

Desarrollo de un sistema de inmovilizados enzimáticos para reducción de fenoles en agua contaminada

Autor: *Helen Virginia Flores Macias*

María Elena Macias Ibarra

helen.virginia.flores@gmail.com

Palabras clave: Contaminación, fenol, biorremediación, F. equiseti, lacasas.

Resumen.

El fenol es un contaminante que al estar en contacto con el presenta un alto riesgo para la salud, debido a que es tóxico, cancerígeno y mutagénico. La cantidad de fenoles que se pueden encontrar en efluentes industriales puede oscilar entre 1mg/L y 7000 mg/L y sus niveles de toxicidad oscilan entre los 10 y 24 mg/L, mientras que si se tiene en la sangre una concentración de ~1.5 mg/mL es letal. Por tal motivo, es importante tener sistemas que logren reducir este contaminante en agua. El objetivo de este trabajo fue producir e inmovilizar la enzima lacasa del hongo *Fusarium equiseti* para degradar la concentración de fenoles en agua artificialmente contaminada. Se realizó por medio de la fermentación en estado sólido del hongo *F. equiseti* en biorreactores en columna, se realizaron pruebas de inmovilización con los soportes EVA y PGV y se realizaron cinéticas en microplaca para conocer la actividad enzimática y la eficiencia de la fermentación. Como resultado se logró obtener 4.07 U/mL de actividad enzimática en ABTS y una concentración de proteína de 1.02 mg/mL. Al inmovilizar la enzima, el soporte con mayor eficiencia logró mantener la actividad enzimática un 60.2%. Al realizar las pruebas de degradación de fenoles la enzima inmovilizada con PGV, logro disminuir un 2.52% la cantidad de compuestos fenólicos en un tiempo de 2.5 horas. Estos resultados evidencian el potencial de degradación de esta enzima para contribuir a mitigar los riesgos asociados a los fenoles en el medio ambiente y la salud humana.

Introducción.

La contaminación del agua es una preocupación que crece debido a los contaminantes que llegan a través de las aguas residuales de diversas industrias, uno de los contaminantes con mayor importancia es el fenol debido a que es tóxico, cancerígeno y mutagénico (1), mediante la biorremediación se pueden utilizar enzimas extraídas de plantas, bacterias u hongos para el tratamiento de contaminantes (2,3). Una enzima capaz de degradar el contaminante fenol es la lacasa (4), la cual ha sido identificada anteriormente en el hongo *F. equiseti* (5), sin embargo, al estar una enzima en su estado libre pierde estabilidad y su capacidad de degradación (6), esto se

puede solucionar inmovilizando la enzima (6–8), por ello, este trabajo se enfoca en evaluar si las enzimas lacasas obtenidas del hongo *F. equiseti* pueden ser inmovilizadas y utilizadas eficazmente para la degradación del contaminante fenol en agua.

Objetivos.

Evaluar la producción de lacasas del extracto enzimático obtenido de la fermentación en estado sólido del hongo filamentoso *F. equiseti*, evaluar la efectividad de los soportes EVA y PGV por medio de métodos físicos para determinar el soporte más adecuado para inmovilizar la enzima lacasa, determinar la actividad enzimática de las lacasas

inmovilizadas y comprobar su efectividad en agua artificialmente contaminada con compuestos fenólicos.

Metodología.

La investigación tuvo un enfoque experimental y fue realizada en el laboratorio de Ciencias de la Naturaleza del Centro Universitario del Sur. Se reactivó una cepa de *F. equiseti* previamente caracterizada (5) para realizar una fermentación en estado sólido en un biorreactor de tipo columna y maximizar la producción enzimática del hongo (9), como sustrato de la fermentación se utilizó bagazo de agave. Se realizó una extracción enzimática por medio de un lavado de buffer (10), para cuantificar los extractos enzimáticos obtenidos de lacasa se utilizó el método de ABTS (11) y se determinaron las proteínas obtenidas con el método de Bradford (12). Para llevar a cabo la inmovilización enzimática se comparó la eficacia de dos soportes; polímero de etilvinilacetato (EVA) (13) y nanoarcilla de tipo bentonita hidrofílica (PGV) (14). Finalmente, se determinó el porcentaje de degradación de compuestos fenólicos realizando una cinética en microplaca utilizando un espectrofotómetro de microplacas, la longitud de onda utilizada fue de 200-800 nm con un paso de longitud de longitud de onda de 2 nm (15).

Resultados y discusión.

Se logró obtener mediante la fermentación en estado sólido del hongo *F. equiseti* la enzima lacasa, la cual presentó como máxima actividad enzimática una cantidad de 4.07 U/mL de actividad enzimática en ABTS y una concentración de proteína de 1.02 mg/mL. Después de dos semanas en estado libre su actividad enzimática disminuyó a 3.07 U/mL. Se realizaron pruebas de inmovilización y el soporte PGV fue el más efectivo, logró conservar un 60.24% de la actividad enzimática, debido a que se obtuvo una actividad final de 1.85 U/mL, mientras que el EVA obtuvo una actividad enzimática casi nula. En una investigación anterior realizaron pruebas de inmovilización de la enzima lipasa utilizando como soporte arcilla bentonita modificada y lograron conservar una actividad enzimática del 56.6% (16), esto es concordante con los resultados encontrados en esta investigación, esto demuestra la efectividad del PGV como soporte. Utilizando la enzima lacasa inmovilizada en el soporte

PGV se logró obtener una degradación de 2.52% a 400 ppm de fenol en 2.5 horas. En un estudio realizado con *Fusarium oxysporum* se logró una degradación de fenoles del 100% en el transcurso de 7 días utilizando una concentración 2.5 mM (17), en este estudio, suponiendo que la degradación sea constante en 99.2 horas se lograría obtener una degradación del 100%, lo cual es menor al tiempo que se requirió en ese estudio. Un estudio que utilizó lacasa obtenida de *Paraconiothyrium variabile* logró degradar un 80% de fenoles en 30 min utilizando 5 U/mL de enzima sin inmovilizar (18), la concentración utilizada en este proyecto es de 1.85 U/mL, al ser una concentración menor es de esperarse que la degradación tarde más tiempo. También se analizó en este trabajo la degradación de la enzima en estado puro y se obtuvo una degradación del 91.29% en 2.5 horas, lo cual fue mayor a lo obtenido en una investigación donde se logró degradar un 85% después de 5 días (5), lo que demuestra la eficacia de la enzima lacasa.

Conclusiones.

Las enzimas lacasas obtenidas del hongo *F. equiseti* fueron inmovilizadas y utilizadas eficazmente para la degradación del contaminante fenol en agua.

Fuentes de información.

1. Husain Q, Ulber R. Immobilized Peroxidase as a Valuable Tool in the Remediation of Aromatic Pollutants and Xenobiotic Compounds: A Review. Crit Rev Environ Sci Technol. 24 de marzo de 2011;41(8):770-804.
2. Saravanan A, Kumar PS, Varjani S, Jeevanantham S, Yaashikaa PR, Thamarai P, et al. A review on algal-bacterial symbiotic system for effective treatment of wastewater. Chemosphere. 1 de mayo de 2021;271:129540.
3. Rodríguez-Gonzales A, Zárate-Villarroe SG, Bastida-Codina A, Rodríguez-Gonzales A, Zárate-Villarroe SG, Bastida-Codina A. Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. Rev Cienc Ambient. junio de 2022;56(1):178-208.
4. Kyomuhimbo HD, Brink HG. Applications and immobilization strategies of the copper-centred laccase enzyme; a review. Heliyon. 1 de febrero de 2023;9(2):e13156.
5. Sánchez G. Obtención y caracterización de hongos productores de lacasas, lipasas y celulasas con

- potencial de biorremediación de aguas contaminadas. Universidad de Guadalajara; 2022.
6. Alvarado-Ramírez L, Machorro-García G, López-Legarrea A, Trejo-Ayala D, Rostro-Alanis M de J, Sánchez-Sánchez M, et al. Metal-organic frameworks for enzyme immobilization and nanozymes: A laccase-focused review. *Biotechnol Adv.* 1 de enero de 2024;70:108299.
 7. Arroyo DM. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. 1998;
 8. Salazar-Leyva JA, Valenzuela EM. Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. 2014;13(1).
 9. Raimbault M, Alazard D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 1 de septiembre de 1980;9(3):199-209.
 10. Rodríguez JA, Mateos JC, Nungaray J, González V, Bhagnagar T, Roussos S, et al. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochem.* 1 de noviembre de 2006;41(11):2264-9.
 11. Páez MG. Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil [Internet] [bachelorThesis]. SANGOLQUÍ / ESPE / 2011; 2012 [citado 16 de mayo de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/5261>
 12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7 de mayo de 1976;72(1):248-54.
 13. Manoel EA, Ribeiro MFP, dos Santos JCS, Coelho MAZ, Simas ABC, Fernandez-Lafuente R, et al. Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia*: Application to the kinetic resolution of *myo*-inositol derivatives. *Process Biochem.* 1 de octubre de 2015;50(10):1557-64.
 14. Rivera I. Síntesis de biodiesel a partir de desechos grasos catalizada por lipasas inmovilizadas de fabricación propia. 2009.
 15. Alonso-Calderón AIA. Eliminación de fenol, 2-clorofenol y colorantes en aguas artificialmente contaminadas y aguas residuales textiles utilizando a la peroxidasa de chayote. *Rev Latinoam Recur Nat.* 1 de julio de 2008;4(2):278-84.
 16. Ghiaci M, Aghaei H, Soleimanian S, Sedaghat ME. Enzyme immobilization: Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Appl Clay Sci.* 1 de marzo de 2009;43(3):289-95.
 17. Park JY, Hong JW, Gadd GM. Phenol degradation by *Fusarium oxysporum* GJ4 is affected by toxic catalytic polymerization mediated by copper oxide. *Chemosphere.* 1 de mayo de 2009;75(6):765-71.
 18. Asadgol Z, Forootanfar H, Rezaei S, Mahvi AH, Faramarzi MA. Removal of phenol and bisphenol-A catalyzed by laccase in aqueous solution. *J Environ Health Sci Eng.* 11 de junio de 2014;12(1):93.

