

UNIVERSIDAD DEL MAR
Campus Puerto Ángel



Evaluación de la capacidad catalítica de la enzima lacasa de *Trametes versicolor* inmovilizada sobre Ni^{2+} – agarosa para oxidar un colorante azo ABTS en solución

Tesis

Que para obtener el Título Profesional de
Licenciada en Ingeniería Ambiental

Presenta

Luz Elva Vega Salvador

Director

Dr. Edson Edinho Robles Gómez

Puerto Ángel, Oaxaca. Septiembre de 2021

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD DEL MAR, por brindarme la oportunidad de aprender y crecer en los aspectos académico, profesional, humano y cultural. Gracias por proveer el espacio y los recursos necesarios para poder concretar con gran satisfacción mi carrera universitaria.

AL Dr. EDSON EDINHO ROBLES GÓMEZ, quien me recibió con gran disposición y me dirigió en este proyecto de investigación, mostrando siempre resiliencia frente a los obstáculos que se nos presentaron en el camino. Gracias por el valioso tiempo y conocimientos concedidos, por depositar en mí su confianza y ayudarme a reconocer mis capacidades, así como en el desarrollo de nuevas.

A LA SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA por el financiamiento de esta tesis de investigación mediante el proyecto “Desarrollo de nuevos materiales desde residuos de lignina de origen industrial” a través del Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo Completo.

AL COMITÉ REVISOR, conformado por la M. en C. María del Rocío Gutiérrez Ortiz, el M. en C. Cervando Sánchez Muñoz, el M. en C. Cristóbal Santos Santos y el Dr. Aitor Aizpuru, por ser parte imprescindible de este proyecto a través de la disposición de su preciado tiempo y conocimiento, realizando las sugerencias correspondientes que permitieran la mejora del mismo.

A LA VICE-RECTORA ACADÉMICA, la Dra. María del Rosario Enríquez Rosado, por brindarme lecciones importantes respecto a la perspectiva de este proyecto académico. Además de cobijar con mucho cariño y atención a la generación 2015 – 2020 de Ingeniería Ambiental de esta universidad.

A LOS TÉCNICOS ASISTENTES de los laboratorios de Ingeniería Ambiental, la Q.F.B. Coral Mirón, la Ing. Oliva Sánchez, Frida Robles y Jorge Fernández que de principio a fin facilitaron el proceso experimental de este proyecto.

AL JEFE DE CARRERA, el Ing. Martín Zúñiga, quien no sólo ha dado de sí lo mejor, sino que también lo ha exigido a cada generación de Ingeniería Ambiental, además de brindar siempre el espacio para el pensamiento crítico en distintos aspectos de la vida.

A LOS PROFESORES – INVESTIGADORES que fueron parte trascendental en mi formación académica y profesional en la Universidad del Mar, quienes por su amor a la ciencia y a la docencia hacen más ameno e interesante el estudio.

DEDICATORIAS

A mis padres, Regina Natividad Salvador Nicolás y Juan José Vega Piñón, quienes con amor incondicional y trabajo duro me brindaron todas las herramientas para continuar estudiando. Permitir que su primera nena estudiara fuera de casa no fue fácil y a pesar de eso, dejaron que tomara mis propias decisiones. Mi gratitud es con ustedes por confiar en mí, por cada consejo siempre tan acertado y por apoyarme en todo momento. La culminación de esta etapa académica es para ustedes, mis dos grandes amores.

A mis hermanas, mis dos solecitos, Xunaxi Natividad Vega Salvador y Jazmín Vega Salvador, quienes vieron de cerca los momentos de desánimo y frustración que atravesé, no obstante, siempre estuvieron para mí, apapachándome con abrazos y palabras, alegrando y reinventando mis días, propiciando que en casa yo tuviese el espacio para poder concluir este proyecto.

A mis familias Vega Salvador, Cabrera Vega, Vega Reyna y Martínez Marín por manifestarme en muchas formas posibles el amor. Sus risas, sus voces, oraciones y bendiciones me abrazaron cada día que estuve cerca y lejos de casa. Ustedes son el refugio donde siempre deseo estar.

A los amigos más leales, nobles y divertidos que hasta ahora la vida y la mar me han brindado: Erick Vera, Julissa Regalado, Jesús Fabián, Karen Flores, Fernando Ruiz, Irving Guzmán y Debrah Jácome. Ustedes han llegado dándome tanta felicidad y plenitud. Gracias por creer en mí y en mis capacidades. Gracias por saber escuchar y acompañar.

A la M. en C. María del Rocío Gutiérrez Ortiz, al M. en C. Cervando Sánchez Muñoz y al Dr. Eustacio Ramírez Fuentes, porque además de dar de sí lo mejor en las clases, el nivel de empatía y cariño que tienen hacia sus alumnos es increíble. Gracias por llevar la docencia a otro nivel.

A mis compañeros de generación, “Los montoneros”: Neche, Almita, Dudu, Anita, Nito, Chimeo, Vege, Gau y los Omars (Méndez, Pachuca e Iván), por las jornadas de estudio compartidas, por enseñarme el verdadero significado de trabajar como equipo.

A cada trabajador y compañero de la Universidad del Mar, que cada día, por más cansancio que uno revelara, con su saludo y cordialidad hacían más gratos mis días

A todos los que me brindaron su compañía y procuraron mi bienestar.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. ENZIMAS	3
1.1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO DE LAS ENZIMAS	3
1.1.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA	5
1.1.3. TRANSFORMACIÓN DE LA ECUACIÓN DE MICHAELIS – MENTEN: GRÁFICA DEL DOBLE RECÍPROCO.....	9
1.1.4. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS	10
1.1.4.1. OXIDORREDUCTASAS	11
1.1.5. LACASAS	12
1.1.5.1. ESTRUCTURA DE LACASA DE <i>T. versicolor</i>	14
1.1.5.2. MECANISMO CATALÍTICO DE LAS LACASAS	16
1.2. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA	17
1.2.1. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN	17
1.2.1.1. INMOVILIZACIÓN FÍSICA	17
1.2.1.2. INMOVILIZACIÓN QUÍMICA.....	17
1.2.2. CARACTERÍSTICAS QUE DEBE REUNIR EL SOPORTE	18
1.2.3. CLASIFICACIÓN DE SOPORTES	19
1.2.3.1. ORGÁNICOS	19
1.2.3.2. INORGÁNICOS.....	19
1.2.4. RENDIMIENTO DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS	19
1.3. COLORANTES	20
1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS COLORANTES	20
1.3.2. COLORANTES AZO	21

1.3.2.1.	ABTS	21
2.	ANTECEDENTES	22
3.	JUSTIFICACIÓN	25
4.	HIPÓTESIS.....	26
5.	OBJETIVOS.....	26
5.1.	OBJETIVOS GENERALES.....	26
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5.3.	OBJETIVOS METODOLÓGICOS	26
6.	METODOLOGÍA.....	27
6.1.	EQUIPOS Y REACTIVOS.....	27
6.2.	ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA LACASA DE <i>T. versicolor</i>	27
6.3.	CARACTERIZACIÓN DE LACASA LIBRE	27
6.3.1.	EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA.....	27
6.3.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	28
6.3.3.	CÁLCULO DE CONSTANTES CINÉTICAS.....	28
6.4.	INMOVILIZACIÓN DE LACASA EN COLUMNA HisTrap HP	28
6.5.	MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LACASA INMOVILIZADA EN COLUMNA HisTrap HP	29
6.6.	ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LACASA LIBRE E INMOVILIZADA EN COLUMNA HisTrap HP RESPECTO AL TIEMPO	30
6.6.1.	LACASA LIBRE	30
6.6.2.	LACASA INMOVILIZADA	30
6.7.	STRIPPING DE LA COLUMNA HisTrap HP Y SU INTERACCIÓN CON ABTS	30
6.8.	ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LACASA CON NÍQUEL EN SOLUCIÓN	31
7.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	32

7.1.	ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS SUPERFICIALES DE LA LACASA DE <i>T. versicolor</i> ..	32
7.2.	CARACTERIZACIÓN DE LACASA LIBRE	34
7.3.	INMOVILIZACIÓN DE LACASA EN COLUMNA HisTrap HP	37
7.4.	ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LACASA LIBRE E INMOVILIZADA EN COLUMNA HisTrap HP Y SU ESTABILIDAD RESPECTO AL TIEMPO	38
7.5.	STRIPPING DE LA COLUMNA HisTrap HP Y SU INTERACCIÓN CON ABTS	39
7.6.	ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LACASA CON NÍQUEL EN SOLUCIÓN	40
8.	CONCLUSIONES	42
9.	PERSPECTIVAS.....	43
10.	BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXO A		50
	COLUMNA HisTrap HP	50
	CÁLCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	50
	DATOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LACASA LIBRE EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO Y DE pH	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Enlace peptídico (Nelson & Cox, 2005)	3
Figura 2	Niveles de estructura en una proteína (Modificado de Nelson & Cox, 2005).....	4
Figura 3	Mecanismo de catálisis (Modificado de Illanes, 2008)	6
Figura 4	Efecto de la [S] sobre la V_0 de una reacción enzimática (Modificado de Nelson & Cox, 2005).....	6
Figura 5	Gráfica del doble recíproco o de Lineweaver – Burk (Modificado de Nelson & Cox, 2005)	10
Figura 6	Modelo molecular de cintas de lacasa de <i>T. versicolor</i> (Piontek et al., 2002)	15
Figura 7	Estructura del dominio y la relación geométrica entre los sitios de cobre en lacasa (Solomon et al., 1996)	15

Figura 8 a) Modelo del centro catalítico de lacasa de <i>T. versicolor</i> y b) Representación del ciclo catalítico de lacasa (Modificado de Riva, 2006)	16
Figura 9 Métodos de inmovilización enzimática (Modificado de Ahmad & Sardar, 2015).....	18
Figura 10 Oxidación de ABTS a ABTS ^{•+} (Modificado de Branchi et al., 2005)	22
Figura 11 Mecanismo de unión entre residuos de histidina y una resina de Ni-NTA (Modificado de Bolanos - Garcia & Davies, 2006).....	24
Figura 12 Aminoácido treonina (Nelson & Cox, 2005)	33
Figura 13 a) Estructura tridimensional de la lacasa PDB: ID: 1KYA. b) Los aminoácidos en la superficie de la proteína con acceso a solvente. c) Aminoácidos en la superficie de lacasa con capacidad de coordinar a iones Ni ²⁺	34
Figura 14 Actividad específica de lacasa libre en función de la concentración de sustrato y pH	35
Figura 15 Gráfica del doble recíproco: Lineweaver – Burk para actividad enzimática de lacasa libre a pH 7	35
Figura 16 Estabilidad catalítica de lacasa libre e inmovilizada en columna HisTrap HP respecto al tiempo de almacenamiento	39
Figura 17 Columna HisTrap HP.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clases de enzimas (Modificado de Nelson & Cox, 2005)	11
Tabla 2 Métodos de inmovilización enzimática	17
Tabla 3 Tipos de soportes de enzima lacasa de <i>T. versicolor</i> (Modificado de Fernández-Fernández et al. 2013).....	23
Tabla 4 Volúmenes de reacción para las cinéticas enzimáticas de lacasa	27
Tabla 5 Composición de aminoácidos de la enzima lacasa de <i>T. versicolor</i>	32
Tabla 6 Análisis porcentual de los aminoácidos que se encuentran en la superficie de la lacasa	33
Tabla 7 Cuadro comparativo de constantes cinéticas de lacasa de <i>T. versicolor</i>	37

Tabla 8 Enzima lacasa retenida en la columna HisTrap HP	37
Tabla 9 Estabilidad catalítica de lacasa libre e inmovilizada en columna HisTrap HP respecto al tiempo de almacenamiento	38
Tabla 10 Interacción del ABTS con la resina de agarosa	40
Tabla 11 Actividad catalítica de lacasa con níquel en solución	40
Tabla 12 Distribución t – Student para actividad específica de lacasa a pH 3	53
Tabla 13 Distribución t – Student para actividad específica de lacasa a pH 5	54
Tabla 14 Distribución t – Student para actividad específica de lacasa a pH 7	54
Tabla 15 Distribución t – Student para actividad específica de lacasa inmovilizada en columna HisTrap HP respecto al tiempo de almacenamiento	55
Tabla 16 Actividad específica de lacasa libre respecto al tiempo de almacenamiento	56

INTRODUCCIÓN

Las lacasas son enzimas que pertenecen a la familia de las oxidasas multicobre y catalizan la oxidación de sustratos que contienen grupos funcionales como anillos aromáticos y fenoles (Riva, 2006). Su cadena polipeptídica se establece entre 220 y 800 aminoácidos, los cuales están organizados en tres dominios. Además, en su estructura se distribuyen 3 centros de Cu^{2+} , los cuales participan en la transferencia de electrones intermoleculares, conformando así el sitio activo (Arregui et al., 2019; Janusz et al., 2020).

El mecanismo catalítico de las lacasas en medio acuoso se basa en la formación de radicales a partir del sustrato, mediante el acoplamiento oxidativo entre el oxígeno molecular disuelto en agua, el sitio activo de la enzima y el sustrato. Las especies radicales generadas pueden sufrir diferentes procesos: un reordenamiento molecular, el rompimiento de enlaces o la reacción directa con otra molécula en el medio (Pezzella et al., 2015). Por ello, las lacasas pueden ser usadas en procesos sintéticos o de degradación; lo que, aunado a su baja especificidad de sustrato, hace que estas enzimas sean “herramientas ecológicas” adecuadas para una gran cantidad de aplicaciones (Binnington & Barrett, 1988; Pezzella et al., 2015). Dentro de las aplicaciones tecnológicas reportadas para las lacasas se encuentra su aprovechamiento en la industria textil, con especial interés en el blanqueamiento que estas producen sobre fibras teñidas (Riva, 2006; Rodríguez-Couto & Toca-Herrera, 2006; Pezzella et al., 2015).

Actualmente, una de las problemáticas ambientales más relevantes se relaciona con la baja calidad de los cuerpos de agua debido a la presencia de especies contaminantes, principalmente colorantes sintéticos (Fernández-Fernández et al., 2013). De estos colorantes, los más empleados en la actualidad son los colorantes azoicos (Legerská et al., 2018; Srinivasan et al., 2020), los cuales contienen un grupo funcional R-N=N-R , en donde R puede ser un fenol o anillos aromáticos, convirtiéndose así en un sustrato ideal para la lacasa. Por lo tanto, se propone la posibilidad de oxidar compuestos azoicos con la enzima lacasa como catalizador en medio acuoso. Sin embargo, la implementación no se ha llevado a cabo debido a la variación de pH, temperatura y fuerza iónica de los efluentes acuosos industriales, lo cual afecta la estabilidad estructural y funcional de la enzima (Chiacchierini et al., 2004; Mateo et al., 2007). El anterior problema generó la búsqueda de alternativas tecnológicas que evitaran la desnaturalización de la enzima y entre ellas surge la inmovilización de la enzima en un soporte inocuo a través de interacciones físicas o químicas (Chiacchierini et al., 2004; Mateo et al., 2007).

Dentro de los métodos de inmovilización química existe la inmovilización por coordinación, el cual hasta ahora ha sido poco empleado. Su principio químico se basa en que los iones de los metales de transición,

que contienen orbitales tipo d desocupados, tienen la capacidad de aceptar varios pares electrónicos libres provenientes de moléculas vecinas. Cada vez que el ion metálico acepta un par de electrones de su donador se genera un enlace de coordinación (Torres-Salas et al., 2011).

Con base en lo anterior, este trabajo considera que la enzima lacasa de *Trametes versicolor* puede funcionar como donador de pares electrónicos a un ion metálico, como el Ni^{2+} . Si inicialmente se tiene un sistema “soporte – ion”, donde el soporte es una matriz de agarosa y la especie iónica es Ni^{2+} parcialmente coordinado (*i.e.*, aún puede aceptar más pares electrónicos); y en un segundo plano están los pares electrónicos libres de las cadenas laterales de la lacasa, los cuales podrían coordinarse con el Ni^{2+} , formando así un sistema “soporte – ion – enzima”. Así mismo, se plantea la posibilidad de que la aplicación de este segundo sistema pueda mejorar el acceso de los sustratos al sitio activo de la enzima (debido a fenómenos superficiales como fisorción) y que, por tanto, se registre un aumento en su actividad (Torres-Salas et al., 2011).

Por lo que, se realizó un análisis general de la superficie de la enzima lacasa de *T. versicolor*. Se estableció que los aminoácidos superficiales de esta enzima pueden donar pares electrónicos y convertirse en potenciales ligandos de un ion metálico Ni^{2+} . Además, se diseñó una metodología que permite la inmovilización de la enzima lacasa de *T. versicolor* sobre una resina de agarosa – Ni^{2+} , que no ha sido reportada como soporte de lacasa en la literatura. La evaluación del sistema agarosa – Ni^{2+} – lacasa se realizó midiendo la actividad específica de la enzima para catalizar la oxidación de un colorante azo (el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico; ABTS) y se comparó con la actividad específica de dicha enzima en su forma libre (*i.e.*, no inmovilizada); esto bajo las mismas condiciones de pH, temperatura y concentración. Los datos obtenidos demuestran que la enzima inmovilizada, en contraste con la enzima libre, mostró mayor actividad catalítica, incluso 72 horas después de su almacenamiento. Como controles para comprobar la inmovilización, se evaluó la actividad específica del sistema lacasa – Ni^{2+} en solución, así como la interacción entre el soporte y el colorante en ausencia de la enzima. Los resultados muestran que el sistema lacasa – Ni^{2+} aumenta los valores de actividad catalítica, pero no tanto como lo hace el sistema agarosa – Ni^{2+} – lacasa. Además, el soporte es inerte a la oxidación del ABTS y que presenta una ligera adsorción inespecífica. Todos estos resultados respaldan que fue posible la obtención del sistema soportado agarosa – Ni^{2+} – lacasa. Por último, es importante destacar que este trabajo inicia un estudio racional en el diseño del sistema agarosa – Ni^{2+} – lacasa, que podría convertirse en una estrategia de oxidación de colorantes azoicos en soluciones acuosas.