

# DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EFLUENTES SIMULADOS POR ACCIÓN DE LA ENZIMA LACASA OBTENIDA A PARTIR DEL HONGO *Pleurotus Ostreatus*

(Degradation of Phenolic compounds in simulated effluents by action of the enzyme laccase obtained from fungus *Pleurotus ostreatus*)

José Melendez<sup>1</sup>, Soraya Castillo<sup>2</sup>, Yennyfer Peña<sup>1</sup>, Teresa Yépez<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Química. UNEXPO – Vicerrectorado Barquisimeto. Venezuela

<sup>2</sup> Laboratorio de Bioingeniería. Programa de Ingeniería Agroindustrial. Decanato de Agronomía, UCLA- Barquisimeto. Venezuela

[sorayac@ucla.edu.ve](mailto:sorayac@ucla.edu.ve)

Recibido: 06-03-2015 / Aceptado: 13-03-2015

## RESUMEN

Los fenoles son compuestos orgánicos presentes en el medio ambiente a bajas concentraciones producto de la fermentación natural de algunos hongos y bacterias, además, se destacan como subproductos generados en procesos agroindustriales y de refinación de petróleo, lo cual afecta a los seres vivos debido a su alta toxicidad; por ende, se han desarrollado diversos métodos químicos y biológicos para minimizar la presencia del fenol en cuerpos de agua entre los que figuran tratamientos enzimáticos; estos últimos se valen de la especificidad de las enzimas como la lacasa para descomponerlo. En base a esto, se evaluó el porcentaje de degradación de fenol en muestras acuosas por acción de la enzima Lacasa obtenida mediante el hongo *Pleurotus Ostreatus*. Para ello, el micelio del hongo fue cultivado en un medio PDA-Vinaza-Catecol, luego se determinó la actividad de la enzima Lacasa por espectrofotometría usando ABTS como agente oxidante por un lapso de 10 a 80min, obteniéndose valores en el rango de 0,0278 y 3,8565 (U/l), encontrándose los picos de máxima actividad a los 60 min, posteriormente se evaluó la degradación de fenol en agua sintética a concentraciones de 0,5, 1, 4 y 8 mg/L por periodos de contacto de 1, 2 y 24 horas, acto seguido se determinó la concentración final de fenol utilizando el método colorimétrico con el reactivo de Foli-Ciocalteu, donde se observó en promedio una remoción de 73,75, 78,5 y 96,5 por ciento, para los periodos de tiempo mencionados.

**Palabras claves:** Laccasa, degradación de fenoles, *Pleurotus Ostreatus*, agua sintéticas.

## SUMMARY

Phenols are organic compounds present in the environment at low concentrations the product of natural fermentation of some fungi and bacteria also stand out as by-products generated in agribusiness and petroleum refining processes, which affects living beings

because of their high toxicity ; therefore have been developed various chemical and biological methods to minimize the presence of phenol in water bodies which include enzymatic treatments , the latter are worth of the specificity of enzymes such as laccase to decompose it. Based on this, was evaluated the degradation percentage of phenol in aqueous samples by the action of Laccase enzyme obtained of the fungus *Pleurotus ostreatus*. For this, the mycelium of the fungus was grown on a PDA - stillage catechol medium , then the activity of the enzyme laccase was determined spectrophotometrically using ABTS as the oxidizing agent for a period of 10 to 80 min , yielding values in the range 0 , 0278 and 3.8565 (U / l ) , being the peak of maximal activity at 60 min , then the degradation of phenol in synthetic water at concentrations of 0.5 , 1, 4 and 8 mg / L were evaluated for periods of contact 1 , 2 and 24 hours , thereupon final phenol concentration was determined using the colorimetric method with Foli- Ciocalteu reagent , which was observed on average removal 73.75 , 78.5 and 96.5 percent for the periods of time mentioned .

