

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***Degradación de Hidrocarburos Aromáticos
Policíclicos mediante el uso de la lacasa
recombinante de *Bacillus* sp. FNT***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

Constanza Francisca Bueno Nieto

Directores de Tesis:

Dra. Jenny Blamey Alegría

Dr. Edwar Fuentes Pérez

Santiago – Chile

Julio 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

CONSTANZA FRANCISCA BUENO NIETO

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica.

Directores de Tesis:

Dra. Jenny Blamey Alegría

Dr. Edwar Fuentes Pérez

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Lorena García Nannig

Dr. Mauricio Báez Larach

Dr. Ricardo Cabrera Paucar

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó en la Fundación Científica y Cultural Biociencia y en el Laboratorio de Química Analítica de Contaminantes Orgánicos y Elementos Traza, Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Financiado por el proyecto ANID/CONICYT PCI NSFC190024 y CORFO INNOVA N°15IPPID-45682.

AGRADECIMIENTOS

Quiero partir agradeciendo a mis directores de tesis. A la profe Jenny, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y mostrarme que se puede hacer ciencia con impacto internacional en Chile. Al profe Edwar, por haber aceptado ser mi patrocinante, por ayudarme a desenredar mis atados cuando me encontré con dificultades durante la tesis, por su gran espíritu docente.

Gracias a la Dra. Giannina Espina, quien, sin poder ser reconocida oficialmente, fue también mi tutora en este proyecto, liderando el team lacasa. Gracias por la motivación y por ayudarme a ver más allá siempre con tu punto de vista.

Gracias a todos los profesores que me hicieron clases, a quienes me dieron la oportunidad de realizar unidades de investigación en sus laboratorios y con quienes tuve la oportunidad de realizar divulgación científica.

A mi familia, mi mamá, mi papá y la Sofi, por apoyarme siempre en mis locuras, por estar ahí siempre que lo necesito. Por creer en mis capacidades e impulsarme también a creer en mí. Gracias por la comprensión, la entrega y el amor.

A les amigos que encontré a lo largo de la carrera y a quienes hicieron más ameno el camino, pero en especial a Gabi, Awka y Marce, gracias por ser un gran apoyo emocional.

A Javo, por todos los tecitos y el cariño. Por ser cobijo en los momentos más difíciles de este último proceso. Por su amor, su compañía y comprensión, sin ser parte del mundo científico.

A todas las personas que conocí en el camino gracias a la ANEB, que aunque el tiempo nos distanciara un poco, marcaron mi vida y me dieron la oportunidad de viajar y conocer distintos lugares del país y formar redes.

A las personas que conocí en la Fundación, a Max, gracias por las conversaciones interesantes sobre ciencia y la vida, a Litsy, Diego y Jorge, gracias por las sesiones sobre cine y series, por los almuerzos ricos y las salidas, un gusto haber compartido con ustedes estos tiempos de tesis.

Por último, gracias a mí. Por aguantar el binarismo de la academia. Por haber seguido adelante igual. Cuando hubo ganas de dejar todo tirado por las dificultades de la vida, por soportar la depresión, avanzar y cerrar ciclos.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ABREVIATURAS	12
RESUMEN	14
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	18
1.2. Contaminación del medioambiente acuático por HAPs	21
1.3. Biorremediación como alternativa de descontaminación de HAPs en agua	24
1.4. Lacasas: estructura y características	26
1.5. Potencial uso de lacasas para la biorremediación	29
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Medios de cultivo	35
3.2. Preparación del extracto crudo de enzima lacasa FNTL	35
3.3. Determinación de la concentración de enzima	36
3.4. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE)	37

3.5. Ensayo actividad lacasa	37
3.6. Espectroscopía de fluorescencia	39
3.7. Análisis de la degradación de HAPs mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	41
3.7.1. Evaluación de la degradación de HAPs por acción de la enzima FNTL	41
3.7.2. Evaluación de la influencia del pH del medio de reacción en la degradación de antraceno	41
3.7.3. Diseño de experimentos – metodología de superficie de respuesta	42
3.7.4. Confirmación de las condiciones optimizadas de degradación de HAPs	44
3.8. Parámetros cromatográficos	45
3.9. Análisis de datos	46
3.10. Análisis estadístico	46
4. RESULTADOS	47

