

Objetivo

Inmovilizar y estabilizar la enzima lacasa de *Trametes versicolor* para utilizarla en reacciones de degradación del antibiótico modelo oxitetraciclina

Problema

- En Uruguay se reportan pérdidas anuales de USD 26 millones en producción lechera debido a mastitis.
- Los antibióticos son utilizados en los tambos para el tratamiento y prevención de enfermedades en ganado bovino lechero, como la mastitis, y otras.
- Existen reglamentaciones nacionales e internacionales que prohíben el procesamiento de leche con antibióticos, por lo que es de importancia el estudio de alternativas a la disposición final.
- Los residuos de medicamentos veterinarios, son considerados un peligro y potencial riesgo para la salud pública, los procesos de industrialización lechera y el medio ambiente.

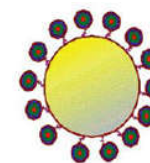
Estrategia de mitigación

Uso de enzimas como estrategia biotecnológica para la degradación de los antibióticos contaminantes.

Selección de oxitetraciclina como modelo ya que es uno de los antibióticos más utilizados en la industria láctica



+



Leche contaminada

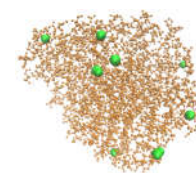
Enzimas inmovilizadas

Leche descontaminada

Inmovilización de laccasa de *Trametes versicolor* (TvL) en diferentes soportes

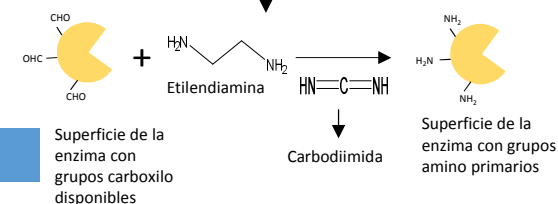
| Soporte | Grupos reactivos del soporte | Interacción | % Inmovilización | % Rendimiento |
|--|------------------------------------|--|------------------|---------------|
| Agarosa-octil | Octil | Adsorción hidrofóbica | 11±1 | 7±3 |
| Agarosa-IDA-Cu | Quelatos de Cu | Afinidad por quelatos metálicos | 79±1 | 34±2 |
| Agarosa-Epóxido | Epóxido | Covalente | 40±6 | 38±14 |
| Sílica | Aminos primarios | Adsorción iónica | 73±ND | 12±ND |
| Agarosa-MANAE | Aminos primarios | Adsorción iónica | 85±7 | 61±18 |
| Agarosa-MANAE posteriormente entrecruzado con glutaraldehido | Aminos primarios | Adsorción iónica y entrecruzamiento | 85±7 | 16±1 |
| Agarosa-Glutaraldehido | Aldehídos alifáticos | Covalente | 67±ND | ND |
| Agarosa-Glioxil | Aldehídos alifáticos | Covalente | 0±0 | 0±0 |
| Agarosa – Glioxil * | Aldehídos alifáticos | Covalente | 100 ± 0 | 57 ± 4 |
| Lewatit MonoPlus MP 68 | Aminas cuaternarias y/o terciarias | Grupos de la superficie negativamente cargados | 100±0 | 24±3 |
| Lewatit VP OC 1600 | None | Región hidrofóbica de la superficie de la enzima | 16±1 | 5±2 |

Modificación química de TvL

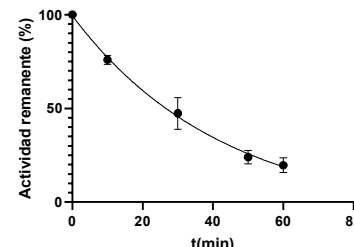
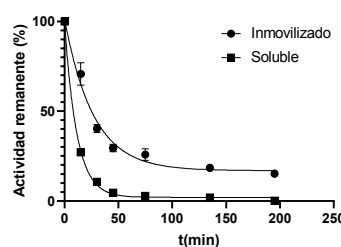


Estructura tridimensional de TvL. En verde se muestran LYS que participan en la inmovilización en glioxil agarosa

Se cree que las pocas LYS que se observan, no están accesibles en la inmovilización, por eso se propuso una modificación química donde se adicionan grupos amino primarios a partir de una reacción química con grupos carboxilo de la superficie de la enzima



Estabilidad térmica a 65 °C en buffer y leche descremada



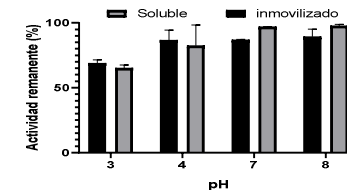
Condiciones de ensayo: Temperatura: 65°C. Act. Enzimática: 0,3 UI/mL. Medio de reacción : Buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7 y leche descremada

$$t^{1/2}_{\text{soluble}} = 7,90 \text{ min}^{-1}$$

$$t^{1/2}_{\text{inmovilizado}} = 18,54 \text{ min}^{-1}$$

$$t^{1/2}_{\text{inmovilizado}} = 29,74 \text{ min}^{-1}$$

Estabilidad a diferentes pH



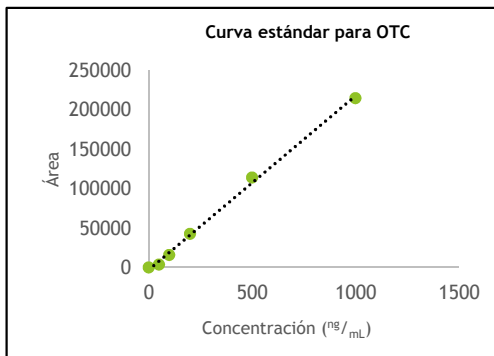
Se muestra el porcentaje de actividad remanente al cabo de 4 horas de incubación en relación con la actividad inicial. El ensayo se lleva a cabo a T ambiente. Para los pH 3 y 4 se utiliza buffer acetato de sodio 25 mM y para los pH 7 y 8 buffer fosfato de sodio 25 mM

