

ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE OXITETRACICLINA EN LECHE UTILIZANDO LACASA SOLUBLE E INMOVILIZADA

REY BENTOS, Fabiana ^{1*}; VACCARO, Victor ²; ESCOBAR, Daniela ¹; CARDOZO, Gonzalo ¹; OLAZÁBAL, Laura ³; JACKSON, Erienne ²; BETANCOR, Lorena ²
1. LATITUD_Fundación LATU 2. Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad ORT 3. LATU. Montevideo, Uruguay. *frey@latitud.org.uy

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son utilizados en tambos para el tratamiento y prevención de enfermedades en ganado bovino lechero. La presencia de residuos en leche genera preocupación por sus efectos en la salud humana y animal, en procesos industriales y el ambiente (Martínez, 2009). Existen reglamentaciones nacionales e internacionales que prohíben el procesamiento de leche con antibióticos, siendo de importancia el estudio de estrategias para mitigar el impacto de su disposición (Decreto N°359/013; MVOTMA, 2016; Decreto 182/013; Codex Alimentarius, 2017). La utilización de enzimas para degradar estos compuestos en la leche de descarte constituye una alternativa biotecnológica prometedora, y tiene la ventaja de ser más segura, económica, requiere menos energía y es amigable con el ambiente.

Las lacasas, enzimas pertenecientes a la familia de las oxidasas multi-cobre, son capaces de oxidar gran variedad de compuestos fenólicos y no fenólicos. Son versátiles, estables y ubicuas (Mate, 2016). Con el objetivo de mejorar la estabilidad enzimática (estabilidad térmica, frente a pH, solventes orgánicos, etc) y poder reutilizar biocatalizadores con el fin de economizar el uso de enzimas en la industria es que en las últimas décadas han surgido diferentes investigaciones sobre la inmovilización de enzimas. En este trabajo se utilizó una lacasa proveniente del hongo *Trametes versicolor* la cual se modificó químicamente para enriquecer su superficie de grupos aminos y así generar uniones covalentes entre los grupos amino de la enzima y grupos aldehído del soporte glioxil agarosa, con el objetivo de generar un derivado inmovilizado estable.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la degradación de oxitetraciclina (OTC) en leche mediante la acción de lacasa de *Trametes versicolor*, en forma soluble e inmovilizada.

METODOLOGÍA

Inmovilización de lacasa

Se sintetizó el soporte agarosa glioxil según Guisán (1988). Para poder inmovilizar TvL previamente se procedió a aminarla según Lopéz-Gallego y cols. (2005). La inmovilización de TvL en glioxil agarosa se realizó incubando 5 mL de una solución enzimática de 25 mg/ml previamente aminada, en buffer bicarbonato de sodio 0,1 M pH 10,0 junto con 1 g de glioxil agarosa por 24 horas a 22 ° C. Pasado este tiempo se agregó 1 mg/mL de NaBH₄ y se dejó en hielo bajo agitación magnética moderada por 30 minutos. Por último se lavó el inmovilizado con buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7.

Degradación de OTC con lacasa soluble e inmovilizada

Los ensayos se realizaron en leche en polvo descremada adicionada con 200 y 500 ppb de OTC. Se utilizaron dos concentraciones de enzima soluble (0,1 y 0,3 U/mL) para cada concentración de antibiótico. Las mezclas de reacción se incubaron a 23,0 ± 0,5 ° C y 100 rpm de agitación. A las 12 y 24 horas se extrajeron muestras para cuantificar OTC por UPLC/MS-MS. Para detener la reacción enzimática se agregó acetonitrilo a la muestra en relación 1:1 v/v. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para el caso de la enzima inmovilizada, se partió de leche descremada suplementada con 200 ppb de OTC. Se utilizó la cantidad de derivado suficiente para alcanzar una actividad enzimática de 0,1 U/mL y se incubó de la misma forma que para la enzima soluble, extrayendo muestra a las 12 y 24 hrs. Para detener la reacción se centrifugó 5 min a 4000 g para separar la enzima inmovilizada de la muestra de leche. Los ensayos se realizaron por duplicado

Cuantificación de OTC por HPLC/MS-MS

Se precipitaron las proteínas de la leche con acetonitrilo y se centrifugó a 8500 g. Se determinó la concentración de antibiótico por UPLC-MS/MS (1290 Agilent equipado con detector de masa Triple Quad LC/MS Agilent 6430), utilizando Columna Poroshell 120 EC-C18 2.1 x 100mm 2.7-Micron de Agilent Technologies.