4.1. Obtención de la enzima recombinante FNTL parcialmente purificada.....	47
4.2. Determinación preliminar de HAPs en medio de reacción sin enzima por espectroscopía de fluorescencia total	50
4.3. Determinación preliminar de la degradación de HAPs por acción de la enzima FNTL por espectroscopía de fluorescencia total	51
4.4. Evaluación de la degradación de HAPs por acción de la enzima FNTL mediante HPLC-DAD.....	55
4.4.1. Influencia del pH en la degradación de antraceno por acción de la enzima FNTL.....	57
4.4.2. Evaluación de la degradación de antraceno mediante diseño de experimentos.....	58
4.4.2.1. Uso de mediador ABTS	58
4.4.2.2. Uso de mediador AS	62
4.5. Confirmación de la degradación de antraceno utilizando los parámetros obtenidos en el diseño de experimentos.....	66
4.6. Extrapolación de las condiciones de reacción a la degradación de benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno.....	67
4.7. Detección de los compuestos de degradación de los HAPs estudiados.	69
5. DISCUSIÓN.....	72

<i>5.1. Actividad lacasa de la enzima recombinante FNTL parcialmente purificada</i>	72
<i>5.2. Determinación preliminar de HAPs y evaluación de su degradación por acción de la enzima lacasa FNTL mediante espectroscopía de fluorescencia total</i>	73
<i>5.3. Evaluación de la degradación de HAPs por acción de la enzima lacasa FNTL y sus mediadores, mediante HPLC-DAD</i>	76
<i>5.4. Posibles productos de la degradación de HAPs por la enzima FNTL</i>	82
6. CONCLUSIONES	85
7. PROYECCIONES	86
REFERENCIAS	87
Anexo	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores codificados y reales de las variables utilizadas en la evaluación de degradación de antraceno en el diseño de compuesto central.....	43
Tabla 2. Configuración experimental del diseño de compuesto central 2^2 para evaluar la degradación de ANT.....	44
Tabla 3. Comparación de la actividad lacasa en las distintas fracciones celulares obtenidas en la expresión de la enzima FNTL.....	49
Tabla 4. Porcentaje de oxidación de antraceno obtenido por la interacción de las variables evaluadas en el diseño de compuesto central 2^2 , por acción de la lacasa FNTL y el mediador ABTS.....	59
Tabla 5. Análisis de varianza de la regresión del modelo, evaluando porcentaje de degradación de antraceno mediante acción de la enzima FNTL y ABTS....	60
Tabla 6. Porcentaje de oxidación de antraceno obtenido por la interacción de las variables evaluadas en el diseño de compuesto central 2^2 , por acción de la lacasa FNTL y el mediador AS.....	63
Tabla 7. Análisis de varianza de la regresión del modelo, evaluando porcentaje de degradación de antraceno mediante acción de la enzima FNTL y AS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos incluidos en el listado de contaminantes prioritarios para la US EPA debido a sus efectos nocivos sobre la salud humana y los ecosistemas.	19
Figura 2. Representación esquemática de la activación metabólica del benzo[a]pireno en células de mamífero.	21
Figura 3. Representación esquemática de la estructura de la lacasa CotA de <i>B. subtilis</i>	28
Figura 4. Decoloración del colorante Azul Brillante de Remazol por la lacasa recombinante de <i>Bacillus sp. FNT</i>	33
Figura 5. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la preparación de enzima lacasa.	48
Figura 6. Espectroscopía de fluorescencia de la matriz de emisión-excitación de benzo[a]pireno 0,3 mg/mL.	51
Figura 7. Espectroscopía de fluorescencia de la matriz de emisión-excitación de los componentes de la mezcla de reacción.	52
Figura 8. Intensidad de fluorescencia del antraceno luego del tratamiento enzimático.....	53
Figura 9. Intensidad de fluorescencia del benzo[a]antraceno luego del tratamiento enzimático.....	54
Figura 10. Intensidad de fluorescencia del benzo[a]pireno luego del tratamiento enzimático.....	55
Figura 11. Degradación de 3 HAPs mediante el uso de la lacasa FNTL	56

