

**UNIVERSIDAD DE MATANZAS
“CAMILO CIENFUEGOS”
FACULTAD QUÍMICA - MECÁNICA**



***INMOVILIZACIÓN DE LACASA DE TRAMETES VERSICOLOR POR
FORMACIÓN DE AGREGADOS ENTRECRUZADOS Y SU USO EN
LA DEGRADACIÓN DE COLORANTES SINTÉTICOS***

***Tesis presentada como requisito al título de
Ingeniero Químico***

Autor: Yanara Espinosa Torres.

Tutor: Dr. María de Lourdes Villalonga Santana

Matanzas 2012

Pensamiento

*Aquel que no hace todo lo que puede hacer,
peca contra lo natural y paga la culpa de su pecado.*



José Martí

Página de aceptación

Jefe del Tribunal

Tribunal

Tribunal

Matanzas _____ de _____ del _____.

Declaración de Autoridad

Declaro que soy el único autor de este Trabajo de Diploma, y autorizo a la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, hacer uso del mismo para posteriores investigaciones.

Yanara Espinosa Torres

Dedicatoria

A mi familia en especial a mis abuelos, padres, hermanos y a mi novio.

Opinión del tutor.

Título: Inmovilización de lacasa de *Trametes versicolor* por formación de agregados entrecruzados y su uso en la degradación de colorantes sintéticos

Autor: Yanara Espinosa Torres

El agua constituye uno de los recursos más valiosos con que cuenta la humanidad. Sin embargo, su uso se ve limitado fundamentalmente por la calidad de la misma. La eliminación de la contaminación de las aguas constituye hoy uno de los retos en los cuales se enfrascan científicos y varios estudiosos del tema. Esta problemática condujo a la labor investigativa de la estudiante Yanara Espinosa Torres, quien asumió esta tarea basada en los conocimientos adquiridos durante toda la carrera.

Yanara Espinosa, ha sido una estudiante que se incorporó al Laboratorio de Tecnología Enzimática de la Facultad de Agronomía para la realización de su tesis de diploma, por la relación existente con su centro laboral. Durante el proceso de la investigación mostró una gran seriedad en la labor investigativa, independencia, creatividad, responsabilidad, apropiándose de los métodos y procedimientos empleados, hasta obtener los resultados que aquí se muestran.

La búsqueda de soluciones y alternativas a los problemas presentados, caracterizaron su desempeño en el laboratorio; creciendo como estudiante y como persona.

Constituyó un placer asumir la tutoría de la tesis de Yanara Espinosa Torres, quien por los resultados mostrados merece le sea otorgado el título académico de Ingeniero Químico.

Dra. C. María de Lourdes Villalonga Santana

Matanzas, Junio de 2012.

Agradecimientos

Le agradezco a todos los trabajadores del laboratorio de Tecnología Enzimática (CETENZ) de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” y en especial, a mi tutora incondicional María de Lourdes Villalonga.

Al profesor Roberto León quien me ayudó a encontrar a mi excelentísima tutora.

A todas mis amigos y profesores que se preocuparon por la terminación de mi Carrera.

Resumen

En la búsqueda de condiciones menos dañinas al ecosistema natural, se ha propuesto la utilización de enzimas que permiten aplicar condiciones de trabajo más amigables con el medio ambiente. La inmovilización de enzimas permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimenticios, en el tratamiento de residuos, en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades, y otras muchas aplicaciones. En el presente trabajo se inmovilizó la enzima lacasa por formación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAS) y se determinaron las condiciones óptimas para su preparación. La enzima inmovilizada mostró mayor resistencia a la desnaturalización con respecto a la temperatura, con una retención de su actividad inicial superior al 80% (50°C) y de un 10% (70°C), después de 3h de incubación. De igual forma se incrementó la resistencia a los procesos de desactivación causados por solventes orgánicos y agentes caotrópicos, como la urea. Esta enzima puede ser utilizada en la remediación de aguas residuales de la industria textil. En este sentido, se determinó la decoloración enzimática del colorante sintético azul índigo carmín por la enzima inmovilizada (Lac-CLEA) a diferentes intervalos de tiempo, obteniéndose una decoloración de más de un 80%, después de ocho horas de incubación. Se realizó el estudio de la reutilización de la enzima inmovilizada, lo que demostró un 90 % de actividad residual después de 12 ciclos consecutivos.

Índice.

	Contenidos	Pág.
1.	Introducción	3
2.	Revisión Bibliográfica	6
2.1	El Agua. Usos, Importancia y Contaminación.	6
2.2	Métodos utilizados para la remediación del agua	10
2.3	Enzimas inmovilizadas. Tipos de inmovilización.	11
2.4	La Lacasa como enzima modelo.	15
2.4.1	Aplicaciones de la lacasa en la industria	16
2.4.2	Inmovilización de lacasa. Utilización en la biorremediación	17
3.	Materiales y Métodos	19
3.1	Materiales y Reactivos.	19
3.2	Equipos empleados	19
3.3	Determinación de las condiciones óptimas para la formación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de lacasa de <i>Trametes versicolor</i> .	19
3.3.1	Determinación de la concentración óptima del agente precipitante.	19
3.3.2	Preparación de los CLEAs a las concentraciones óptimas de agente precipitante.	20
3.3.3	Determinación de la concentración óptima del agente entrecruzante.	20
3.3.4	Determinación de la concentración óptima de la enzima.	21
3.4	Inmovilización de lacasa de <i>Trametes versicolor</i> por formación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs).	21
3.5	Caracterización de los CLEAs de lacasa de <i>Trametes versicolor</i> (Lac-CLEA).	22
3.5.1	Determinación de la concentración de proteínas.	22
3.5.2	Determinación de la actividad enzimática.	22
3.5.3	Determinación de la temperatura óptima.	22

3.5.4	Determinación del pH óptimo.	22
3.5.5	Determinación de las constantes catalíticas.	23
3.6	Determinación de la estabilidad funcional de las preparaciones enzimáticas.	23
3.6.1	Perfil de Termoestabilidad.	23
3.6.2	Estabilidad en presencia de agentes caotrópicos.	23
3.6.3	Estabilidad en presencia de solventes orgánicos.	24
3.7	Decoloración de un tinte sintético (azul índigo).	24
3.8	Determinación de la reusabilidad de la enzima inmovilizada por formación de agregados entrecruzados (Lac-CLEA).	24
3.9	Procesamiento estadístico	25
3.10	Valoración Económica.	25
4	Resultados y Discusión	27
4.1	Obtención del biocatalizador de lacasa de <i>Trametes versicolor</i> por formación de agregados entrecruzados (Lac-CLEA). Determinación de las condiciones óptimas.	27
4.2	Determinación de la estabilidad de la enzima inmovilizada.	36
4.3	Valoración económica.	45
5	Conclusiones	49
6	Recomendaciones	50
7	Referencias Bibliográficas	75

1. INTRODUCCIÓN.

El agua tiene propiedades únicas que la caracterizan y que permiten el desarrollo de la vida en nuestro planeta. Es probablemente el único recurso natural que se relaciona con todos los aspectos de la civilización humana, con la agricultura, con el desarrollo industrial y con la asignación de valores culturales y religiosos. Tenemos que proteger las aguas del planeta. Hoy el hombre dispone de todas las medidas para lograrlo; así pues, debemos de evitar la contaminación de los mares, océanos, ríos y lagos (ECURED 2011).

A medida que aumenta el poder del hombre sobre la naturaleza y aparecen nuevas necesidades como consecuencia de la vida en sociedad, el medio ambiente que lo rodea se deteriora cada vez más. La contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes que afectan a nuestro mundo, siendo la contaminación de las aguas uno de los principales problemas. La Industria Textil constituye una de las que más influye en la contaminación de las aguas, pues los colorantes sintéticos son solubles en agua y difíciles de degradar por lo que en su mayoría son vertidos en las aguas residuales (Couto and Herrera, 2006).

Actualmente, como resultado de la preocupación por salvaguardar el medio ambiente y de legislaciones cada vez más exigentes, la búsqueda de procesos industriales limpios y no contaminantes como alternativa a los tradicionales procesos químicos se ha convertido en una necesidad (Baldrian, 2006). En este sentido, las enzimas presentan propiedades catalíticas muy interesantes: alta actividad catalítica bajo condiciones experimentales muy suaves (presión atmosférica, pH y temperaturas moderadas), combinadas con una gran selectividad y especificidad (estereo-especificidad). La ruta enzimática presenta muy buenas perspectivas para su uso en procesos industriales que deben ser selectivos, específicos, simples y no contaminantes del medio ambiente (Fernández-Lafuente and Guisán, 1998). Así, las enzimas pueden ser catalizadores muy útiles en diversos procesos de las industrias alimentarias, farmacéutica y química (Katchalski-Katzir, 1993). Una de las enzimas más utilizadas en la descontaminación de aguas residuales de la Industria Textil es la lacasa, por su capacidad de degradar xenobióticos y otros compuestos fenólicos o no, con estructura semejante a la de los sustratos sobre los que ella actúa (Kunamneni et. al., 2008; Giardina et. al., 2010). A pesar de las evidentes ventajas, en muchos de estos procesos no se ha adoptado aún el uso de enzimas

debido principalmente a los siguientes inconvenientes que limitan su uso a nivel industrial: i) muchas enzimas no son lo suficientemente estables en las condiciones operacionales requeridas y pueden llegar a perder la actividad catalítica debido a su desnaturalización provocada por el solvente, las condiciones requeridas de pH y temperatura, y la agitación mecánica; ii) debido a que las enzimas son moléculas solubles en agua, su uso repetitivo, el cual es importante para asegurar un proceso económico, es problemático debido a la dificultad de recuperarlas de sistemas acuosos y separarlas de sustratos y productos; iii) la productividad de los procesos industriales por lo general es baja, debido a la tolerancia limitada de las enzimas a altas concentraciones de sustratos y productos (Illanes, 1999, Paar et. al., 2003, Fazary et. al., 2009, Brem et. al., 2012).

El desarrollo de nuevos métodos orientados a incrementar la estabilidad de estos biocatalizadores es un tema emergente dentro de la tecnología enzimática y la química de proteínas. Una de las estrategias más efectivas para la estabilización funcional de las enzimas lo constituye su inmovilización en soportes hidrosolubles, dependiendo de las propiedades finales de los catalizadores preparados por estas vías tanto de la naturaleza de la enzima como de la matriz empleada para la inmovilización, así como del método usado para la unión de estos materiales con la proteína catalítica.

La inmovilización enzimática permite un ahorro de costos y de tiempo, ya que pueden ser reutilizadas. En la última década, una nueva variante de inmovilización de enzimas ha emergido como una vía capaz de incrementar la estabilidad de las mismas y es la formación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) (López-Serrano et. al., 2002, Mateo et. al., 2003, Wilson et. al., 2006).

Teniendo en cuenta los aspectos anteriores, el presente trabajo se propone abordar el siguiente **Problema Científico**: diseñar un biocatalizador enzimático capaz de degradar compuestos contaminantes del agua, mediante la inmovilización de la enzima lacasa por formación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs).

Para ello se propone comprobar la siguiente **Hipótesis Científica**:

La decoloración de tintes sintéticos pudiera realizarse por la acción de una lacasa inmovilizada por formación de agregados entrecruzados (CLEAs) con alta eficiencia y reusabilidad.

Objetivo General:

Preparar agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de lacasa y evaluar el efecto de la inmovilización sobre la estabilidad de la enzima; así como su acción en la degradación de colorantes sintéticos.

Objetivos Específicos:

1. Determinar las condiciones óptimas para la inmovilización de lacasa de *Trametes versicolor* por formación de CLEAs.
2. Evaluar el efecto de la inmovilización sobre las propiedades catalíticas y la estabilidad de la enzima.
3. Evaluar la capacidad de decoloración del CLEA de lacasa en la degradación de colorantes sintéticos y su reutilización.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. El Agua. Usos, Importancia y Contaminación.

El agua es el compuesto químico más abundante y el de mayor significación para la vida (Babor, 1978). Desde la antigüedad se considera como uno de los recursos naturales fundamentales junto al aire, la tierra y el fuego.

Es un recurso escaso pero de vital importancia para la sociedad y la naturaleza, ya que forma parte, en un tanto por ciento elevado, de la constitución de todos los seres vivos. De toda el agua existente en el planeta, solo una pequeña parte es aprovechable por la sociedad, y la mayor parte por la naturaleza (ECURED 2011). En la Figura 1 se muestra la distribución actual del agua en la tierra.

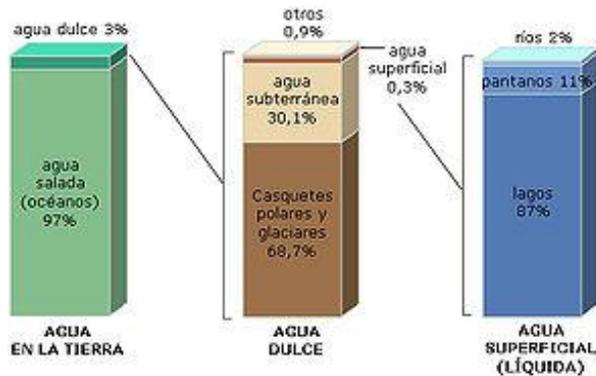


Figura 1. Distribución actual del agua en la tierra.

El hombre utiliza el agua en muchas actividades, desde usos industriales hasta las de aseo diario y su distribución se puede observar en la Figura 2 (Rodier, 1989 y Alós, 1997)

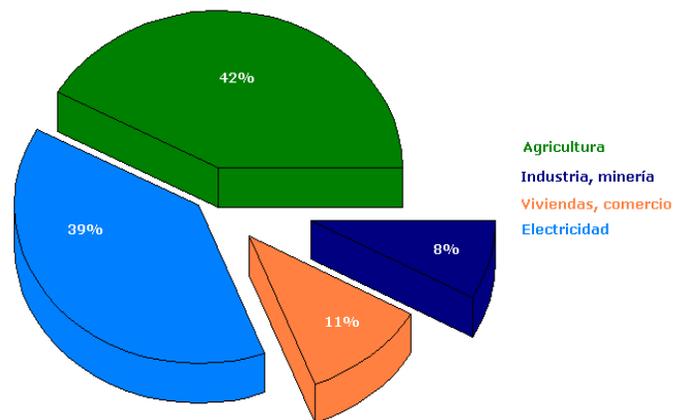


Figura 2. Distribución de la cantidad de agua utilizada en los diferentes sectores sociales.