Capacidad de carga del soporte

| UE/g soporte ofrecido | %I | %R | UE/g soporte recuperado |
|-----------------------|--------------|-------------|-------------------------|
| 245 | 76 ± 2 | 4,0 ± 0,7 | 1,47 |
| 26 | 87 ± 2 | 28 ± 5 | 6,4 |
| 7 | 100 ± 0 | 57 ± 4 | 4 |
| 4,41 | 98,36 ± 0,05 | 45 ± 9 | 3,1 |
| 1,13 | 99,0 ± 0,3 | 59,0 ± 0,7 | 0,77 |
| 0,6 | 100 ± ND | 100,0 ± 6,3 | 0,63 |

* Enzima modificada químicamente

Reacción de degradación de OTC

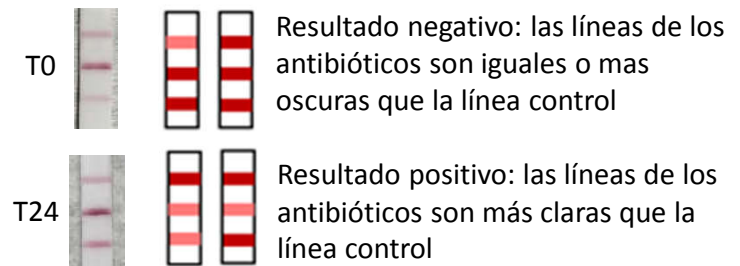


| Catalizador | Concentración de enzima (U/mL) | Concentración de OTC (ng/mL) inicial | % de Degradación (ng/mL) |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| TvL soluble | 0,5 | 200 | 46,0 ± 5,3 |
| TvL soluble | 0,7 | 200 | 53,8 ± 5,4 |
| TvL - Glioxil | 0,3 | 200 | 52,8 ± 1,0 |

Vemos que el inmovilizado posee aproximadamente la misma capacidad de degradación de OTC que la enzima soluble. Si bien las reacciones llevadas a cabo con la enzima soluble son a 12 h y las del inmovilizado a 24 h, este último posee la mitad de actividad enzimática.

Conclusiones

- Se obtuvo un inmovilizado activo y estable de TvL
- El inmovilizado logró la reducción de 86,8 ng/mL de OTC, aproximándonos a los 100 ng/mL permitidos según Codex Alimentarius
- En estudios futuros se evaluarán el uso de mayores cantidades de soporte y por ende UI en la reacción, para degradación de OTC en menores tiempos
- Nuestros estudios demuestran el potencial de inmovilizados de TvL para el tratamiento de leches contaminadas con tetraciclinas
- Esta tecnología permitiría la fácil separación del biocatalizador y su reutilización a demostrar en futuros estudios



- La reacción se lleva a cabo con leche descremada suplementada con 12 ppb de OTC.
- Dicha mezcla se pone a reaccionar por 24 h en presencia de 300 mg de inmovilizado con una actividad de 0,54 UE/g soporte
- Act. Enzimática total fue de 0,16 UE

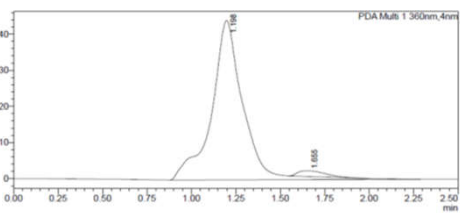
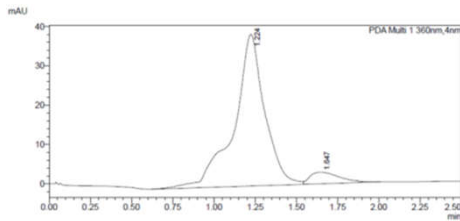
Teniendo en cuenta que los límites de detección de las tiras reactivas para OTC son 4 a 8 ppb podemos decir que el derivado fue capaz de degradar al menos 8 ppb de OTC en leche en 24 h

Agradecimientos

- ✓ MSc. Diego Cazabán
- ✓ FSA_I_2017_1_138926,
- ✓ POS_FSA_2018_1_1008118



AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN



La reacción se lleva a cabo a T ambiente con 300 mg de inmovilizado con una actividad total de 0,3 UE en buffer fosfato de sodio 25 mM pH7 suplementado con 200 ng/mL de OTC

Equipo: Shimadzu Nexera X2 (SIL-30AC); Detector: Arreglo de diodos (SPD-M30A); Software: LabSolutions (Shimadzu); Columna: ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm X 50 mm (Waters); Flujo: 0,15 mL/min; λ: 360 nm; Fase móvil: 10 mM ac. Oxálico : Metanol : Acetonitrilo (60 : 25 : 15); Vol. Inyección: 20 µL