Figura 12. Influencia del pH en la degradación de ANT por la enzima lacasa FNTL.....	58
Figura 13. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados generado a partir de la evaluación del porcentaje de degradación de antraceno mediante acción de la enzima FNTL y ABTS.	61
Figura 14. Gráfico de contorno generado a partir de los resultados experimentales del diseño de experimentos al utilizar enzima FNTL y ABTS. .	61
Figura 15. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados generado a partir de la evaluación del porcentaje de degradación de antraceno mediante acción de la enzima FNTL y AS.....	65
Figura 16. Gráfico de contorno generado a partir de los resultados experimentales del diseño de experimentos al utilizar enzima FNTL y AS.....	65
Figura 17. Evaluación de la degradación de antraceno en el tiempo, mediante el uso de enzima FNTL y mediadores ABTS o AS	67
Figura 18. Evaluación de la degradación de benzo[a]antraceno en el tiempo.	68
Figura 19. Evaluación de la degradación de benzo[a]pireno en el tiempo	69
Figura 20. Cromatograma de la muestra de reacción de antraceno con enzima FNTL y ABTS.....	70
Figura 21. Cromatograma de la muestra de reacción de benzo[a]antraceno con enzima FNTL.	71
Figura 22. Cromatograma de la muestra de reacción de benzo[a]pireno con enzima FNTL y ABTS	71

ABREVIATURAS

2,6-DMP	2,6-dimetilfenol
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ANT	Antraceno
APM	Alto peso molecular
AS	Acetosiringona
BaA	Benzo[a]antraceno
BaP	Benzo[a]pireno
BPM	Bajo peso molecular
BSA	Albúmina de Suero bovino, del inglés <i>Bovin Serum Albumin</i>
CYP1	Citocromo p 450 familia 1
EEM	Matriz de excitación-emisión
EPR	Resonancia paramagnética electronica
ET	Transferencia de electrones, del inglés <i>electron transfer</i>
FNTL	Lacasa de <i>Bacillus</i> sp. FNT
GC-MS	Cromatografía de gases con espectrometría de masas
HAP	Hidrocarburo Aromático Policíclico
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno, del inglés <i>hydrogen atom transfer</i>
HBT	1-hidroxibenzotriazol

HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos
IF	Intensidad de fluorescencia
IP	Potencial de ionización
L-DOPA	Levodopa / L-3,4-dihidroxifenilalanina
MCOs	Multicobre oxidasas
One-way ANOVA	Análisis de varianza de una vía
SA	Siringaldehido
SC	Suma de cuadrados
SCM	Suma de cuadrados medios
SD	Desviación estándar, del inglés <i>standar deviation</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes
SGZ	Siringaldazina

RESUMEN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son contaminantes orgánicos generados por la combustión incompleta de sustancias orgánicas, que representan un riesgo para los ecosistemas y la salud humana debido a sus efectos cancerígenos, teratogénicos y mutagénicos. La contaminación por HAPs en el agua ha aumentado debido al crecimiento industrial y energético. La biorremediación, que utiliza biocompuestos generados por la actividad metabólica de microorganismos, como las enzimas, es una estrategia amigable con el medio ambiente para eliminar estos contaminantes. Las lacasas son enzimas presentes en diversos organismos, que pueden catalizar la oxidación de una amplia gama de compuestos, produciendo agua como subproducto. Así, las lacasas se presentan como potencial herramientas para la biorremediación de aguas contaminadas con HAPs.

En Fundación Científica y Cultural Biociencia, se purificó una lacasa a partir una bacteria termoalcalófila denominada *Bacillus* sp. FNT. De forma recombinante, esta nueva lacasa presenta una alta actividad catalítica, termoactividad y estabilidad térmica respecto de otras enzimas. Además, se ha observado la decoloración de tintes tipo antraquinónicos con estructura policíclica aromática de gran tamaño.

En base a estos antecedentes, se propone que la lacasa recombinante proveniente del microorganismo termoalcalófilo *Bacillus* sp. FNT cataliza la degradación de antraceno (ANT), benzo[a]antraceno (BaA) y benzo[a]pireno

(BaP). Los objetivos específicos de este trabajo han sido evaluar la degradación de tres HAPs de reconocida toxicidad mediante el uso de la lacasa recombinante de *Bacillus* sp. FNT y detectar los compuestos de degradación de los HAPs.

Se estudió la degradación de tres HAPs, utilizando la enzima FNTL y los mediadores redox ABTS y AS, mediante espectroscopía de fluorescencia total y por cromatografía líquida de alta eficiencia. Mediante esta última técnica, se profundizó el estudio de la degradación de ANT mediante un diseño de experimento, siendo las condiciones óptimas de degradación pH 5,0 y 16 días de reacción al emplear FNTL y ABTS. Al confirmar dichos parámetros, se obtuvo un 65% de oxidación, sin cambios significativos al aumentar el tiempo de incubación a 20 días.