RESULTADOS

Degradación de OTC con lacasa soluble

Tabla 1. Degradación de 200 y 500 ppb de OTC con distintas concentraciones de lacasa a las 12 y 24 horas

Concentración OTC (ppb)	Concentración lacasa (U/ml)	% Degradación	
		12 hs	24 hs
200	0,1	30,2 ± 2,65 ^a	59,9 ± 2,65 ^c
	0,3	39,0 ± 2,65 ^b	68,7 ± 2,65 ^d
500	0,1	42,9 ± 2,51 ^b	72,6 ± 2,51 ^d
	0,3	51,7 ± 2,51 ^c	81,4 ± 2,51 ^e

Como se observa en la Tabla 1 a las 12 hs de reacción utilizando 0,3 U/mL de lacasa se obtiene un 51,7% de degradación de los 500 ppb de oxitetraciclina presentes en la leche, y a las 24 hs un 81,4 %. Para la misma cantidad de enzima y los mismos tiempos de reacción se observa que la degradación es mayor cuanto mayor es la concentración de antibiótico presente en la leche.

Comparación de la degradación de OTC con lacasa soluble e inmovilizada

Tabla 2. Concentración de OTC a tiempo 0 y luego de 24 hs de reacción con 0,1 U/mL de lacasa soluble e inmovilizada

Tiempo de reacción (hs)	Concentración OTC (ppb)	
	Lacasa inmovilizada	Lacasa soluble
0	300,9 ± 7,0	296,5 ± 8,9
24	158,3 ± 16,0	170,4 ± 14,5

Tabla 3. Porcentaje de degradación de OTC a las 24 de reacción con 0,1 U/mL de lacasa soluble e inmovilizada

Tiempo (hs)	Inmovilizada		Soluble	
	% Degradación	IC95%	% Degradación	IC95%
24	43,4	(40,5 - 53,8)	42,5	(35,2 - 48,9)

Con el objetivo de comparar el desempeño de la lacasa en forma soluble e inmovilizada, se llevó a cabo un ensayo en el mismo volumen de leche en polvo descremada conteniendo 200 ppb de oxitetraciclina, utilizando 0,1 U/mL de lacasa soluble e inmovilizada en un soporte de agarosa glioxil. Ambas reacciones se incubaron a 23,0 ± 0,5 ° C y 100 rpm de agitación, por 24 hs.

Como se observa en la Tabla 2, la concentración de oxitetraciclina a las 24 hs de reacción disminuyó en ambas reacciones, obteniéndose valores comparables.

En la Tabla 3 se presentan los resultados en forma de % de degradación, observándose valores comparables para la enzima en forma soluble e inmovilizada.

CONCLUSIONES

La lacasa presenta un gran potencial para degradar oxitetraciclina en leche en condiciones de temperatura, pH y tiempo fáciles de aplicación a escala industrial. El uso de enzimas inmovilizadas presenta una gran ventaja ya que es posible reutilizar el biocatalizador y pensar en procesos continuos, lo que implica una disminución de los costos del uso de enzimas.

Los resultados de este trabajo son muy prometedores para pensar en el uso de enzimas para la degradación de antibióticos en leche de descarte.

Con respecto a los productos de degradación de los antibióticos es necesario hacer estudios cromatográficos y toxicológicos para determinar cuales son y su impacto. De esta forma se podría pensar en un descarte seguro para el ambiente, o posibles usos seguros de estas leches tratadas para alimentación de terneros.

REFERENCIAS

- Codex Alimentarius, 2017. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in food. CAC/MRL 2-2017.
- Guisán, J. 1988. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 375-382.
- López-Gallego, F., Montes, T., Fuentes, M., Alonso, N., Grazu, V., Betancor, L., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. 2005. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *J. Biotech.* 116(1), 1-10.
- Martínez, D.E., 2009. Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas en leche cruda en productores de Cooperleche. [En línea]. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala.[Consulta 28/8/2019]. Disponible en <http://www.repositorio.usac.edu.gt/3291/>
- Mate, D.M.; Alcalde, M. 2016. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology* 10(6), 1467-1467
- Ministerio de Salud Pública, 2013. Reglamento Bromatológico Nacional. Decretos 182/013 y 359/013. Montevideo, Uruguay.
- MVOTMA, 2016. Manual para la gestión ambiental de tambos. Montevideo, Uruguay