**Keywords :** Laccasa , degradation of phenols, *Pleurotus ostreatus* , synthetic water.

## INTRODUCCIÓN

El agua es sustancia renovable utilizada por los seres humanos para llevar a cabo actividades industriales y cotidianas que de otro modo no serían posibles. El uso y disposición del agua altera su composición química y física que, después de ser desechada y retornada al medio ambiente puede contener agentes físicos, químicos o biológicos considerados nocivos, tóxicos entre los que figuran los llamados fenoles, los cuales, se presentan en el ambiente de forma natural en pequeñas cantidades producto del metabolismo y excreciones de organismos vivos como algunos hongos y bacterias. El hombre dentro de sus actividades desarrolladas genera de forma directa o indirecta una gran cantidad de fenoles, principalmente en las agroindustrias y refinerías de petróleo (Kumaran , 1997). No todos los tratamientos creados son infalibles y en algunas oportunidades las consecuencias ambientales y económicas que acarrear son más importantes. Investigaciones recientes apuntan hacia la aplicación directa de las enzimas producidas por organismos naturalmente, y así, reducir el factor de posibles limitaciones espaciales y subsistencia de los microorganismos (Nicell, 2005). Entre las enzimas que han cobrado relevancia figuran las lacasas, obtenidas a partir diversos seres vivos como los hongos; entre ellos el *Pleurotus Ostreatus* (Suárez, 2012); esta familia de enzimas oxidoreductasas poseen, en líneas generales, una tendencia probada a degradar compuestos fenólicos

(Márquez, 2006); es necesario determinar las condiciones óptimas para su implementación, por ello , en este trabajo se estudió la capacidad de degradación del fenol por la enzima lacasa obtenida del hongo *Pleurotus Ostreatus*; a fin de proponerlo como tratamiento efectivo para aguas contaminadas.

## **METODOLOGÍA**

### **1. CULTIVO DEL MICELIO DE *Pleurotus Ostreatus***

Seis semillas de trigo infectadas con el micelio del hongo fueron sembradas en placas Petri, previamente servidas con el medio de cultivo esterilizado PDA-Vinaza-Catecol y un fungicida (Previcur) para evitar el desarrollo de hongos no deseados, estas se dejaron en incubación por 10 días a 28°C, observándose la presencia del halo marrón-rojizo proveniente de la reacción de la lacasa producida con el indicador Catecol.

### **2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ENZIMA LACASA**

La presencia de la Lacasa se probó mediante la observación del crecimiento del halo de oxidación (marrón-rojizo oscuro) del catecol en el medio, además, se llevó a cabo la prueba de la gota, en la cual, se extrajo una cantidad del medio del cultivo del hongo y se disolvió con dos gotas de ABTS, observándose la variación en la coloración del mismo, de un tono incoloro a verde azulado.

### **3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA LACASA**

En primer lugar se preparó el extracto enzimático, para ello se realizaron tres tomas de diferentes partes del cultivo para cinco placas Petri, rotuladas con los códigos C8-04, C8-08, C8-10, C8-12 y C8-14, se disolvieron por separado en 10 ml de solución tampón Citrato- Fosfato y se filtraron por succión con papel Whatman número 1, en total se obtuvieron 15 soluciones de enzima. Posteriormente se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de enzima y 950 $\mu\text{L}$  de ABTS y se colocaron en celdas de cuarzo y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420nm a 10, 20, 30, 60 y 80 minutos transcurridos la reacción. La actividad se calculó a partir de la ecuación (1) derivada de la ley de Lamber-Beer. (García, 2004).

$$\text{Ec. 1} \quad U/L = \frac{A \times V_t \times f}{t \times \epsilon \times V_m \times l}$$

Dónde:

A= ΔA: variación de Absorbancia, V<sub>t</sub>: volumen total de la muestra (mL), f: factor de conversión de unidades (10<sup>6</sup>), V<sub>m</sub>: volumen de reacción (mL), ε: coeficiente de extinción molar (M<sup>-1</sup>\*cm<sup>-1</sup>), t: tiempo de reacción (min), l: paso de cubeta (cm).

### **PREPARACION DE SOLUCIONES ENZIMA-FENOL**

Se preparó una solución base de 50 ppm de Fenol al 90% y a partir de la misma, las soluciones sintéticas a concentraciones de 0,5, 1, 4, y 8ppm, siendo 0,5 ppm el valor límite permitido por el Decreto 883 que regula la descarga de efluentes líquidos en Venezuela, 1 ppm valor experimental, 4 ppm correspondiente a un efluente de la industria petrolera (Meza, 2007) y por último 8 ppm, de un efluente agroindustrial según Ferrer y col (2012). El extracto de enzima se preparó disolviendo por separado el contenido total de las placas Petri rotuladas con C8-04, C8-08, C8-10, en 200ml de solución tampón Citrato- Fosfato y posteriormente filtrando por succión. Se prepararon muestras con 12 ml de solución de fenol y 20 ml de extracto enzimático (C8-04, C8-08, C8-10), el procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra.

#### **4. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN FINAL DE FENOLES**

Se empleó el método colorimétrico con el reactivo de Folin- Ciocalteu (F-C). Se elaboró una curva de calibración, usando una solución madre de 50ppm de fenol con la cual se prepararon patrones de 0, 0,4, 1, 2, 3, 4, 1 y 20 ppm, agregando 2 ml de carbonato de sodio (20%) y 1,5 ml de reactivo de F-C, esperando 30 minutos de reacción para realizar la lectura de absorbancia a 700nm. Se tomaron 25 ml de las mismas, más 2ml de Carbonato de Sodio (20%) y 1,5ml de reactivo de F-C, con el valor de absorbancia obtenido y la curva de calibración se obtiene la concentración final de fenol. En cuanto a porcentaje de degradación fue calculada mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Ec. 2} \quad \% \text{Degradación} = \frac{C_o - C_f}{C_o} * 100$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

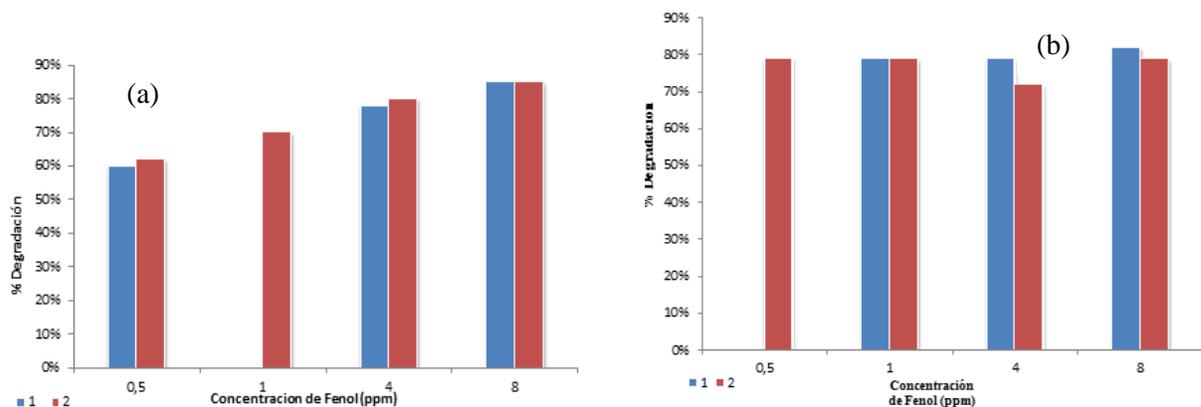
El cultivo del hongo *Pleurotus Ostreatus*, se realizó a través del procedimiento descrito, resultando en un crecimiento apreciable luego de 10 días de inoculación generando un micelio aéreo, de textura algodonosa y color blanco.

Para el análisis de actividad, se seleccionaron cinco cultivos, que presentaron visualmente el máximo desarrollo micelar, oscurecimiento del medio producto de la oxidación del indicador Catecol por acción de la enzima (Suárez, 2012) y además dieron positiva a la prueba de la gota.

En las placas (C8-04, C8-08, C8-10) se observa la tendencia de actividad para tres muestras del cultivo, visualizándose el crecimiento acelerado de actividad para el intervalo de tiempo 0-60 min y un decrecimiento pronunciado para los 80 minutos de reacción, siendo este comportamiento similar al encontrado por Cano y col (2010). La actividad promedio de la enzima a los 60 minutos fue de 3,3549 U/L para la placa C8-04, mientras que para la placa C8-08 el máximo valor fue de 2,9028 U/L a los 60 minutos y 3,8565 U/L para la placa C8-10 a los 60 minutos de reacción, posteriormente se observa en los tres cultivos que la curva se torna descendiente para los tiempos de 80min, lo que indica una posible inhibición competitiva de la enzima. Cabe mencionar que la evaluación de actividad se realizó por tiempo prolongado (días), la desactivación de la enzima en estudio fue más rápida, esto puede deberse a que la vinaza de caña contiene concentraciones importantes de compuestos fenólicos (Ferrer y col., 2012); en adición, el extracto enzimático no purificado del cultivo puede contener además de las lacasas, xilanasas y celulasas y otras enzimas (Sánchez y col., 2007) que pudieron actuar como inhibidores de la enzima.

En otro sentido, se procedió a la evaluación de la degradación de compuestos fenólicos en muestras de agua a 1, 2 y 24 horas con agitación magnética constante, dejándose como

comprobante un testigo que solo contenía solución de fenol sin enzima; de esta manera, se seleccionó aleatoriamente para el estudio el tiempo de contacto de 1 hora para la placa C8-04, 2 horas para C8-08 y 24 horas para el cultivo C8-10. Los resultados obtenidos del análisis se presentan a continuación en la figura 1.