En la agricultura es utilizada para irrigar los cultivos, para la generación de energía eléctrica y es de vital importancia para el desarrollo de varios procesos industriales.

En el caso particular de la industria presenta múltiples aplicaciones: para calentar y enfriar, para producir vapor de agua o como disolvente, como materia prima o para limpiar. La mayor parte, después de su uso, se elimina devolviéndola nuevamente a la naturaleza (ECURED 2011).

El agua tiene una gran importancia como medio en el que se llevan a cabo numerosos procesos químicos. Todas las reacciones asociadas con la vida vegetal o animal necesitan la presencia del agua para llevarse a cabo dentro del organismo viviente. Se le conoce como el disolvente universal teniendo en cuenta el carácter de su solubilidad que hace que muchas sustancias sean solubles en ella y que además, pueda combinarse con ciertas sales para formar hidratos, reaccionar con los óxidos de los metales formando ácidos y actuar como catalizador en muchas reacciones químicas importantes (Rodier, 1989; Alós, 1997).

Constituye el elemento mayoritario de todos los seres vivos (78%), indispensable en el desarrollo de la vida, el consumo humano y es una fuente de energía hidroeléctrica. Además, se utiliza como medio de transporte en la navegación

La situación mundial del agua es aún más deplorable y con matices mucho más catastróficos que la energética, pues hoy el volumen de agua disponible es menos de 50 %, del que existía al principio del siglo XX.

La crisis del agua se duplicará en 2025 debido a varios factores:

- Creciente demanda de agua por la agricultura, la industria y el consumo humano.
- Uso ineficiente del agua y con baja eficiencia.
- Incremento sostenido de la contaminación. (ECURED 2011).

A nivel mundial, es una preocupación según reportes de Fernández (1988) y del Informe de Naciones Unidas (2006), de cómo se han contaminando las aguas producto a los procesos y explotación de varias industrias y empresas, lo cual ha afectado seriamente al medio ambiente en el que operan, sin importar el costo social y el deterioro del entorno; además de no prever las consecuencias futuras que ello genera.

En muchos lugares se construyen fábricas e industrias muy próximas a las fuentes abastecedoras de agua, en las que se vierten desperdicios y sustancias perjudiciales que provocan su contaminación y limitan su empleo. Además, estos desperdicios causan daño a seres vivos que habitan en la hidrosfera (ECURED 2011).

Alós (1997) y Degrémont (1991), coinciden en que las aguas residuales industriales son las procedentes de las diferentes actividades industriales. Su volumen y composición no puede estimarse de forma general, ya que dependen del tipo de industria. Hay industrias que introducen sustancias tóxicas en sus aguas residuales, pudiendo afectar al proceso de depuración.

Las aguas residuales están constituidas por materia orgánica en forma suspendida, coloidal y disuelta (Tchobanoglous, 1995).

Los humanos llevamos mucho tiempo depositando nuestros residuos y basuras en la atmósfera, en la tierra y en el agua. Esta forma de actuar hace que los residuos no se traten adecuadamente y causen contaminación. La contaminación del agua afecta a las precipitaciones, a las aguas superficiales, a las subterráneas y como consecuencia degrada los ecosistemas naturales (Disponible en <http://es.Wikipedia.org/wiki/agua>).

Las aguas de origen industrial varían su contenido físico-químico en buena medida de acuerdo con el tipo de industria que se trate. En general presenta el problema de la acidez y la alcalinidad, alta temperatura, grandes niveles de grasa y aceites, metales pesados, una gran

demanda química de oxígeno (DQO) para la oxidación de materia química, sólidos disueltos y suspendidos. De ahí que los métodos para tratar este tipo de agua sean muy diversos y se investigue constantemente para desarrollar formas más avanzadas. Los métodos van dirigidos especialmente al menor consumo de energía y productos químicos, así como al ahorro de espacios en las instalaciones, además de minimizar el impacto ambiental de los residuales y su disposición en cuerpos de agua, cursos naturales, capas freáticas (infiltración) o para su posterior uso en riegos agrícolas u otros usos (Hernández, 1998).

Los cuerpos receptores más sensible a esta contaminación son los ecosistemas acuáticos, es decir, ríos, mares, lagos, aguas subterráneas, entre otros.

Desde la Conferencia de Mar del Plata celebrada en 1977 hasta la Cumbre de Desarrollo Sostenible de Johannesburgo en 2002, los temas del agua han sido motivo de profundas reflexiones por parte de los representantes de las agencias especializadas, de la comunidad científica internacional y de autoridades gubernamentales de todas las latitudes (ECURED 2011).

El hombre está en el deber de cuidar y evitar toda contaminación sobre este preciado líquido. Con vistas a mejorar esta situación se aplican tecnologías con el fin de purificar corrientes de desechos industriales.

Muchos contaminantes tienen estructuras similares a las presentes en compuestos naturales y es por ello que son fácilmente degradados por los microorganismos del suelo y del agua. Sin embargo, existen otros compuestos con estructuras o sustituyentes más complejos de origen xenobiótico, que son difícilmente catabolizados (compuestos recalcitrantes, dado que se acumulan y persisten en la naturaleza) (Altamirano, 1999).

La recuperación de estos sistemas contaminados puede ser tratada con diferentes métodos que pueden ser físicos, químicos y biológicos. Los tratamientos físicos y químicos son los más costosos, mientras que la remediación biológica o la biorremediación se presenta como una técnica de recuperación más barata, comparada con los anteriores. Estas técnicas utilizan microorganismos presentes en el propio medio o enzimas para realizar la tarea de la depuración de las aguas contaminadas (Parrish et. al., 1980)

La biodegradación es el proceso natural por el cual los microorganismos degradan o alteran moléculas orgánicas transformándolas en moléculas más pequeñas y no tóxicas. (<http://www.argenbio.org//adcuploads/pdf/biorremediacion>).

2.2. Métodos utilizados para la remediación del agua

Los procesos de remediación que se conocen en la actualidad son: oxidación; precipitación, coagulación y ablandamiento con cal; ósmosis inversa; microfiltración; nanofiltración; adsorción, tratamientos biológicos y fitoremediación; electrodiálisis y electrocinética, entre otros (Arman, 1992; Fetter, 1993; Konstantinos *et al.*, 2006). Algunas de estas técnicas son más tradicionales y utilizadas que otras. Si bien continuamente se proponen nuevos métodos o mejoras, cada proceso presenta ventajas y desventajas según las condiciones locales lo que no asegura un resultado técnico-económico-ambiental adecuado en todos los casos. En el caso del tratamiento de aguas contaminadas con compuestos fenólicos, los métodos químicos más utilizados son los procesos de ozonación y Fenton; obteniéndose buenos resultados. Sin embargo, una de las desventajas fundamentales está asociada a la alta cantidad de hierro requerido, superior a los 50 ppm, usualmente superiores a los límites legalmente permitidos. Por tal motivo, es necesario llevar a cabo etapas de separación sucesivas las cuales traen consigo cambios ambientales adicionales (Martins y Quinta-Ferreira, 2011). Por lo tanto, la búsqueda de técnicas de biorremediación “más limpias” ha incrementado el trabajo con microorganismos y/o biocatalizadores que minimicen los efectos ambientales secundarios.

En los procesos de biorremediación se emplean generalmente mezclas de microorganismos (<http://www.argenbio.org//adcuploads/pdf/biorremediacion>).

Dentro de los métodos biológicos podemos citar la biorremediación aeróbica, biorremediación anaeróbica y procesos enzimáticos. La biorremediación aeróbica es aplicable a contaminantes biodegradables por microorganismos aeróbicos (bioxidación). Requiere de un control de variables que condicionan la biodegradación, así como el monitoreo y control de subproductos que pueden ser más tóxicos que los originales.

La biorremediación anaeróbica es aplicable a contaminantes biodegradables por microorganismos en condiciones anaeróbicas. Es aplicable a compuestos organo-halogenados, requiere un control de variables que condicionan la biodegradación y tiempos prolongados para completar la biodegradación en condiciones aeróbicas (Wang, J., Liu, X. D., Lu, J., 2012).

La remediación con procesos enzimáticos consiste en el empleo de enzimas en el sitio contaminado, con el fin de degradar las sustancias nocivas. Es aplicable a contaminantes biodegradables orgánicos, con productos enzimáticos que requieren de una estabilidad (ITGE, 1995; Whiteley y Lee, 2006).

Existen contaminantes difíciles de degradar, y para los cuales no se han encontrado microorganismos capaces de transformarlos. La biotecnología moderna puede solucionar en parte este problema, generando organismos genéticamente modificados con nuevas capacidades para eliminar tales contaminantes. La base de esta estrategia se basa en la búsqueda de las enzimas adecuadas (<http://www.argenbio.org//adcuploads/pdf/biorremediacion>).

A pesar de esta clara ventaja, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Actualmente es importante dirigir los esfuerzos a la obtención de sistemas con nuevas o mejores características que le permitan ser activas en condiciones drásticas de pH, temperatura o en presencia de solventes orgánicos. Por tal motivo, es necesario desarrollar nuevas metodologías para lograr la estabilidad de las enzimas que permitan la obtención de sistemas de reacción de larga vida y bajo costo, lo cual será determinado por las propiedades físico-químicas de estos sistemas (Taylor, 1991).

Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable (Sheldon y Schoevaart, 2005).

2.3. Enzimas inmovilizadas. Tipos de inmovilización.

Las enzimas inmovilizadas se han utilizados en muchos procesos. Su inmovilización es un posible camino para solucionar o minimizar muchos de estos problemas en el uso de las enzimas. Las enzimas inmovilizadas o biocatalizadores en fase sólida, se pueden definir como enzimas físicamente confinadas o que han sido fijadas a un soporte con retención de sus actividades catalíticas, y que pueden ser usadas en forma continua y repetitiva (Trevan, 1980; Hartmeier, 1988; Katchalski-Katzir, 1993).

Además de la estabilidad, otras propiedades que caracterizan a las enzimas tales como la selectividad, tolerancia a concentraciones altas de sustrato y producto, parámetros cinéticos, pH y temperatura óptimas, pueden ser significativamente alteradas dependiendo del método de inmovilización utilizado (Trevan, 1980).

El primer uso a nivel industrial de una enzima inmovilizada data de 1967 en Japón, cuando se dio a conocer la aplicación de L-aminoacilasa inmovilizada en DEAE-Sephadex para la resolución de mezclas racémicas de D/L-acetil-aminoácidos obtenidas por síntesis (Chibata et al, 1991). Otras aplicaciones industriales importantes de las enzimas inmovilizadas se relacionan con la producción o transformación de azúcares, y de productos farmacéuticos (Tabla I) (Katchalski-Katzir, 1993). En algunos procesos industriales se han utilizado células microbianas enteras que contienen la enzima deseada, incluidas en geles. Además de sus aplicaciones en procesos industriales, las técnicas de inmovilización son la base en la producción de numerosos productos biotecnológicos con aplicaciones en diagnóstico, cromatografía de bioafinidad y biosensores.

Tabla I. Ejemplos de procesos industriales de alto volumen que emplean enzimas inmovilizadas. (Adaptado de Illanes, 1994; Katchalski-Katzir, 1993).

Proceso	Enzima / Origen	Soporte
Producción de jarabes de fructosa a partir de glucosa	Glucosa isomerasa (<i>Streptomyces sp.</i> , <i>Arthrobacter sp.</i>)	Vidrio poroso, proteína entrecruzada
Producción de ácido amino penicilánico	Penicilina amidasa (<i>Escherichia coli</i> , <i>B. megaterium</i>)	Bentonita entrecruzada
Resolución de mezclas racémicas de aminoácidos a forma L, biológicamente activa	L-Amino-acilasa (<i>Aspergillus oryzae</i>)	DEAE-Sephadex
Producción de leches y lactosueros delactosados para usos alimentarios y productos dietéticos	Lactasa (α -Galactosidasa) (<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>)	Fibras de acetato de celulosa, vidrio de poro controlado

Como **ventajas** del empleo de enzimas inmovilizadas podemos destacar:

1. El aumento de la estabilidad de la enzima.
2. La posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso.
3. La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada.

Los diferentes tipos de reactores enzimáticos aparecen en la Figura 3. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir el reciclado, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza.

Los principales **inconvenientes** del proceso de inmovilización son:

1. La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
2. La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
3. Siempre suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la movilización.
4. El biocatalizador es más caro que la enzima nativa (Arroyo, 1998; Kennedy y Cabral, 1983).

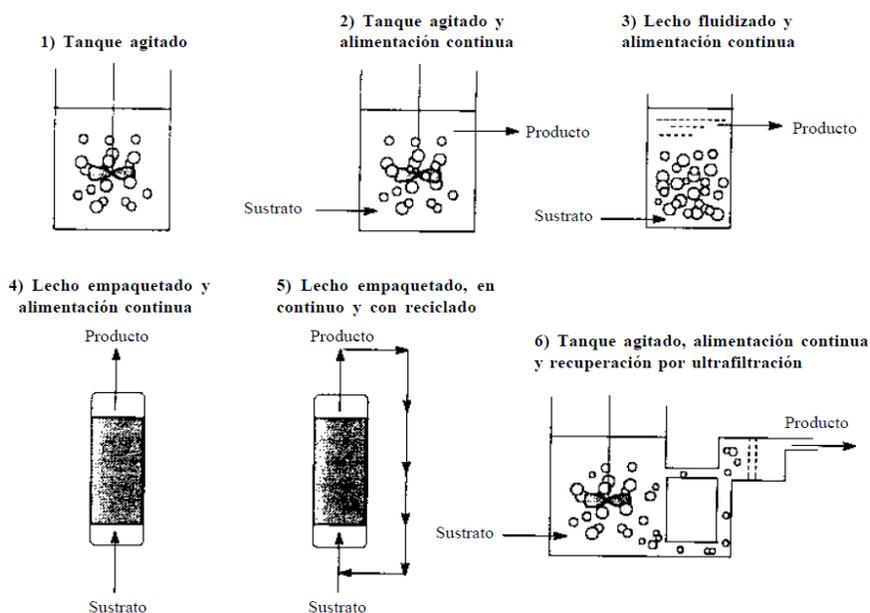


Figura 3. Reactores enzimáticos que utilizan enzimas inmovilizadas.

