605.

Stolz A (2001) *Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes*. *Appl. Microb. Biotechnol.* 56: 69-80

Thurston, C. F. (1994). *The structure and function of fungal laccases*. *Microbiology*, 140: pp19-26.

Vandertol-Vanier H.A., R. Vazquez-Duhalt, R. Tinoco, M.A. Pickard, 2002. *Enhanced activity by poly (ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29: pp.214-220.

Vinuth, Naik B., Vinoda., Pradeepa., Kumar A., Sekhar Ch. (2016) *Rapid Removal of Hazardous Rose Bengal Dye Using Fe (III)– Montmorillonite as an Effective Adsorbent in Aqueous Solution*. Journal of Environmental & Analytical Toxicology pp. 1-7.

Vite-Vallejo O., L.A. Palomares, E. Dantán-González, H.G. Ayala-Castro, C. Martínez-Anaya, B. Valderrama, J. Folch-Mallol, 2009. *The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a Pycnoporus sanguineus laccase*. Enzyme and Microbial Technology 45: 233239.

Yoshida, H. (1883). *Chemistry of lacquer (Urushi)*, part 1. J. Chem. Soc., 43:472-486.

Zhu, X. y Williamson, P. R. (2004). *Role of laccase in the biology and virulence of Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Research, 5: pp1-10.



**Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología**



Cuernavaca, Morelos a 22-05-2019

COMITÉ DE RON DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Ramón Alberto Batista García
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dr. Fernando Martínez Morales

Tesis: "Degradación de colorantes industriales (Azul de coomassie, Azul de bromofenol y Rojo congo) mediante una cepa transgénica de *Pichia pastoris* que expresa la lacasa de *Coriopsis gallica*."

Alumno que la presenta a revisión: **ADRIANA ELIZABETH AVILA HERNANDEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 28 de Mayo 2019

COMITÉ DE RON DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Ramón Alberto Batista García
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dr. Fernando Martínez Morales

Tesis: "Degradación de colorantes industriales (Azul de coomassie, Azul de bromofenol y Rojo congo) mediante una cepa transgénica de *Pichia pastoris* que expresa la lacasa de *Coriopsis gallica*."

Alumno que la presenta a revisión: **ADRIANA ELIZABETH AVILA HERNANDEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 28/Mayo/2019

COMITÉ DE RON DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Ramón Alberto Batista García
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dr. Fernando Martínez Morales

Tesis: "Degradación de colorantes industriales (Azul de coomassie, Azul de bromofenol y Rojo congo) mediante una cepa transgénica de *Pichia pastoris* que expresa la lacasa de *Coriopsis gallica*."

Alumno que la presenta a revisión: **ADRIANA ELIZABETH AVILA HERNANDEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 28/Mayo/2019

COMITÉ DE RON DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Ramón Alberto Batista García
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dr. Fernando Martínez Morales

Tesis: "Degradación de colorantes industriales (Azul de coomassie, Azul de bromofenol y Rojo congo) mediante una cepa transgénica de *Pichia pastoris* que expresa la lacasa de *Coriopsis gallica*."

Alumno que la presenta a revisión: **ADRIANA ELIZABETH AVILA HERNANDEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. FERNANDO MARTINEZ MORALES



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 28/Mayo/2019

COMITÉ DE RON DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Ramón Alberto Batista García
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Dr. Fernando Martínez Morales

Tesis: "Degradación de colorantes industriales (Azul de coomassie, Azul de bromofenol y Rojo congo) mediante una cepa transgénica de *Pichia pastoris* que expresa la lacasa de *Coriopsis gallica*."

Alumno que la presenta a revisión: **ADRIANA ELIZABETH AVILA HERNANDEZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE