

Título: Desarrollo de biocatalizadores estabilizados: aplicaciones en bioremediación

Integrantes: Rivero, Cintia Wanda; De Benedetti, Eliana Celeste; Cappa, Valeria Alejandra; Ramírez Tapias, Yuly Andrea; Alfonso, Andres Juan; Ares, Micaela Natalia.

Resumen: Actividad 1. Se realizó una selección de microorganismos productores de lacasas mediante una estrategia de screening jerárquico utilizando un cepario de más de 200 cepas bacterianas. Sobre los agrupamientos por género que resultaron positivos para la actividad buscada, se realizó un análisis a nivel de cepa para identificar las especies productoras. Se identificaron 6 cepas con la actividad de interés, pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Proteus* y *Streptomyces*. Dichas cepas presentaron niveles de actividad comparables y aún superiores a los obtenidos con *Escherichia coli*.

Actividad 2. Se realizaron estudios *in silico* de secuencias reportadas en bases de datos electrónicas, se seleccionaron las secuencias de lacasas bacterianas existentes y se determinó un patrón de secuencia promedio de las regiones de unión específica a Cu(II) L1 y L3, las cuales sólo se han identificado en lacasas. Con este patrón basado en secuencias de 8 microorganismos relacionados, se diseñaron primers para identificación molecular mediante PCR.

Actividad 3. Se realizaron cinéticas de crecimiento de los microorganismos productores y se determinaron los estadios de mayor producción enzimática. En general, los mayores niveles de actividad específica se encontraron en la fase de desaceleración. Por otro lado, se estudió el efecto del agregado de Cu (II) como inductor de la expresión de lacasas. Los resultados mostraron que la expresión de la actividad de interés puede inducirse por agregado de Cu(II) sólo en *E. coli* y no en las demás cepas estudiadas y esto puede estar relacionado con las diferentes funciones biológicas propuestas para estas enzimas.

Se determinó la localización de la enzima en los microorganismos productores encontrándose que en la mayoría de ellos se expresa intracelularmente. Por ello, se optimizaron protocolos de ruptura por sonicación para la obtención de extractos proteicos intracelulares, determinándose potencia, cantidad y duración de pulsos del proceso. Además, se estudiaron técnicas de recuperación y concentración de proteínas desde el sobrenadante de cultivo. Para ello, se evaluó la concentración por evaporación a baja presión, salting-out con sulfato de amonio y precipitación con acetona. La precipitación con solvente orgánico resultó la de mayor efectividad, dado que se obtuvieron rendimientos del 90 % y factores de concentración de 50X.

Actividad 4. Se optimizó la reacción de oxidación de ABTS para mejorar la sensibilidad y reducir la presencia de reacciones secundarias de polimerización que pueden interferir en la determinación espectrofotométrica. Para ello, se analizó el efecto del tipo de buffer (acetato, fosfato, Tris-HCl), rango de pH (4-9), temperatura (25-60 °C) y agitación (300 rpm o estático).

Los preparados enzimáticos estudiados se caracterizaron en cuanto a parámetros básicos de estabilidad frente a incubaciones en diferentes pH y temperaturas. Se determinó que *Bacillus* y *Proteus* poseen mayor estabilidad frente a temperatura (hasta 60 °C) y pH alcalinos (hasta 9) que el microorganismo productor de referencia (*E. coli*).

Actividad 6. Se inmovilizaron preparados enzimáticos de *E. coli* (intracelular) y *Proteus* (extracelular) por atrapamiento en geles de alginato-Cu, por adsorción a IDA-Cu-agarosa y por unión covalente a Ec-Ep-agarosa. Los preparados de *E.coli* presentaron niveles de actividad aceptables en alginato-Cu e IDA-Cu-agarosa, mientras que los provenientes de *Proteus* produjeron derivados inmovilizados con elevada actividad utilizando soportes de unión covalente y adsorción. Debido a que las características propias de las enzimas en cuestión ejercen un efecto diferencial en el tipo de inmovilización, se realizaron ensayos de optimización para los diferentes sistemas.

En primer lugar se optimizaron parámetros de inmovilización de preparados de *E. coli* en alginato-Cu. Se determinó carga enzimática, concentración de alginato y Cu(II) y tiempo de incubación. El biocatalizador inmovilizado con mejor actividad se obtuvo con una carga enzimática de 2 DO280nm/mL de soporte, una concentración de alginato de 2.5 % p/v y una incubación en Cu(II) 5 % p/v de 1 hora. Adicionalmente, para evaluar mejoras en la estabilidad mecánica de estos derivados, se desarrollaron biocatalizadores con alginato-gelatina-glutaraldehído, que incorpora la estabilización por entrecruzamiento covalente entre la gelatina activada por el glutaraldehído. Dichos soportes presentaron una actividad específica similar a los derivados de alginato.

Para la inmovilización del preparado enzimático de *Proteus* (extracelular) se estudió la adsorción a IDA-Cu-agarosa y unión covalente a EcEp-agarosa. Se determinó carga enzimática inicial, pH y tiempo de inmovilización. Se calcularon los rendimientos de inmovilización mediante la cuantificación de proteínas remanentes en el sobrenadante de inmovilización y se evaluó la actividad mediante la reacción estándar de detección.

Actividad 7. Sobre los biocatalizadores inmovilizados (alginato-Cu, IDA-Cu, EcEp-agarosa y alginato-Cu-gelatina-glutaraldehído) obtenidos en las condiciones optimizadas, se evaluó la estabilidad en condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica. Se determinó que los derivados de alginato y alginato-gelatina-glutaraldehído son estables a pH menores a 9 y temperaturas inferiores a 50 °C, donde pierden estructura física. Por otro lado, los derivados obtenidos con soportes covalentes fueron estables en un rango amplio de condiciones de pH y fuerza iónica pero pierden actividad a 50 °C. Además, se determinaron las condiciones de almacenamiento de derivados de alginato. Los biocatalizadores retuvieron actividad durante más de ocho semanas de almacenamiento a 4 °C.

Para determinar la vida útil de los biocatalizadores inmovilizados se realizaron estudios de desactivación en operación continua en diferentes condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica. Se determinó que tanto a pH menores a 7 como concentraciones salinas de hasta 0.1M en NaCl los soportes Alginato-Cu, IDA-Cu y EcEp-Cu retienen actividad significativa cerca de 400 horas de operación.