Estas desventajas se deben a que existen varios factores que influyen sobre la velocidad de la reacción, la actividad catalítica y la especificidad de una enzima, tales como: el pH, la temperatura, la fuerza iónica, presencia de inhibidores (competitivos y no competitivos); afectando de esta forma la actividad de las enzimas.

Los métodos de inmovilización se pueden clasificar en dos grandes categorías: Retención física y Unión química (Arroyo, 1998). Los métodos basados en la retención física pueden dividirse en: atrapamiento (en capa o en fibra) e inclusión en membranas (microencapsulación, reactores de membrana). Por su parte, la unión química puede ocurrir mediante la unión a diferentes soportes, ya sea mediante adsorción o unión covalente o formación de un reticulado, el cual puede ser puro o co-reticulado (Cao et. al., 2005). Todas estas metodologías tienen sus ventajas y desventajas, lo cual determina el método de inmovilización seleccionado para cada enzima diferente. Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosas enzimas, se reconoce que no existe un método universal válido para todas las enzimas en todos los casos. No obstante, gracias a toda la información disponible en la actualidad, se pueden hacer generalizaciones sobre cada método de inmovilización y así, podremos seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica (Working Party on Immobilized Biocatalysts, 1983).

Los biocatalizadores con gran actividad volumétrica y productividad catalítica pueden ser obtenidos por un entrecruzamiento simple de las enzimas.

La técnica de entrecruzamiento de proteínas, utilizando un reactivo bifuncional como el glutaraldehído, fue inicialmente desarrollado por Doscher en 1960. (Doscher, 1960). Sin embargo, este método de producción de enzimas entrecruzadas (CLEs) tiene diversas limitaciones como: son baja retención de la actividad del biocatalizador, baja estabilidad mecánica y dificultades en la manipulación de inmovilizados gelatinosos. A principios de 1990 el entrecruzamiento de cristales de enzimas (CLECs), obtenidos por entrecruzamiento de enzimas cristalinas, mostraron una excelente actividad y estabilidad operacional en una variedad de biotransformaciones (Sheldon et. al., 2007). Sin embargo, la mayor limitación de los CLECs es la alta pureza necesaria para la cristalización de la enzima, lo cual se traduce en un alto precio del inmovilizado.

Por su parte, la obtención de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs), por precipitación de la enzima disuelta en una solución tampón y entrecruzamiento del agregado físico obtenido con glutaraldehído, por ejemplo, fue exitoso. Este método permite obtener inmovilizados de alta eficiencia con preparaciones de la enzima cruda, ya que la etapa de precipitación es una de las utilizadas en la purificación de proteínas, y la preparación de estos CLEAs combina la purificación e inmovilización en una operación simple. Esta combinación le da un excelente manejo operacional, facilidad de preparación y relativamente precio bajo. La metodología de los CLEAs es aplicable a una gran variedad de enzimas como las hidrolasas, liasas y oxidoreductoras (como la lacasa) (Sheldon et. al., 2007; Lopez-Serrano et. al., 2002). Las lacasas son ampliamente utilizadas en diferentes procesos industriales, en síntesis orgánica, así como en procesos de remediación; por lo cual ha generado un gran interés en el desarrollo de métodos eficaces para su inmovilización (Cabana et. al., 2011).

2.4. La Lacasa como enzima modelo.

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas del tipo fenol-oxidasa dependiente de cobre, que tienen la capacidad de catalizar reacciones de oxidación de sustratos ricos electrónicamente, como los fenoles. Este es un paso importante en la biodegradación de polímeros que contengan grupos aromáticos fenólicos (Trejo y col., 2002).

Estas enzimas presentan baja especificidad de sustrato por lo que son capaces de catalizar un gran número de reacciones oxidativas. Esta versatilidad catalítica hace que estas enzimas tengan un gran potencial biotecnológico para su aplicación en procesos de biorremediación y síntesis de nuevos productos, entre otros.

La lacasa ha sido objeto de investigación en las últimas décadas, debido a su habilidad de oxidación de compuestos relacionados con la lignina, tanto fenólicos como no fenólicos, así como los contaminantes medioambientales altamente agresivos. Todo ello la hace muy utilizada en varios procesos biotecnológicos (Aaslyng, Rorbaek, Sorensen, 1996).

Diversos estudios han revelado que las lacasas degradan colorantes provenientes de la industria textil, los cuales son xenobióticos y recalcitrantes (Palmieri et. al., 1977; Jaouani et. al., 2005).

2.4.1. Aplicaciones de la lacasa en la industria

Su uso incluye el saneamiento de las emanaciones industriales, fundamentalmente de las industrias de la pulpa y el papel, la textil y la petroquímica, es utilizada como medio diagnóstico y como agente biorremediador para la desinfección de pesticidas y explosivos en el suelo. La enzima lacasa es también usada como purificadora de aguas en algunos sistemas, como catalizador en la producción de medicamentos anticancerígenos y como ingrediente en algunos cosméticos. Además, su capacidad para remover sustancias xenobióticas, en la biorremediación o mejoramiento biológico la hacen un producto muy usado.

En los procesos de estilización final de los jeans de mezclilla (Denim, tela teñida con índigo), en el blanqueo de la fibra de algodón y la reducción de colorantes textiles se han utilizado sustancias químicas cloradas para el proceso de desteñido. Estas sustancias además de ser contaminantes y dañinas para la salud, tienden a maltratar las telas, por lo que su uso se ha limitado (Abadulla, 2000; Blanques, 2004; Hou, 2004). Desde 1996, la empresa Novoenzyme utiliza como alternativa biotecnológica, enzimas lacasas en el desteñido de la mezclilla (producto comercial DeniLite). Debido a esta propiedad, la lacasa es utilizada en la oxidación del índigo (colorante de tipo fenólico) en la preparación de telas para jeans. La aplicación de enzimas en la industria textil permite obtener un proceso de desteñido eficiente, sustentable y no contaminante para el medio ambiente. (Rodríguez Susana y Toca- Herrera, 2006).

La estabilidad de las lacasas usualmente se encuentran también en pH ácidos, aunque existen excepciones (Baldrian, 2006).

En la industria alimentaria las lacasas se utilizan para mejorar la estabilidad y propiedades organolépticas de zumos de frutas, vino y cerveza. La oxidación enzimática de compuestos fenólicos en las bebidas elimina la turbidez de éstas y produce mejoras en el color, el aroma y el sabor. Además, el uso de lacasas en panadería influye en la calidad de la masa del pan (Minussi et al., 2002).

Las lacasas tienen aplicaciones en la industria de la pulpa y el papel, en el tratamiento de aguas contaminadas y en la industria textil, donde el principal problema ambiental que tiene el sector textil radica en las aguas residuales que genera, y en las cargas químicas que las mismas contienen (ECURED 2011).

Las legislaciones gubernamentales en los países desarrollados se han convertido en más y más severas en la industria textil debido a los efluentes, porque algunos de los tintes son hechos con sustancias cancerígenas (Baugman y Perenich, 1988).

2.4.2. Inmovilización de lacasa. Utilización en la biorremediación.

Los problemas ambientales relacionados con las aguas residuales de las industrias se han convertido en un problema muy complejo con el incremento de la diversidad de productos utilizados. Los colorantes textiles son ampliamente utilizados en las actividades de teñido por su capacidad de unirse a las fibras textiles por formación de enlaces covalentes. Por tal motivo, la industria textil constituye hoy una de los mayores procesos contaminantes ya que el 4% de estos colorantes son vertidos al ambiente, en su mayoría disueltos en las aguas residuales (Peralta-Zamora et. al., 2003). Los colorantes textiles tienen gran persistencia en el ambiente, y los métodos de eliminación clásicos no son útiles debido a que oxidaciones o reducciones parciales pueden generar productos secundarios altamente tóxicos. Una gran proporción de los colorantes no son directamente tóxicos para los organismos vivos; sin embargo, la fuerte coloración que imparten a los medios de descarga puede llegar a suprimir los procesos fotosintéticos en los cursos de agua, por lo que su presencia debe ser controlada (O'Neill et. al., 1999).

La lacasa es una de las enzimas oxidativas que más se perfila con mayor potencial en esta área (Gianfrenda, Xu, Bollag, 1999).

Recientes investigaciones han informado la degradación de varios colorantes reactivos por las lacasas, seguido tanto por un proceso de decoloración (degradación de grupos cromogénicos) o por la desaparición del producto, utilizando técnicas espectrofotométricas o cromatográficas (Chivukuka y Renganathan, 1995).

La lacasa de *Coriolopsis gallica* fue inmovilizada sobre agarosa activada y se analizó la decoloración repetitiva de colorantes industriales. La lacasa inmovilizada retuvo el 85% de su actividad inicial después de 10 ciclos y, el 70% de la misma después de tres meses de uso intermitente en la decoloración del colorante Azul 198 (Reyes et. al., 1999).

En este sentido, Peralta-Zamora et. al. (2003) informaron la inmovilización de lacasa de *Trametes versicolor* sobre varios soportes. Estos biocatalizadores inmovilizados fueron utilizados en la decoloración de varios colorantes reactivos textiles, entre los que se

encuentran: Remazol Azul Brillante R, Remazol Negro B, Amarillo Reactivo 122 y Rojo Reactivo 251. Las enzimas inmovilizadas mostraron una alta eficiencia de decoloración frente a las soluciones acuosas de estos colorantes.

La lacasa de *Trametes versicolor* fue inmovilizada por atrapamiento en tres redes poliméricas por semi-interpenetración y fue utilizada en la decoloración del colorante Amarillo Ácido 52. La enzima inmovilizada decoloró el colorante a las 6h de incubación, observándose más de un 50% de decoloración. La adición de un mediador incrementó estos valores por encima del 73% (Yamak et. al., 2009).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materiales y Reactivos.

Los principales reactivos y materiales empleados en el presente trabajo fueron adquiridos de las siguientes fuentes:

- Sigma- Aldrich (San Luis, MO): Lacasa de *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2), 2,2-azino-bis-(3-etilbencenotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), Borohidruro de Sodio (NaBH_4), Glutaraldehido 25%, Reactivo de Bradford.

Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico y provenían de las mismas fuentes citadas salvo excepciones señaladas en el texto.

3.2. Equipos empleados

- pH-metro de precisión Metrohm E-510 (Alemania). Utilizado en la preparación de las soluciones reguladoras de pH. Fue calibrado con disoluciones reguladoras de pH 4.00 y 7.00 a 25.0 ± 0.5 °C.
- Espectrofotómetro Ultrospec 2100 UV/VIS – Pharmacia Biotech (Suecia). Utilizado en las determinaciones espectrofotométricas. Los datos fueron compilados usando el software Swift II.
- Balanza analítica (Sartorius)
- Baño termostataado
- Zaranda
- Agitadores magnéticos

3.3. Determinación de las condiciones óptimas para la formación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs) de lacasa de *Trametes versicolor*.

3.3.1. Determinación de la concentración óptima del agente precipitante.

Para la preparación del biocatalizador de lacasa fue necesario la determinación de la concentración óptima del agente precipitante. En este trabajo se utilizó el sulfato de amonio por ser una sal soluble en agua. Se realizó la precipitación a diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en un intervalo del 40%-80% de saturación. Seis mg de enzima fueron disueltos en 1 mL de solución tampón de fosfato de sodio 0.1 mol/L, pH 7.0 y se añadieron lentamente, con

agitación magnética, diferentes cantidades de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta alcanzar el porcentaje de saturación requerido para la precipitación de la enzima (Cao et. al., 2000). La mezcla se agitó lentamente durante 2h a 4°C y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm. Se separó el sobrenadante del precipitado, este último se resuspendió en 2 mL de fosfato de sodio 0.1 mol/L, pH 7.0 y se conservó a 4°C para su posterior determinación de la concentración de proteína y la actividad enzimática.

3.3.2. Preparación de los CLEAs a las concentraciones óptimas de agente precipitante.

Doce mg de lacasa (6 mg/mL) fueron disueltos en 2 mL de solución tampón de fosfato de sodio 0.1 mol/L, pH 7.0. Se añadieron lentamente y con agitación 0.78g (60%), 0.94g (70%) y 1.12g (80%) de sulfato de amonio hasta alcanzar los diferentes grados de saturación. La mezcla se agitó lentamente a 4°C durante 2h. Se añadió 1 mL de glutaraldehído al 25% para lograr el entrecruzamiento de la enzima precipitada y se agitó nuevamente durante 2h a 4°C (Cao et. al., 2000). Posteriormente se centrifugó la solución a 3000 rpm, se separó el sobrenadante del precipitado, este último se resuspendió en 2 mL de fosfato de sodio 0.1 mol/L, pH 7.0 y se conservó a 4°C para su posterior determinación de la concentración de proteína y la actividad enzimática.

3.3.3. Determinación de la concentración óptima del agente entrecruzante.

Los CLEAs fueron preparados disolviendo 6 mg de lacasa en 1 mL de solución tampón de fosfato de sodio 0.1 mol/L, pH 7.0. Se añadieron a la solución, lentamente y con agitación, 0.47g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La mezcla se agitó lentamente a 4°C durante 2h. Se añadieron diferentes volúmenes de glutaraldehído al 25%, para obtener las concentraciones finales deseadas.

Muestra	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
c (final glutaraldehído) (%)	0.2	0.5	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
Volumen añadido (solución al 25%)	8 μL	20 μL	40 μL	48 μL	56 μL	64 μL	72 μL	80 μL

La mezcla se agitó durante 2h a 4°C. Para reducir el exceso de glutaraldehído en la reacción se añadieron 100 µL de una solución stock de NaBH₄ (10 mg/mL) (concentración final en la mezcla de reacción: 1mg/mL) y se agitó por 30 min. (Matijošytė, 2010). Posteriormente se centrifugó la solución a 3000 rpm, se separó el sobrenadante del precipitado, este último se resuspendió en 2 mL de fosfato de sodio 0.1 mol/L, pH 7.0 y se conservó a 4°C para su posterior determinación de la concentración de proteína y la actividad enzimática.

3.3.4. Determinación de la concentración óptima de la enzima.

Con el objetivo de determinar si a menores concentraciones de la enzima se podían obtener inmovilizados estables y de alto rendimiento, se evaluaron diferentes concentraciones de lacasa en la reacción. Los CLEAs fueron preparados a concentraciones de: 1, 2, 3, 4 y 5 mg/mL de enzima disueltos en 1 mL de solución tampón de fosfato de sodio 0.1 mol/L, pH 7.0. Se añadieron a la solución, lentamente y con agitación, 0.47g de (NH₄)₂SO₄. La mezcla se agitó lentamente a 4°C durante 2h. Se añadieron 48 µL de glutaraldehído al 25%, la mezcla se agitó durante 2h a 4°C. Posteriormente se añadieron 100 µL de una solución stock de NaBH₄ (10 mg/mL) (concentración final en la mezcla de reacción: 1mg/mL) y se agitó por 30 min. (Matijošytė, 2010). La solución se centrifugó a 3000 rpm, se separó el sobrenadante del precipitado, este último se resuspendió en 2 mL de fosfato de sodio 0.1 mol/L, pH 7.0 y se conservó a 4°C para su posterior determinación de la concentración de proteína y la actividad enzimática.

3.4. Inmovilización de lacasa de *Trametes versicolor* por formación de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs).

El biocatalizador de lacasa fue preparado siguiendo la metodología descrita en 3.3.4, tomando como base las concentraciones óptimas de enzima, agente precipitante y agente entrecruzante. La actividad enzimática del CLEA se expresó como porcentaje de actividad residual y se determinó por la ecuación (1) (Wang et. al., 2011):

$$\text{Actividad Residual (\%)} = \frac{\text{Actividad Total del CLEA (U)}}{\text{Actividad Total de la Enzima libre usada para formar el CLEA (U)}} \times 100 \quad (1)$$

De igual forma, la eficiencia del proceso de inmovilización, en términos de proteína, se expresó en porciento y se determinó por la ecuación (2):

$$\text{Eficiencia de la Inmovilización (\%)} = \frac{\text{Proteína Retenida en el CLEA (Proteína inicial - Proteína del sobrenadante)}}{\text{Proteína Inicial}} \times 100 \quad (2)$$

3.5. Caracterización de los CLEAs de lacasa de *Trametes versicolor* (Lac-CLEA).

3.5.1. Determinación de la concentración de proteínas.

La proteína se determinó por el método de Bradford (1973). Se adicionaron 200 μL de muestra y 800 μL del reactivo de Bradford. La solución se agitó y después de 5 minutos en reposo, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteína en las muestras se determinó extrapolando los valores de absorbancia a una curva estándar de albúmina sérica bovina.

3.5.2. Determinación de la actividad enzimática.

La actividad de lacasa y el CLEA se determinó por espectrofotometría usando ABTS (2,2'-azino-bis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) 0.5 mmol/L en solución tampón de acetato de sodio 1mol/L, pH 5.0. Se midió el incremento en la absorbancia a 420 nm y la actividad fue calculada a partir del coeficiente de extinción molar (ϵ) de 36,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática de lacasa se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de ABTS/mL/min, bajo las condiciones de ensayo.

3.5.3. Determinación de la temperatura óptima.

La actividad enzimática de la enzima nativa e inmovilizada (dilución final en el ensayo: 1/10) fue determinada a diferentes temperaturas en el intervalo de 30°C a 70°C (diferencia de 10°C entre cada una). El ensayo de actividad enzimática se realizó como se describió en 3.5.2.

3.5.4. Determinación del pH óptimo.

El efecto del pH sobre la actividad catalítica de las preparaciones enzimáticas (dilución final en el ensayo: 1/10) fue determinado a 25°C frente a ABTS, y se efectuaron las reacciones de

hidrólisis en las siguientes soluciones: citrato-fosfato de sodio 0.1 mol/L (pH 2.0-7.0), Tris-HCl 0.1 mol/L (pH 8.0-9.0) y Glicina-KOH 0.1 mol/L (pH 10-12.0), con una diferencia de 1 unidad en el valor de pH. El tiempo de duración del ensayo de actividad fue de 2.5 minutos.

3.5.5. Determinación de las constantes catalíticas.

Se realizaron curvas de progreso a diferentes concentraciones de sustrato (0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2.0 mM y 5 mM) a pH y temperatura óptimos. El ajuste de los datos al modelo de Michaelis-Menten, para determinar los parámetros cinéticos aparentes, se realizó mediante la minimización de la suma de errores cuadrados, del programa Excel. La determinación de las constantes catalíticas (K_m y $V_{m\acute{a}x.}$) se realizaron utilizando el Método de Eadie-Hofstee.

3.6. Determinación de la estabilidad funcional de las preparaciones enzimáticas.

3.6.1. Perfil de Termoestabilidad.

Tanto la enzima nativa como la inmovilizada (Lac-CLEA) fueron incubadas a diferentes temperaturas en el intervalo de 50°C a 70°C, con una diferencia de 10°C entre cada temperatura, en solución tampón de fosfato de sodio 1 mol/L, pH 7.0 (concentración final de las enzimas 50 µg/mL, correspondientes al 100% en los gráficos). Después de 10 min de incubación se tomaron alícuotas de 20 µL de estas soluciones, se diluyeron 10 veces en soluciones frías del tampón fosfato de sodio 1 mol/L, pH 7.0 y se evaluaron finalmente según su actividad enzimática (ver 3.5.2). Este ensayo fue realizado con un número de réplicas igual a 3, y se informan los valores como la media y la desviación estándar de estas determinaciones.

3.6.2. Estabilidad en presencia de agentes caotrópicos.

Para la determinación de la estabilidad de la enzima nativa e inmovilizada en presencia de agentes caotrópicos se utilizó la urea como desactivador de la actividad enzimática. La solución de urea 8 mol/L se preparó con solución tampón acetato de sodio 1 mol/L, pH 5.0. Se incubaron 50 µL de las preparaciones de la enzima inmovilizada y la libre en 450 µL de solución de urea, a temperatura ambiente. A diferentes intervalos de tiempos (0, 10, 20, 30, 50, 60, 90, 120 y 180 minutos) se tomaron alícuotas, se diluyeron 10 veces en solución tampón de actividad y se evaluaron finalmente según su actividad enzimática (ver 3.5.2). Este ensayo fue realizado con un número de réplicas igual a 3, y se informan los valores como la media y la desviación estándar de estas determinaciones.

3.6.3. Estabilidad en presencia de solventes orgánicos.

La enzima nativa y el CLEA de lacasa se incubaron con soluciones de diferentes solventes orgánicos: etanol, metanol, acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 y 20% durante 24 horas a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se determinó la actividad residual de lacasa con ABTS 5 mM al pH y temperatura óptimos. Este ensayo fue realizado con un número de réplicas igual a 3, y se informan los valores como la media y la desviación estándar de estas determinaciones.

3.7. Decoloración de un tinte sintético (azul índigo).

El azul índigo carmín se disolvió en solución tampón de acetato de sodio 1 mol/L, pH 5 a una concentración final de 20 mg/L. La lacasa inmovilizada por formación del CLEA fue adicionada a una concentración de 125 U/mL (unidades de actividad). Los experimentos se realizaron en tubos a un volumen total de 5 mL por duplicado. El control contenía la solución del tinte sin la enzima. Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente durante 24 h y el color se midió espectrofotométricamente a la máxima absorbancia del tinte (600nm) a diferentes intervalos de tiempo. La decoloración fue expresada en términos del porcentaje calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (3):

$$\text{Decoloración (\%)} = \frac{A_0 - A_t}{A_t} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

A_0 es la absorbancia a la λ_{max} del tinte medida inmediatamente después de la adición de la enzima

A_t es la absorbancia después de cada intervalo de tiempo.

3.8. Determinación de la reusabilidad de la enzima inmovilizada por formación de agregados entrecruzados (Lac-CLEA).

Se determinó la reutilización de la enzima inmovilizada, en régimen discontinuo (batch) y se mantuvo la enzima libre como control. El experimento se realizó en paralelo, se añadieron 400 μ L solución tampón de fosfato de sodio 1 mol/L, pH 7.0, 2.8 mL de agua destilada, 400 μ L de enzima (dilución 1/50) y 400 μ L de solución del sustrato ABTS. La mezcla de reacción se

centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Se separó el sobrenadante y se determinó su actividad enzimática en el tiempo a 420 nm. El precipitado se lavó con 2 mL de la solución tampón de actividad, se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. El sobrenadante fue desechado y al precipitado se le adicionaron 2 mL de solución tampón de actividad y se guardó a 4°C para su conservación. Este ensayo fue realizado con un ciclo de 12 veces y se le adicionó las soluciones antes expuestas, sin incluir la dilución de la enzima.

3.9. Procesamiento estadístico

Para el procesamiento de los datos se utilizó el Software Statgraph Plus Versión 5.1 para *Windows*, aplicando el modelo de análisis de varianza simple para comprobar si existían diferencias significativas entre las variables cuantitativas determinadas para las diferentes enzimáticas.

3.10. Valoración Económica.

Para realizar la valoración económica se tuvieron en cuenta las diferentes etapas de este trabajo y se determinaron las diferentes partidas de gastos. En este caso se tuvieron en cuenta los gastos por concepto de salario, gastos de energía eléctrica y de consumo de reactivos químicos.

I) GASTOS DE SALARIO:

Para determinar estos datos se utilizó la siguiente fórmula:

Para el trabajador técnico de laboratorio de la UMCC:

Salario mensual

_____ = costo de 1 día de trabajo

Días de trabajo del mes

II) GASTOS DE ENERGIA:

Para los gastos de energía se decidió tomar en cuenta el consumo de un día ya que es el tiempo que se demoraron en realizar dichos experimentos.

Gasto mensual

_____ = 1 día de trabajo /kw/día

Días laborables en el mes

III) GASTOS POR CONSUMO DE REACTIVOS QUÍMICOS.

Para realizar este cálculo se tuvo en cuenta el valor de los reactivos químicos empleados en la obtención de 1g del biocatalizador inmovilizado y el resto de los experimentos de caracterización y estabilidad realizados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Obtención del biocatalizador de lacasa de *Trametes versicolor* por formación de agregados entrecruzados (Lac-CLEA). Determinación de las condiciones óptimas.

La obtención de un biocatalizador de lacasa de *Trametes versicolor* a través de la formación de agregados enzimáticos entrecruzados se realizó en dos etapas:

1. Agregación de la enzima por acción de un agente precipitante.
2. Formación del CLEA por adición de un agente entrecruzante.

En la Figura 4 se muestra un esquema general de la formación del CLEA de lacasa de *Trametes versicolor*.

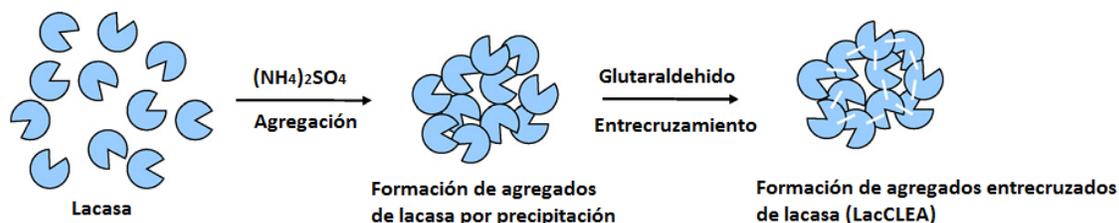


Figura 4. Obtención del biocatalizador de lacasa de *Trametes versicolor* por formación de agregados entrecruzados (Lac-CLEA).

Para la formación de agregados enzimáticos entrecruzados la etapa inicial consiste en la selección tanto del agente precipitante como del agente entrecruzante. Diversos son los compuestos utilizados en la etapa inicial para lograr la precipitación eficiente de la enzima sin que la actividad enzimática de la misma sea afectada. Entre estos compuestos podemos mencionar la adición de sales, solventes orgánicos o polímeros no iónicos muy usados en la purificación de proteínas (Matijošytė et. al., 2010).

El agregado físico formado por las moléculas proteicas consiste de estructuras supramoleculares, las cuales se mantienen unidas entre sí por la formación de enlaces no covalentes y por lo tanto, puede ser redisueltos fácilmente en agua. El

entrecruzamiento produce CLEAs insolubles, en el cual se mantienen tanto las propiedades estructurales como la actividad catalítica de la enzima. Teniendo en cuenta tanto las diferentes propiedades estructurales y bioquímicas de las proteínas, el mejor agente precipitante y entrecruzante puede variar de una enzima a otra.

La lacasa (E.C. 1.10.3.2) es una enzima altamente glicosidada, la cual posee 4 átomos de cobre en el centro activo. Para la realización de este trabajo se escogió la lacasa de *Trametes versicolor* por ser una enzima monomérica fácilmente comercializada, la cual posee en su estructura 5 residuos de lisina y 15 residuos de arginina los cuales constituyen sitios potenciales para el entrecruzamiento (Cabana et. al., 2011).

El primer paso realizado fue optimizar las condiciones para la obtención del CLEA de lacasa de *Trametes versicolor*.

El agente precipitante seleccionado fue el sulfato de amonio por ser una sal soluble en agua y poseer las propiedades de disolución de las enzimas a bajas concentraciones. Sin embargo, altas concentraciones de esta sal producen la precipitación de las enzimas sin que se afecte la actividad enzimática (Cao et. al., 2000). Para la determinación de la concentración óptima del agente precipitante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se realizó un análisis previo del comportamiento de la enzima a los diferentes porcentos de saturación. Para ello se realizó la precipitación de la enzima en un intervalo de saturación de sulfato de amonio entre el 40%-80%. A continuación, en la Tabla II se muestran los resultados obtenidos para la enzima precipitada (concentración de enzima utilizada: 6 mg/mL).