**Figura 1.** Porcentajes de degradación de fenol: (a) placa C8-04 a 1 hora (b) placa C8-08 a 2 horas.

La degradación de fenol se llevó a cabo de forma satisfactoria arrojando resultados positivos en la disminución de la concentración del fenol. En el cultivo C8-04 se encontró un promedio de degradación de 73,75 por ciento a una hora de tiempo de contacto, en la placa C8-8 logró degradar en promedio un 78,5 por ciento del fenol a dos horas de tiempo de contacto y por último el cultivo C8-10 degradó un promedio de 96,5 por ciento del fenol. En general se encontró que los porcentajes de remoción estuvieron dentro de los valores reportados por investigaciones previas como Chea, V (2012), y Castillo, S (2011), con la enzima lacasa obtenida del hongo *Trametes Versicolor* e inmovilizada en membranas de cerámica.

## CONCLUSIONES

- El cultivo del hongo *Pleurotus Ostreatus*, se desarrolló de forma satisfactoria usando un medio de PDA-Vinaza-Catecol, encontrándose un máximo desarrollo micelar a los 10 días de incubación.
- Se evaluó la actividad de los cultivos (C8-04, C8-08, C8-10), usando ABTS como agente oxidante, los cuales mostraron comportamiento creciente - decreciente, alcanzando un máximo de actividad a los 60 minutos de reacción. El cultivo C8-10 presento la mayor actividad de 3,8565 U/L a los 60 min, mientras que el cultivo C8-08 con un valor de 2,9028 U/L se ubicó como el de menor actividad. Esta variación de actividad puede atribuirse al metabolismo del microorganismo que influyo en la segregación de enzima.
- La degradación de fenol se llevó a cabo de forma satisfactoria, obteniéndose 73,75 por ciento para el C8-04 en apenas una hora de tiempo de contacto, 78,5 por ciento para la muestra C8-8 en dos horas de contacto y un 96,5 por ciento para la muestra C8-10.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castillo, Soraya 2011. Degradation des composes phenoliques par milieu de la lacasse de *Trametes versicolor*. Rapport de stage Postdoctoral. IEM, Montpellier. France
- Chea, Vorleak 2012. Degradación de compuestos fenólicos en un REM. Tesis Doctoral. IEM, Montpellier. Francia.
- FERRER, J. LEAL, I. NUÑEZ, O. 2012. Optimización de la oxidación de vinazas de agave, cocuy, mediante de procesos fenton y fotofenton. Trabajo de Grado. Universidad Simón Bolívar.
- GARCIA, J y SILVA, C. 2004. Manual del Técnico Superior de Laboratorio de Análisis Clínicos. Editorial MAD España Pp: 393-396. Disponible: <http://books.google.co.ve/books?id=WB3lngLAYjAC&pg=PA395&dq=unidad+enzimatica+calculo&hl=es&sa=X&ei=wFruUt3bFolkQfrqYDgBQ&ved=0CEMQ6AEwBA#v=onepage&q=unidad%20enzimatica%20calculo&f=false>. Consultado: 2014 Febrero 02.
- KUMARAN, P. Y PARUCHURI, L. 1997. Kinetics of phenol biotransformation. *Water Research* (31):11-22.
- MÁRQUEZ, A. 2006. Estudio para la producción de una lacasa termoestable por el hongo *Tremetes sp.* EUM1. Trabajo de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México D.F. Disponible: <http://148.206.53.231/UAMI12924.pdf>. Consultado: 2013 Febrero 5

- MEZA, M. DUDAMEL W. 2007. Evaluación de un Carbón Activado Venezolano utilizando adsorción del fenol de aguas sintéticas y residuales. Trabajo de Grado. Universidad Nacional Experimental “Antonio José de Sucre” VRB.
- NICELL, J. 2005. Environmental Applications of Enzymes. Trabajo Post Doctoral. McGill University, Department of Civil Engineering and Applied Mechanics. Canada
- PEÑA, A. 2004. Bioquímica. 2° Edición. Limusa. Disponible: <http://books.google.co.ve/books?id=EFUP472dyEMC&pg=PA194&lpg=PA194&dq=medicion+de+actividad+enzimatica&source=bl&ots=OBQ7RtDXjW&sig=7lt4g32Szz5NPseBKCDDVcMo5LU&hl=es-419&sa=X&ei=WLZCUrHV>. Consultado: 2013 Enero 30.
- SUÁREZ, A. 2012. Obtención de la enzima lacasa a partir del hongo *Pleurotus Ostreatus* en un sustrato a base de vinaza de caña. Trabajo de Grado. Universidad Centro occidental “Lisandro Alvarado”. Programa de Ingeniería agroindustrial.