Tabla II. Determinación del comportamiento de la lacasa de *Trametes versicolor* a diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

c(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	c(proteína) (mg/mL)	Actividad Enzimática (U/mL)	Actividad Específica (U/mg)	Actividad Residual (%)
40	0.32	3.75	11.72	4.26
50	0.57	4.85	8.51	5.51
60	4.24	73.42	17.32	83.4
70	3.39	58.05	17.12	65.96
80	2.88	55.97	19.43	63.6

Como se puede observar, los mejores resultados se obtuvieron para la enzima precipitada en un intervalo de sulfato de amonio entre el 60%- 80% de saturación. Por tal motivo se decidió preparar los CLEAs de lacasa utilizando estas concentraciones de agente precipitante.

Para lograr la formación de los agregados entrecruzados se utilizó el glutaraldehído como agente entrecruzante. El glutaraldehído es un reactivo bifuncional poco costoso, fácilmente adquirible en el mercado. Sin embargo, no todas las enzimas muestran resultados óptimos al usar este reactivo como agente entrecruzante ya que el glutaraldehído es una molécula reactiva pequeña que puede penetrar en el interior de la estructura de la enzima, reaccionando con aminoácidos claves en la catálisis enzimática. En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos en la preparación de CLEAs de lacasa a diferentes concentraciones de (NH₄)₂SO₄ y a una concentración fija de glutaraldehído. Debemos señalar que los resultados que se observan en la Tabla III, para la formación de CLEAs se obtuvieron utilizando una concentración de glutaraldehído al 25%, según lo informado por Mateo et. al. en el 2003 (Mateo et.al., 2003).

Tabla III. Determinación de la concentración óptima de agente precipitante para la formación de CLEAs de lacasa de *Trametes versicolor*.

c (NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	Actividad Específica (U/mg)	Actividad Residual (%)	Eficiencia de Inmovilización (%)
60	0.92	1.12	38.3
70	0.76	1.46	67.1
80	0.23	0.99	97.3

Como se puede apreciar en la Tabla II los mejores valores de retención de la actividad enzimática para la enzima inmovilizada se obtuvieron para el 70% de saturación de sulfato de amonio. No obstante, debemos señalar que aunque la eficiencia del proceso de inmovilización fue superior para el CLEA obtenido al 80% el agregado entrecruzado obtenido para el 70% retuvo un porcentaje de actividad 1.47 veces superior, así como la cantidad de enzima retenida en el CLEA, la cual fue 3.3 veces superior.

Sin embargo, como se puede observar el agregado obtenido solo es capaz de retener el 1.46% de su actividad inicial. Teniendo en cuenta la alta concentración de agente entrecruzante utilizada (25%) se decidió realizar el estudio de la concentración óptima de glutaraldehído con el objetivo de incrementar la actividad retenida en el CLEA.

En la Figura 5 se muestra el comportamiento de la enzima inmovilizada a diferentes concentraciones de glutaraldehído.

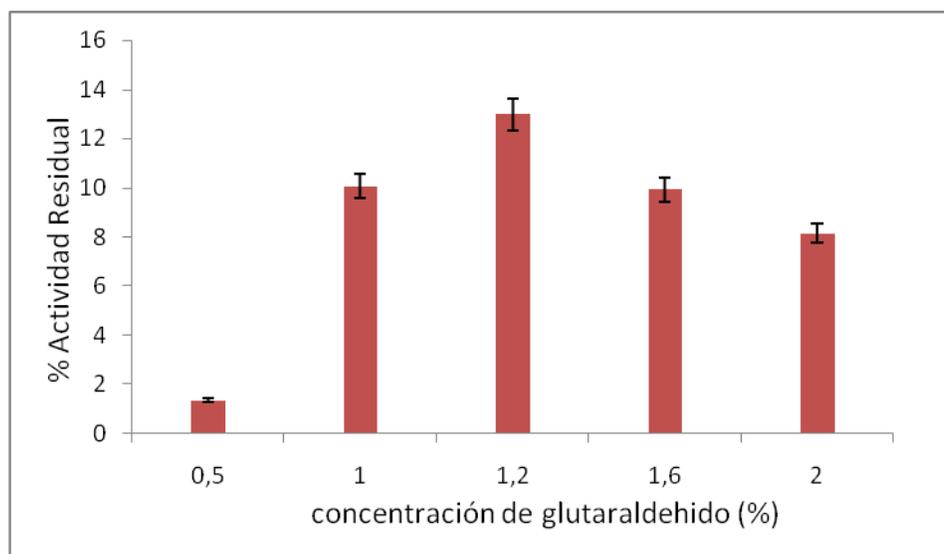


Figura 5. Determinación de la concentración óptima de agente entrecruzante para la formación de CLEAs de lacasa de *Trametes versicolor*.

Como se puede observar, los mejores resultados se obtuvieron para una concentración de agente entrecruzante igual al 1.2%. El CLEA de lacasa obtenido retuvo el 13% de su actividad inicial, por lo que fue seleccionada esta concentración de glutaraldehído como óptima. Los agregados obtenidos por encima del 2% no presentaron un incremento significativo en cuanto a retención de actividad enzimática (resultados no mostrados).

La preparación de los CLEAs de lacasa se realizó en todos los casos utilizando una concentración de proteína igual a 6 mg/mL, según lo informado por Cao et. al. en el 2000 (Cao, et. al., 2000). No obstante, decidimos probar concentraciones inferiores de enzima para determinar si a concentraciones inferiores de lacasa se podrían obtener agregados de mayor eficiencia y rentabilidad.

En la Tabla IV se muestran los resultados obtenidos en la formación de agregados entrecruzados a diferentes concentraciones de enzima.

Tabla IV. Determinación de la concentración óptima de enzima para la formación de CLEAs de lacasa de *Trametes versicolor*.

c (lacasa) (mg/mL)	Actividad Específica (U/mg)	Actividad Residual (%)	Eficiencia de Inmovilización (%)
1	0.7	0.53	67
3	2.68	8.04	88
5	2.25	8.9	69
6	2.81	13	67.2

Como se puede observar, para concentraciones inferiores de la enzima no se obtuvieron resultados superiores a los obtenidos previamente para una concentración igual a 6 mg/mL. Por lo tanto, se decidió tomar este valor como óptimo en la formación de CLEAs de lacasa.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se realizó la preparación del CLEA de lacasa, como se describió en la Sección 3.4 de Materiales y Métodos. En la Tabla V se muestran los valores obtenidos para la enzima libre e inmovilizada por la formación de CLEAs.

Tabla V. Formación de CLEAs de lacasa teniendo en cuenta los valores óptimos.

Muestra	Actividad Enzimática (U/mL)	Actividad Específica (U/mg)	Actividad Residual (%)	Eficiencia de Inmovilización (%)
Lacasa	88	17.12	-	-
CLEAs	43.3	8.45	49.2	85.5

Como se puede observar en la Tabla V, el agregado entrecruzado obtenido para la lacasa mostró un 49.2% de retención de su actividad inicial. De igual forma se obtuvo más de un 85% de eficiencia del proceso de inmovilización. Wang y colaboradores en el 2011 informaron la obtención de CLEAs de Penicilina acilasa G bajo condiciones de

trabajo similares a la utilizadas en nuestro trabajo, obteniendo un 49% de retención de la actividad residual después de la inmovilización (Wang, M. et. al., 2011).

A continuación se determinaron las condiciones óptimas de la catálisis enzimática (pH y temperatura) tanto para la enzima libre como inmovilizada. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de estas condiciones óptimas.

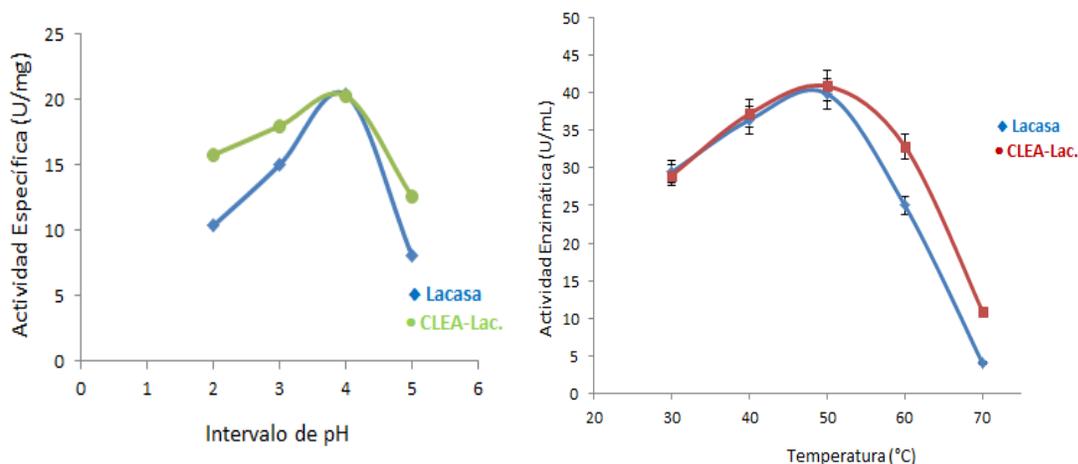


Figura 6. Determinación del pH óptimo y la temperatura óptima de la enzima nativa y el CLEA de lacasa de *Trametes versicolor*.

Como se puede observar la inmovilización de la enzima no trajo consigo cambios significativos en el valor óptimo del pH, el cual es de 4.0. No obstante, la enzima inmovilizada mostró una mayor estabilidad a valores de pH inferiores al óptimo.

Por otra parte, para la temperatura se puede apreciar que la enzima inmovilizada muestra una mayor estabilidad entre los 50°-60°C, mostrando un valor óptimo sobre los 50°C. De igual forma, para valores de temperatura superiores al óptimo los agregados entrecruzados mostraron un incremento de la estabilidad con respecto a su contraparte nativa.

Attanasio et. al. en el 2005 informaron la inmovilización de lacasa de *Trametes versicolor* en membranas de nylon funcionalizadas con glicidil metacrilato, para la obtención de un bioreactor no isotérmico utilizado en el tratamiento de las

aguas residuales del proceso de producción del aceite de oliva. La enzima inmovilizada mostró un corrimiento de su valor de pH óptimo a 5, incrementándose la estabilidad a valores de pH entre 3-5 (Attanasio, A. et. al., 2005).

En las Figuras 7 y 8 se muestra la determinación de las constantes catalíticas para la enzima libre e inmovilizada por la formación de agregados entrecruzados, por acción sobre un sustrato sintético (ABTS).

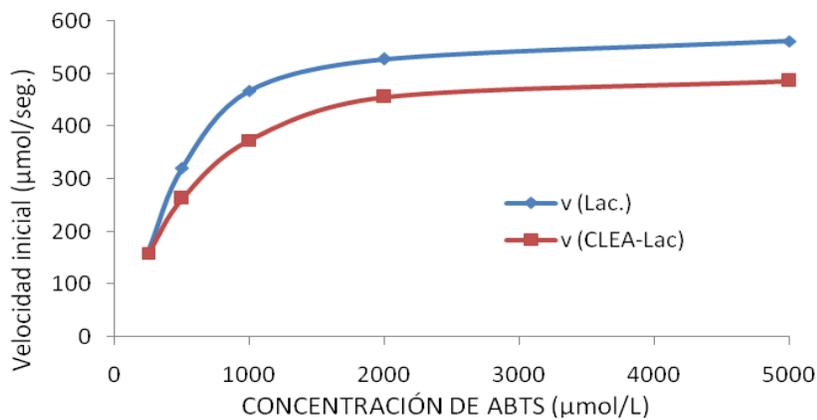
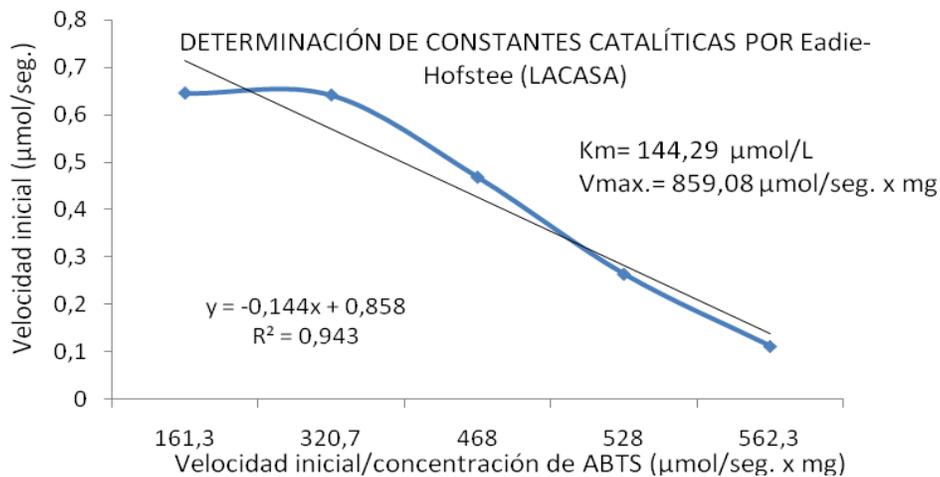


Figura 7. Representación de Michaelis-Menten para la velocidad inicial de la enzima nativa y el CLEA de lacasa de *Trametes versicolor*, a diferentes concentraciones de sustrato (Método de la Parábola).



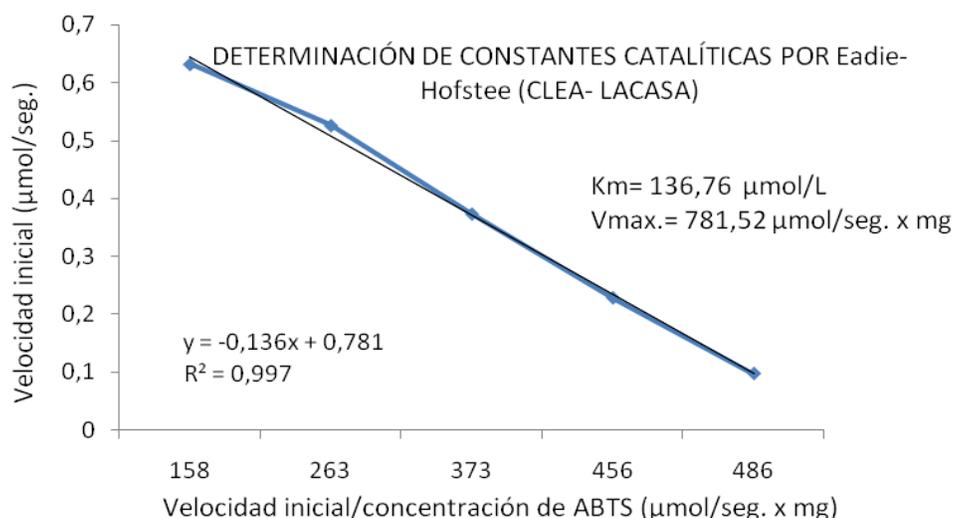


Figura 8. Representación de Eadie-Hofstee para la determinación de las constantes catalíticas de la enzima nativa y el CLEA de lacasa de *Trametes versicolor*, a diferentes concentraciones de sustrato.

Como se puede observar en las Figuras 7 y 8, la inmovilización de la enzima trajo consigo un incremento de la velocidad de reacción sobre el ABTS. De igual forma, la formación de agregados entrecruzados de lacasa mostró una disminución del valor de la K_m de 0.95 veces con respecto a su contraparte nativa, lo cual evidencia un incremento de la afinidad de la enzima inmovilizada por el sustrato.

Cabana et. al. en el 2007, informaron la formación de agregados enzimáticos entrecruzados de lacasa de *Coriolopsis polizona*, utilizando polietilenglicol como agente precipitante y glutaraldehído como agente entrecruzante. Los CLEAs de lacasa obtenidos mostraron una mayor afinidad de la enzima por el sustrato, evidenciado por la disminución del valor de la K_m en 0.89 veces (Cabana, H. et. al., 2007).

Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo fueron informados por Sangeetha y Abraham en el 2008 al preparar y caracterizar agregados entrecruzados de subtilisina. Para la enzima inmovilizada se obtuvo una reducción de su valor de la K_m de 0.47 veces con respecto a su contraparte nativa (Sangeetha, K. y Abraham, T. E., 2008).

4.2. Determinación de la estabilidad de la enzima inmovilizada.

La estabilidad de una enzima, como la de cualquier catalizador, es de vital importancia para su utilización en la industria. Teniendo en cuenta los planteamientos de Lumry-Eyring, la inactivación de una enzima ocurre al menos mediante dos fenómenos: el desplegamiento reversible de la estructura original de la enzima, seguida de varias etapas cinéticamente irreversibles; las cuales conllevan a cambios covalentes o agregación de la enzima.

Existen varios agentes que contribuyen a la ocurrencia de cambios en la configuración espacial de la enzima y su actividad, tales como: la temperatura, el pH, solventes orgánicos, agentes caotrópicos o cambios en la fuerza iónica del medio, entre otros.

La factibilidad de utilizar una enzima en la industria está dada por su estabilidad frente a la temperatura, valores extremos de pH, presencia de sales, álcalis o surfactantes.

Las mayores aplicaciones de las enzimas se encuentran en procesos que se llevan a cabo a altas temperaturas, entre -100°C - 90°C . Por tal motivo, constituye una necesidad la estabilización de la enzima frente a los procesos de termodesactivación (Iyer y Ananthanarayan, 2008).

En la Figura 9 se muestra el perfil de estabilidad térmica de la enzima libre e inmovilizada por la formación de CLEAs, en un intervalo de temperaturas entre 50°C - 70°C , en el tiempo.

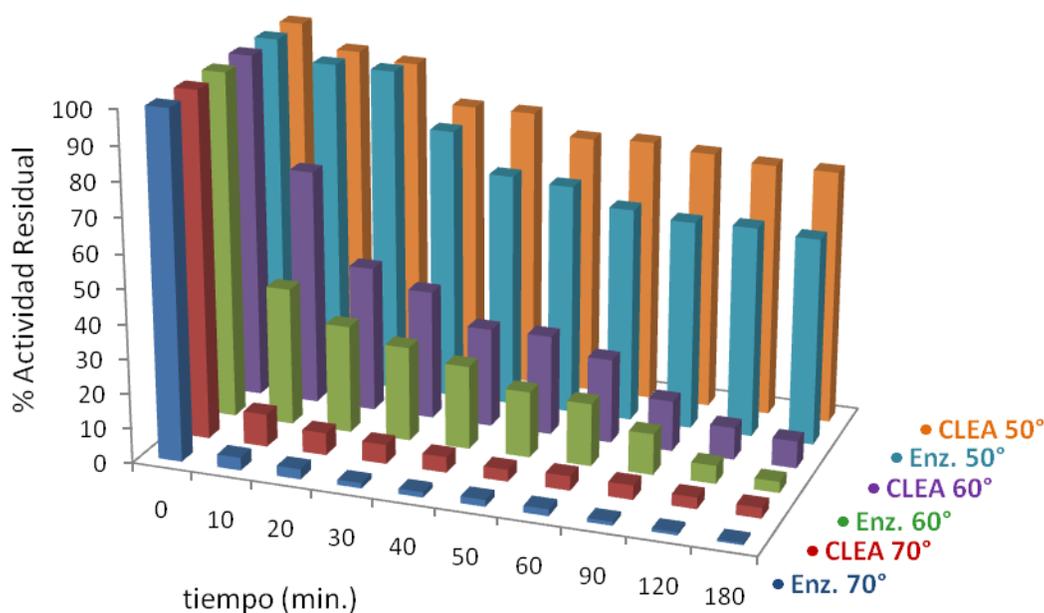


Figura 9. Determinación de la estabilidad térmica de la enzima nativa y el CLEA de lacasa de *Trametes versicolor* en el tiempo (Intervalo de temperaturas: 50°-70°C).

La estabilidad térmica de la enzima inmovilizada fue superior a su contraparte nativa, en el intervalo de temperaturas estudiadas, en el tiempo. Cuando la enzima se sometió a la acción de la temperatura (50°C) se observó que, la inmovilización por formación de agregados entrecruzados trajo consigo una retención de la actividad inicial superior al 80% después de 3h de incubación. Resultados similares en cuanto a la estabilidad se obtuvieron para 60°C, siendo 2.4 veces superior la retención de actividad de la enzima inmovilizada.

No obstante, debemos señalar que aunque a 70°C la enzima inmovilizada retiene solo el 10% de su actividad inicial a las 3h de incubación, su contraparte nativa pierde totalmente la actividad a las 2h.

El uso de altas temperaturas en diferentes procesos industriales está fundamentado en las ventajas que ofrece:

1. Incremento en la velocidad de los procesos (el aumento en la temperatura de reacción de 25°C a 75°C trae consigo un incremento de la velocidad de reacción en 100 veces).
2. Disminución de las limitaciones difusionales y la viscosidad del medio.
3. Disminución de la contaminación bacteriana.
4. Ajuste del equilibrio termodinámico, en caso de reacciones endotérmicas (Klibanov, A. M., 1983).

En este sentido, Sangeetha y Abraham en el 2008 informaron el incremento de la estabilidad térmica de la enzima subtilisina después de su inmovilización por formación de agregados entrecruzados. Los CLEAs obtenidos mostraron una mayor estabilidad en un intervalo de temperaturas entre 40°C-70°C, con respecto a su contraparte nativa, con una retención de su actividad enzimática por encima del 60% (Sangeetha, K. y Abraham, T. E., 2008).

Wang y colaboradores en el 2011 informaron la obtención de CLEAs de penicilina acilasa G por adición de azúcares como agentes estabilizantes, en el proceso de inmovilización. El estudio de la termoestabilidad de los CLEAs obtenidos mostró una retención de su actividad inicial 8.7 veces superior, con respecto a su contraparte nativa (Wang. et. al., 2011).

Este incremento en la estabilidad térmica mostrado por las enzimas inmovilizadas por formación de CLEAs puede estar debido a un ordenamiento de las moléculas por entrecruzamientos inter e intramolecular de los agregados incrementando la rigidez estructural de las moléculas de CLEAs y, por el incremento de interacciones iónicas e hidrofóbicas en la molécula formada (Sangeetha, K. y Abraham, T. E., 2008).

La urea constituye el agente hidrotópico más utilizado en la industria textil. En la Figura 10 se muestra el comportamiento de la estabilidad de la enzima nativa e inmovilizada en presencia de urea 8 mol/L, en el tiempo.

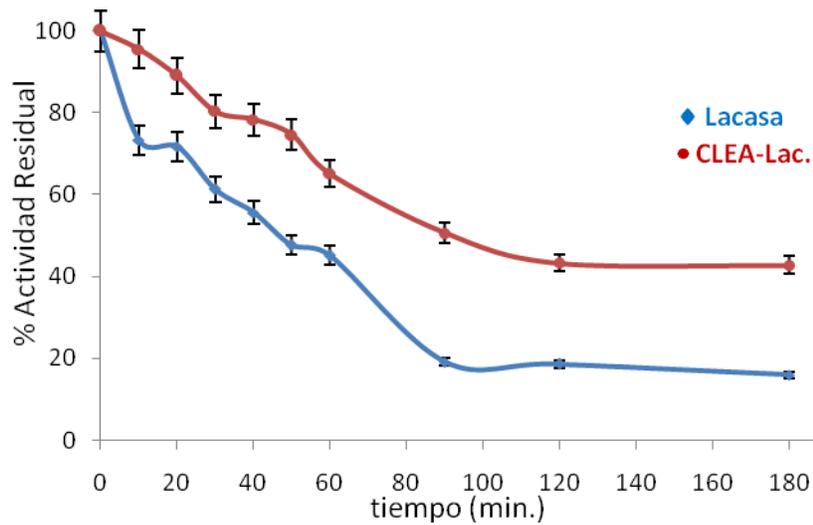


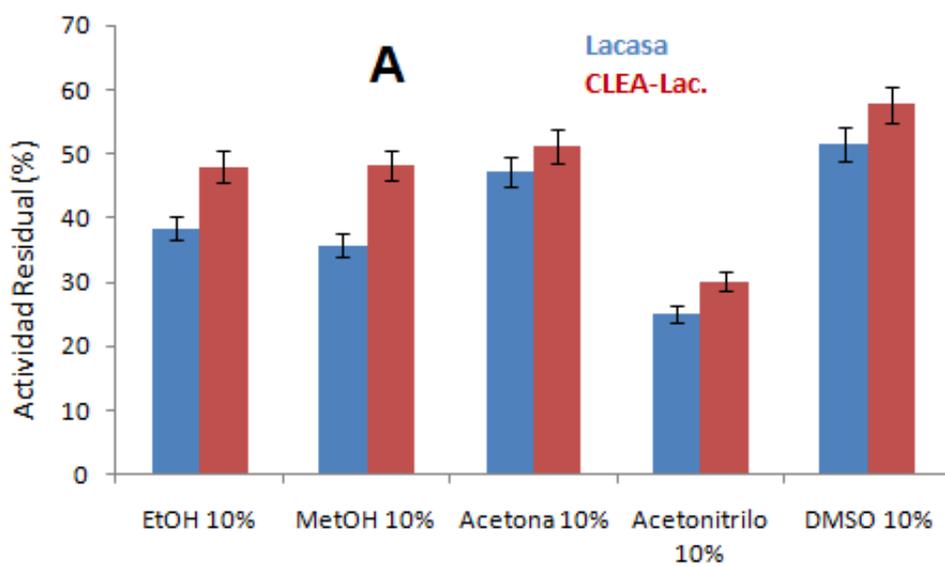
Figura 10. Determinación de la estabilidad de la enzima nativa y el CLEA de lacasa de *Trametes versicolor* en el tiempo, en presencia de urea 8 mol/L.

Como se puede observar, la inmovilización de la lacasa de *Trametes versicolor* por formación de agregados entrecruzados trajo consigo un incremento de la estabilidad en presencia de agentes caotrópicos, como la urea. Después de la incubación de este biocatalizador, la enzima retuvo más del 40% de su actividad inicial, mientras que su contraparte nativa retuvo menos del 20%.

El efecto de agentes denaturalizantes sobre la estabilidad de enzimas inmovilizadas fue estudiado por Tanksale et. al. en el 2001. La acción de la urea 4 mol/L sobre la proteasa alcalina de *Conidiobolus macrosporus*, inmovilizada en poliamidas arrojó un incremento en la estabilidad de más de un 47% con respecto a su forma libre. De igual forma, el incremento de la concentración de urea (8 mol/L) y la temperatura (50°C) mostró una inactivación de la enzima libre, mientras que la enzima inmovilizada retuvo más del 80% (Tanksale, A. et. al., 2001). Estos resultados demuestran un incremento en la preservación estructural de la enzima después de la inmovilización frente a agentes caotrópicos, evitando el desplegamiento de su estructura y por tanto, la pérdida de su actividad biológica.

La poca solubilidad en agua de algunos sustratos de lacasas ha incrementado el interés por el estudio de la estabilidad de esta enzima en medios de reacciones no convencionales. Es sabido que la presencia de solventes orgánicos en el medio puede afectar la estructura, estabilidad y actividad de estos biocatalizadores.

En la Figura 11 se muestra la estabilidad de la enzima nativa e inmovilizada por formación de agregados entrecruzados (CLEAs) de lacasa, frente a diferentes solventes orgánicos.



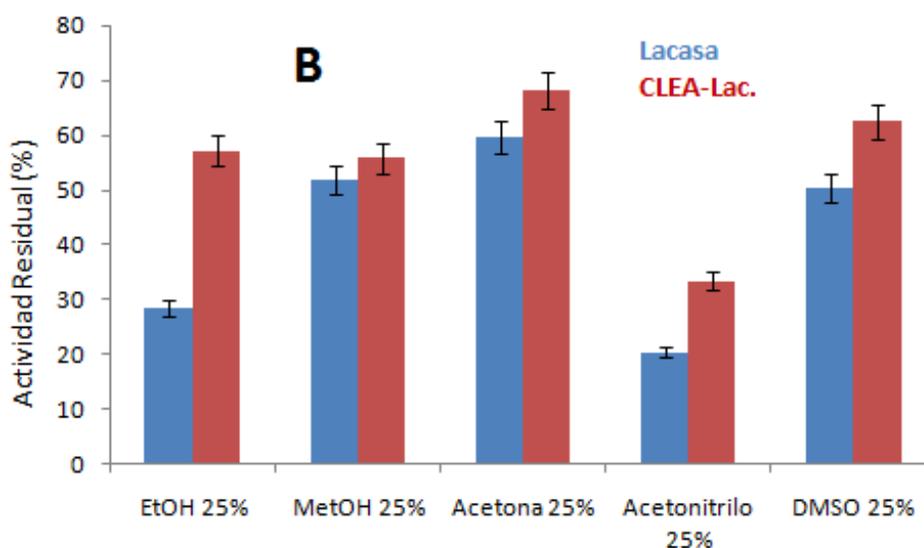


Figura 11. Determinación de la estabilidad frente a diferentes solventes orgánicos a diferentes concentraciones (A: 10%; B: 25%) de la enzima nativa y el CLEA de lacasa de *Trametes versicolor*.

Como se puede observar en la Figura 11, la enzima inmovilizada mostró una mayor retención de su actividad inicial en presencia de diferentes solventes orgánicos a diferentes concentraciones. No obstante, los mejores resultados se obtuvieron para concentraciones del 25% del solvente. Para el etanol al 25%, la enzima inmovilizada por formación de CLEAs mostró una retención de actividad 2.1 veces superior; mientras que para la acetona fue de 1.17 veces con respecto a la enzima libre.

Cabana et. al. en el 2007 informó la preparación de CLEAs de lacasa y el estudio de la estabilidad de los mismos en presencia de diferentes solventes orgánicos. En este sentido, la incubación en presencia de metanol y acetona al 25% mostró un incremento de la estabilidad del CLEA de 1.64 y 1.68 veces superior a la enzima libre, respectivamente (Cabana, H. et. al., 2007). Resultados similares informaron Cabana et. al. en el 2009 al estudiar la estabilidad de CLEAs de lacasa en un reactor de flujo continuo (Cabana, H. et. al., 2009).

Diferentes trabajos han informado que la formación de CLEAs estabiliza la enzima en presencia de solventes orgánicos debido al incremento de la rigidez estructural adquirida por el biocatalizador, después de la inmovilización (Iyer y Ananthanarayan, 2008; García et. al., 2011; Šulek, et. al., 2011; Wilson, et. al., 2009).

Existe un reconocimiento creciente de que las enzimas pueden ser utilizadas en diferentes procesos de remediación, para el tratamiento de contaminantes específicos. Las lacasas pueden degradar colorantes químicos, con estructuras semejantes a los sustratos sobre los que ella actúa (compuestos fenólicos), para transformar estos compuestos tóxicos en metabolitos seguros y puede ser utilizada para el control de la contaminación ambiental (Abadulla et. al., 2000).

Alrededor del 90% de los colorantes reactivos textiles que entran a las plantas de tratamientos de aguas residuales son descargados en los ríos, sin ser degradados (Pierce, 1994). Por tal motivo, el uso de lacasas para el tratamiento de aguas residuales de la Industria Textil ha crecido en la actualidad.

En este sentido, en el presente trabajo se realizó el estudio de decoloración de un tinte sintético en el tiempo, por la enzima inmovilizada por formación de agregados entrecruzados. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

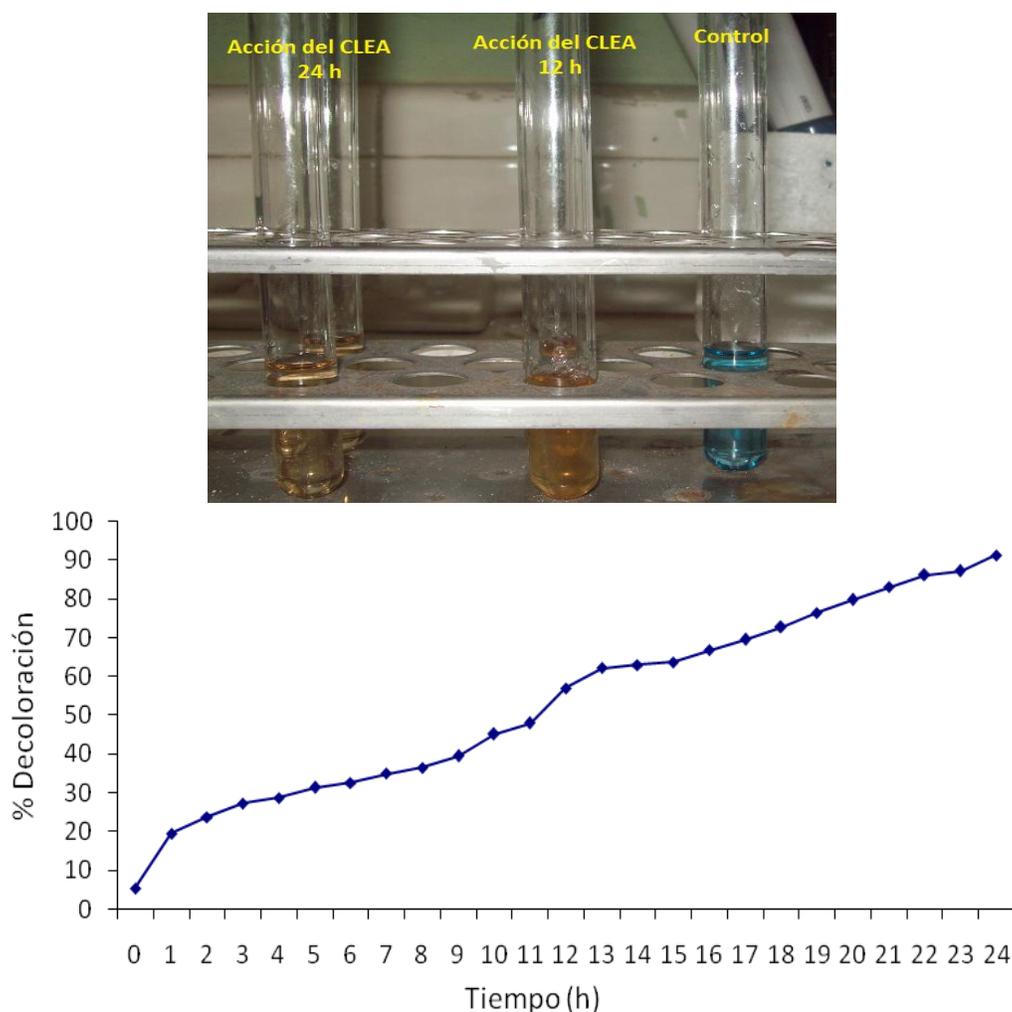


Figura 12. Decoloración en el tiempo de un tinte sintético (azul índigo) por acción del CLEA de lacasa de *Trametes versicolor*.

Como se puede observar en la Figura 12, la acción del CLEA de lacasa sobre el tinte sintético azul índigo trajo consigo una decoloración de más de un 90% después de su incubación por 24h. De igual forma se puede observar como la enzima va degradando lentamente el tinte, al decolorarse casi en su totalidad la muestra a las 24h.

Varios trabajos encaminados a la inmovilización de la lacasa para el tratamiento de contaminantes de las aguas de la Industria Textil se han llevado a cabo. En este sentido, Yamak et. al., en el 2009 realizaron la inmovilización de la lacasa de *Trametes*

versicolor por semi-interpenetración de la enzima en una red polimérica. La enzima inmovilizada mostró más del 80% de decoloración del colorante sintético Amarillo ácido 52 (AO52), después de 8h de incubación (Yamak, O. et. al., 2009). Resultados similares fueron informados por Wesenberg et. al., en el 2003 para lacasas obtenidas a partir del hongo de la podredumbre blanca (Wesenberg, D. et. al., 2003).

La biotransformación involucra el uso de agentes biológicos, en forma de células o enzimas aisladas para catalizar una reacción química. Algunos sistemas de biotransformación pueden ser usados para biocatálisis de reacciones sintéticas, bioremediación de contaminantes, tratamiento de aguas o una combinación de métodos que permitan convertir un residuo industrial en un producto químico utilizable.

En muchos procesos de biotransformación, la inmovilización o estabilización del agente biológico puede conferir ventajas significativas en cuanto a reutilización de la enzima (Burton, 2001).

Teniendo en cuenta los aspectos anteriores, en el presente trabajo se realizó el estudio de la reutilización de la enzima inmovilizada, en régimen discontinuo (batch). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

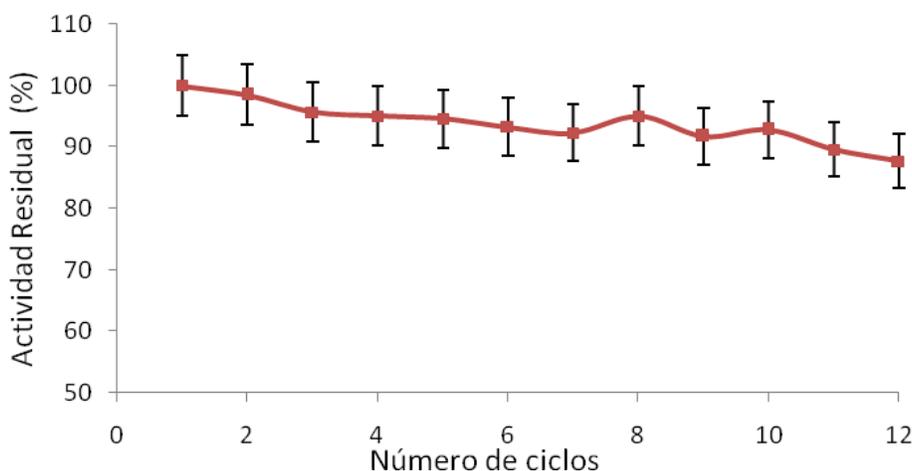


Figura 13. Ciclos de reuso del biocatalizador obtenido por formación del CLEA de lacasa de *Trametes versicolor*, en régimen discontinuo (batch).

Como se puede observar, la enzima inmovilizada por la formación de CLEAs mostró una retención de su actividad residual de más de un 90%, después de 12 ciclos consecutivos.

En este sentido, Leonowicz et. al. en 1998 informaron la inmovilización de lacasa en soportes de vidrio silanizados y activados con glutaraldehído, el cual mostró buena estabilidad en aplicaciones a largo plazo. Cuando este biocatalizador fue utilizado en un reactor en batch, la enzima inmovilizada retuvo su actividad totalmente después de 6 ciclos oxidativos consecutivos; siendo los productos de reacción eliminados en la etapa de lavado (Leonowicz et. al., 1988).

De igual forma, Sangeetha y Abraham en el 2008 informaron que la formación de CLEAs de subtilisina mostró una retención de su actividad residual de más del 70% después de 10 ciclos de reuso (Sangeetha, K. y Abraham, T. E., 2008).

Kartal et. al. en el 2011 informaron la preparación de CLEAs de lipasa de *Candida rugosa*, usando glutaraldehído como agente entrecruzante. El estudio de reusabilidad del CLEA mostró que el mismo disminuyó paulatinamente la retención de su actividad residual hasta el 50%, después de 11 ciclos de reuso. La actividad de la enzima inmovilizada se mantuvo constante hasta el ciclo No. 15, mostrando una retención del 40% de su actividad inicial (Kartal, F. et. al., 2011). Por tanto, los resultados informados están en correspondencia con los obtenidos en el presente trabajo.

4.3. Valoración económica.

Para realizar una valoración económica del trabajo realizado, debemos tener en cuenta todos los gastos incurridos en la realización del mismo. Por tal motivo, al constituir esta una investigación básica solo se tuvieron en cuenta los gastos realizados, en el desarrollo de esta metodología; como se describe en la Sección 3.10 de Materiales y Métodos.

Todos los experimentos descritos en este trabajo se realizaron en el Laboratorio de Tecnología Enzimática, de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de Matanzas

“Camilo Cienfuegos”; por lo que no se incluirán gastos por concepto de transportación. Por tal motivo, solo se incluirán los gastos asociados por concepto de salario (para un técnico de laboratorio), gastos de energía y de reactivos químicos empleados.

GASTOS DE SALARIO:

Para hallar estos datos se usaron las siguientes fórmulas:

Para: Gastos de salario de un técnico de laboratorio de la UMCC.

Salario mensual/ Días de trabajo del mes = costo de 1 día de trabajo

$$355/ 24 = \$ 14,79/ \text{ día (MN)}.$$

Por lo que el gasto total por concepto de salario asciende a: (\$14,79 MN).

GASTOS DE ENERGIA:

Para los gastos de energía se decidió tomar en cuenta el consumo de un día, ya que es el tiempo que se demoraron en realizar dichos experimentos.

Para su determinación se utilizó la siguiente ecuación:

Gasto mensual/ Días laborables en el mes = 1 día de trabajo /kw/día

$$740 \text{ KW} / 24 = 30,83 \text{ KW} / \text{ día.} = \$ 2.77 \text{ (MN)}.$$

Los precios se calcularon en cada caso sabiendo que el KW tiene un costo de (**\$0.09 MN**).

Por lo que el consumo eléctrico en lo correspondiente a los análisis mencionados asciende a (**\$2.77 MN**).

A continuación se muestra una Tabla con el desglose de todos los gastos:

Tipo de gasto	MN (CUP)	USD
Gasto de salarios		
Técnico de laboratorio de la UMCC	14,79/1 día	
Gastos de energía		
Laboratorio de la UMCC	2,77/1 día	
Gastos en reactivos químicos		
Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>		80,93
ABTS		126,97
Etanol		2.74
Citrato trisódico		15.77
Hidróxido de potasio		13.14
Acido clorhídrico		167.04
NaBH ₄		0.29
Metanol		5.62
Glutaraldehido		3.54
Reactivo de Bradford		17.0
Hidróxido de sodio		1.07
Fosfato monobásico de potasio		0.06
Sulfato de amonio		0.08
Tris		5.10
Glicina		2.87
Acetona		0.32

KOH		0.29
Urea		18.32
Acetonitrilo		5.21
DMSO		9.32
Azul índigo carmín		15.85
Totales	\$17.56	\$491.53

Por todo lo antes mencionado hemos podido concluir que los gastos por trabajadores ascienden a: **\$14.79**; los gastos de electricidad a: **\$2.77**; gastos en reactivos químicos a: **\$ 491.53**; para un total de: **\$509.09** por concepto de gastos para la obtención del inmovilizado de lacasa por formación de CLEAs y los experimentos realizados.

Este trabajo fue realizado utilizando una enzima comercial. Sin embargo, la utilización de microorganismos productores de esta enzima, como los hongos de la podredumbre blanca pudiera ser utilizada para la inmovilización de la lacasa, disminuyendo los costos de obtención de este biocatalizador.

5. CONCLUSIONES.

1. Se determinaron las condiciones óptimas para la preparación del biocatalizador de lacasa de *Trametes versicolor* por formación de agregados entrecruzados (CLEAs), en cuanto a concentración de enzima (6 mg/mL), concentración de sulfato de amonio (70%) y concentración de glutaraldehído (1.2%). El CLEA formado retuvo el 49.2% de su actividad inicial, con una eficiencia del proceso de inmovilización de 85.5%.

2. La inmovilización de la lacasa trajo consigo un incremento de la afinidad de la enzima por el sustrato (disminución del valor de K_m 0.95 veces), así como de su estabilidad frente a agentes desnaturizantes. La estabilidad térmica fue superior en un intervalo de temperaturas entre 50°C-70°C, retuvo más del 40% de su actividad inicial en presencia de urea 8 mol/L después de 3h de incubación y mostró una mayor estabilidad frente a solventes orgánicos al 25%; con respecto a su contraparte nativa.

3. Los CLEAs de lacasa preparados fueron capaces de decolorar casi en su totalidad un colorante sintético (azul índigo), decolorando más del 90% del mismo después de 24h de incubación. De igual forma, la enzima inmovilizada mostró una retención de su actividad residual de más de un 90% después de 12 ciclos consecutivos.

6. RECOMENDACIONES.

1. Ampliar el estudio de degradación a otros colorantes sintéticos, así como a efluentes de la Industria Textil.
2. Diseñar un bioreactor con la enzima inmovilizada por formación de CLEAs y evaluar la degradación continua de estos colorantes sintéticos.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aaslyng D, Rorbaek K., Sorensen NH. (1996). An enzyme for dyeing keratinous fibres. Int. Pat. Apl. WO9719998.
2. Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, G., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., Gubitz, G. (2000) Decolourization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3357–3362.
3. Alós, M. (1997). Depuración de aguas residuales. Manual del operador. Edición Technipublicaciones España, S. L. pp 180.
4. Altamirano, M., G. (1999) Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Cátedra de Microbiología Ambiental. Instituto Universitario en Ciencias para la Salud. Universidad Nacional del Comahue, Neuquén.
5. Arman, A. (1992). A Review of Remediation Technologies in the USA. *Environmental Geotechnology*, Balkema, pp. 385 – 389.
6. Attanasio, A., Diano, N., Grano, V., Sicuranza, S., Rossi, S., Bencivenga, U., Fraconte, L., Di Martino, S., Canciglia, P., and Mita, D. G. (2005). Nonisothermal Bioreactors in the Treatment of Vegetation Waters from Olive Oil: Laccase versus Syringic Acid as Bioremediation Model. *Biotechnol. Prog.* **20**: 1393 -1401.
7. Babor, J. (1978). Química general moderna. El Agua. Habana. Cuba. Ed. Pueblo y educación. 322p.

8. Baldrian, P. (2006). Fungal Laccase-occurrence and properties. *FEMS Microb. Rev.* **30**:215-242
9. Baughman G., L. Perenich T.A. (1998). Fate of dyes in aquatic systems: I solubility and partitioning of some hydrophobic dyes and related compounds. *Environ Toxicol.* **54**: 200-207.
10. Blánquez P., Casas N., Font X., Gabarrell M., Sarrá M., Caminal G. (2004). Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Res* **38**: 2166–2172.
11. Bradford, M. M. (1976). A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
12. Brem, J., Turcub, M. C., Paizsa, C., Lundellb, K., Tos, M. I., Irimiea, F. D., Kanervab, L. T. (2012). Immobilization to improve the properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase for the kinetic resolution of 3-aryl-3-hydroxy esters. *Process Biochemistry* **47**: 119–126.
13. Burton, S. G. (2001). Development of bioreactors for application of biocatalysts in biotransformations and bioremediation. *Pure Appl.Chem.* **73** (1): 77–83.
14. Cabana, H., Ahamed, A., Leduc, R. (2011). Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan. *Bioresource Technology* **102**: 1656–1662.

15. Cabana, H., Ahamed, A., Leduc, R. (2011). Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan. *Bioresource Technology* **102**: 1656–1662.
16. Cabana, H., Jones, J. P., Agathos, S. N. (2007). Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Biotechnology* **132**:23–31.
17. Cabana, H., Alexandre, C., Agathos, S.N., Jones, J.P. (2009). Immobilization of laccase from the White rot fungus *Corioloropsis polyzona* and use of the immobilized catalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. *Bioresour. Technol.* **100**: 3447–3458.
18. Cao, L., van Rantwijk, F., Sheldon, R. (2000) Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org. Lett.* **2**: 1361-1364.
19. Cao L. (2005). Immobilised enzymes: science or art? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**:217–26.
20. Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. (1991). Industrial applications of immobilized proteins. In: Protein immobilization. Fundamentals and applications. R.F. Taylor, ed., Marcel Dekker Inc., New York, 339-362.
21. Chivukuka, M., Renganathan, V. (1995). Phenolic azo-dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4374-4379.

22. Couto S.R., Toca-Herrera J.C. (2006). Laccases in the textile industry. *Biotechnology Mol. Biol. Rev.* **1**:117-122.
23. Degrémont, A. (1991). Water Treatment Handbook. París
24. Disponible en: (<http://www.argenbio.org//adcuploads/pdf/biorremediacion>) (Citado el 4 de Febrero del 2012).
25. Disponible en: (<http://www.es.Wikipedia.org/wiki/agua>. (Citado el 4 de Febrero del 2012).
26. M.S. Doscher, F.M. Richards, J. Biol. Chem. 238 (1960) 2399–2406.
27. Durán, N. (2003). Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis B: Environmental* **42**: 131–144.
28. Fazarya, A. E., Ismadjia, S., Ju, Y. H. (2009). Biochemical studies on native and cross-linked aggregates of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase. *International Journal of Biological Macromolecules* **44**: 240–248.
29. Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. (1998). Enzyme and protein engineering via immobilization and post-immobilization techniques. *Recent Res. Devel. in Biotech. and Bioeng.* **1**: 299-309.
30. García, M. I., Sola, A., Sánchez, G., García, F., Sánchez, A. (2011). New stabilized FastPrep-CLEAs for sialic acid synthesis. *Bioresource Technology* **102**: 6186–6191.
31. Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J.* **3**: 1-5.

32. Giardina, P., Faraco, V., Pezella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. (2010). Laccases: a never ending story. *Cell Mol. Life Sci.* **67**:369-385.
33. Hartmeier, W. (1985) Immobilized biocatalysts: from simple to complex systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 149-153.
34. Hernández, M. A. (1998). Depuración de Aguas residuales. 4^{ta} Edición.
35. Hou H., Zhou J., Wang J., Du C., Yan B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem.* **39**:1415–9.
36. Illanes, A. (1994). Biotecnología de enzimas. Monografía N° 35, serie de biología, OEA. Ediciones Universitarias de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 87-96.
37. Illanes, A. (1999). Stability of biocatalysts. *Electronic Journal of Biotechnology* **2** (1): 1-9.
38. ITGE (1995). Contaminación y depuración de suelos. Publicaciones del ITGE. 330 pg.
39. Iyer, P. V., Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry* **43**: 1019–1032.
40. Jaouani, A., Guillen, F., Penninckx, M.J., Martínez, A.T. (2005). Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme Microb. Technol.* **36**: 478–486.

41. Kartal, F., Janssen, M., Hollmann, F., Sheldon, R., Kilinc, A. (2011). Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **71**: 85–89.

42. Katchalski-Katzir, E. (1993). Immobilized enzymes: learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol.* **11**: 471-478.

43. Kennedy, J.F.; Cabral, J.M.S. (1983) Solid Phase Biochemistry. Schouten, W.H. (ed.) Wiley Pub., New York.

44. Klibanov, A. M. (1983). Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Adv. Appl. Microbiol.* **29**: 1-28.

45. Konstantino, C. M.; Dibyendu, S. y Rupali, D. (2006) Evaluating a drinking-water waste by-product as a novel sorbent for arsenic. *Chemosphere* **64**: 730–741.

46. Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros A., Alcalde M. (2008) Laccases and Their Applications: A Patent Review. *Biotechnol.* **2**:10-24.

47. Leonowicz A, Sarkar JM, Bollag JM. (1988). Improvement in stability of an immobilized fungal laccase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**:129–35.

48. López-Serrano, P., Cao, L., van Rantwijk, F. and Sheldon, R.A. (2002). Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnology Letters* **24**: 1379–1383.

49. Martins, R. C., Quinta-Ferreira, R. M. (2011). Remediation of phenolic wastewaters by advanced oxidation processes (AOPs) at ambient conditions: Comparative studies. *Chemical Engineering Science* **66**: 3243–3250.
50. Mateo C, Torres R, Fernández-Lorente G, Ortiz C, Fuentes M, Hidalgo A, et al. (2003). Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules* **4**:772–7.
51. Mateo, C., Palomo, J. M., van Langen, L. M., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (2004). A New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates. *Biotechnology and Bioengineering* **86**: 273-276.
52. Matijošytė, I., Arends, I., de Vries, S., Sheldon, R. A. (2010). Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **62**: 142–148.
53. Minussi RC, Pastore GM., Durán N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **13**: 205–16.
54. O'Neill, C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Lourenço, N., Pinheiro, H.M. y Delée, W. (1999). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**: 1009-1014.
55. Paar, A., Raninger, A., de Sousa, F., Beurer, I., Cavaco-Paulo, A. and Gübitz, G. M. (2003). Production of Catalase-Peroxidase and Continuous Degradation of Hydrogen Peroxide by an Immobilised Alkalothermophilic *Bacillus* sp. *Food Technol. Biotechnol.* **41** (2) 101–104.

56. Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A & Sanna G (1977) A novel laccase from *Pleurotus ostreatus* .*J. Biol. Chem.* **272**: 31301-31307.
57. Parrish, P.R., Hendricks, A. C., Eaton, J. G. (1980). *Aquatic Toxicology, Marking/Kimerle Editors, Baltimore, Pag. 225 – 231.*
58. Peralta-Zamora, P., Pereira, C. M., Tiburtius, E., Moraes, S. G., Rosa, M. A., Minussi, R. C., Peralta-Zamora, P., Pereira, C. M., Tiburtius, E., Moraes, S. G., Rosa, M. A., Minussi, R. C., Durán, N. (2003). Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis B: Environmental* **42**: 131–144.
59. Pierce, J. (1994) Color in textile effluents: the origins of the problem. *J. Soc. Dyers Colorists* **110**: 131–134.
60. Reyes, P., Pickard, M. A., Vasquez-Duhalt, R. (1999). Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnol. Lett.* **21**: 875-879.
61. Rodier, J. (1989). *Análisis de las Aguas*. Editorial Omega, Barcelona.
62. Rodríguez, S., Toca-Herrera, J.L. (2006). Lacasses in the textile industry. *Biotechnology and Molecular Biology Review.* **1**(4): 117-122.

63. Sangeetha, K., Abraham, T. E. (2008). Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of Subtilisin for controlled release applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **43**: 314–319.
64. Sheldon, R., R.A., Schoevaart, L.M. van Langen, Biocatal. Biotransform. 23 (2005) 141–147.
65. Sheldon, R.A. (2007). Biochem. Soc. Trans. 35 1583–1587.
66. Sulekv, F., Fernández, D. P., Knez, Z., Habulin, M., Sheldon, R. A. (2011). Immobilization of horseradish peroxidase as crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Process Biochemistry* **46**: 765–769.
67. Tanksale, A., Chandra, P. M., Rao, M. and Deshpande, V. (2001). Immobilization of alkaline protease from *Conidiobolus macrosporus* for reuse and improved thermal stability. *Biotechnology Letters* **23**: 51–54.
68. Taylor, R.F. (1991). Protein Immobilization: fundamentals and applications, Marcel Dekker, New York.
69. Tchobanoglous, K. (1995) “Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización”, Tomo I, Ed. McGraw-Hill, Madrid.
70. Trejo-Hernandez M.R., López-Munguía, A., Quintero Ramirez, R. (2002) Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds. *Proces. Biochemistry* **36**: 635-639.

71. Trevan, M.D. (1980) Immobilized enzymes: an introduction and applications in biotechnology. J. Wiley, Chichester, UK.
72. Wade L.G. (1993). Química Orgánica. Prentice Hall. México. pp. 1149
73. Wang, P., Dai, S., Waezsada, S.D., Tsao, A.Y., Davison, B.H. (2001). Enzyme stabilization by covalent binding in nanoporous sol-gel glass for nonaqueous biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.* **74**: 249–55.
74. Wang, H.D., Jons, D.G., Xuishy, G., Cohen, R. (2002). Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **282**: 554-562.
75. Wang, J., Chua, K.M., Wang, C.H. (2004). *J. Colloid Interf. Sci.* **271**: 92–101.
76. Wang, M., Qi, W., Jia, Ch., Ren, Y., Su, R., He, Z. (2011). Enhancement of activity of cross-linked enzyme aggregates by a sugar-assisted precipitation strategy: Technical development and molecular mechanism. *Journal of Biotechnology* **156**: 30–38.
77. Wang, J., Liu, X. D., Lua, J. (2012). Urban River Pollution Control and Remediation. *Procedia Environmental Sciences* **13**: 1856 – 1862.
78. Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* **22**: 161–187.

79. Whiteley, C.G., Lee, D.J. (2006). Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology* **38**: 291–316.
80. Wilson, L., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Illanes, A., Guisán, J. M., Palomo, J. M. (2006). CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. *Enzyme and Microbial Technology* **39**: 750–755.
81. Wilson, L., Illanes, A., Soler, L., Henríquez, M. J. (2009). Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase. *Process Biochemistry* **44**: 322–326.
82. Working Party on Immobilized Biocatalysts (1983). Guidelines for the characterization of immobilized biocatalysts. *Enzyme Microb. Technol.* **5**: 304–307.
83. Yamak, O., Kalkan, N. A., Aksoy, S., Altinok, H., Hasirci, N. (2009). Semi-interpenetrating polymer networks (semi-IPNs) for entrapment of laccase and their use in Acid Orange 52 decolorization. *Process Biochemistry* **44**: 440–445.