Finalmente, se estudió la oxidación de BaA y BaP en las condiciones optimizadas de degradación de ANT, obteniendo una degradación directa de BaA por la enzima FNTL con un 30% de oxidación a los 16 días de incubación. Para el caso de BaP, se obtuvo cerca de un 70% de degradación empleando la enzima FNTL y mediador ABTS, a los 16 días de incubación de la reacción.

Los resultados obtenidos aportan nueva evidencia sobre el uso aplicado de lacasas provenientes de bacterias termófilas, sentando precedentes para evaluar el posible uso de esta enzima como una alternativa de degradación de los HAPs en aguas contaminadas.

ABSTRACT

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are organic pollutants generated by the incomplete combustion of organic substances, posing a risk to ecosystems and human health due to their carcinogenic, teratogenic, and mutagenic effects. PAHs contamination in water has increased due to industrial and energy growth. Bioremediation, which uses biocomposites generated by the metabolic activity of microorganism, such as enzymes, is an environmentally friendly strategy to eliminate these contaminants. Laccases are enzymes present in various organisms that can catalyze the oxidation of a wide range of compounds, producing water as a byproduct. Therefore, laccases are potential tools for the bioremediation of PAH-contaminated water.

At Fundación Científica y Cultural Biociencia, a laccase was purified from a thermoalkalophilic bacterium called *Bacillus* sp. FNT. This recombinant laccase exhibits high catalytic activity, thermoactivity, and thermal stability compared to other enzymes. Additionally, it has been observed that the laccase is capable of decolorizing anthraquinone-type dyes with a large polycyclic aromatic structure.

Based on these findings, it is proposed that the recombinant laccase from the thermoalkalophilic microorganism *Bacillus* sp. FNT catalyzes the degradation of anthracene (ANT), benzo[a]anthracene (BaA), and benzo[a]pyrene (BaP). The specific objectives of this work have been to evaluate the degradation of three highly toxic PAHs using the recombinant laccase from *Bacillus* sp. FNT and to detect the degradation products of the PAHs.

The degradation of PAHs was studied using the FNTL enzyme and the redox mediators ABTS and AS, employing total fluorescence spectroscopy and high-performance liquid chromatography. Through this latest technique, the study of ANT degradation was further investigated through a design of experiment, with the optimal degradation conditions being pH 5,0 and a reaction time of 16 days using FNTL and ABTS. Upon confirming these parameters, a 65% oxidation was achieved, with no significant changes observed when increasing the incubation time to 20 days.

Finally, the oxidation of BaA and BaP was studied under the optimized conditions for ANT degradation, resulting in a direct degradation of BaA by the FNTL enzyme with 30% oxidation after 16 days of incubation. For BaP, a degradation of approximately 70% was obtained using the FNTL enzyme and ABTS mediator after 16 days of reaction.

The obtained results provide new evidence on the applied use of thermophilic bacterial laccases, paving the way to evaluate the potential application of this enzyme as an alternative for the degradation of PAHs in contaminated water.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son contaminantes orgánicos compuestos por dos o más anillos de benceno fusionados, ampliamente dispersos en ambientes terrestres y acuáticos. Ingresan a éstos a través de fuentes naturales, como la descomposición orgánica, biosíntesis y erupciones volcánicas, y fuentes antropogénicas, como la incineración incompleta de combustibles, de carbón, petróleo, gas, madera, basura y otras sustancias orgánicas, como tabaco y carne asada al carbón, los incendios forestales y desechos municipales (Alegbeleye *et al.*, 2017). Estos grupos de compuestos han demostrado ser cancerígenos, teratogénicos, mutagénicos (Gyórfy *et al.*, 2004; Henkler *et al.*, 2012), y sus efectos nocivos sobre los ecosistemas y la salud humana representan una grave problemática

Debido a su persistencia y toxicidad, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA, por sus siglas en inglés *United States Environmental Protection Agency*), ha incluido 16 HAPs en la lista de contaminantes orgánicos de alta prioridad. Estos incluyen naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, benzo[g,h,i]perileno, benzo[a]pireno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno (US EPA, 1998; US EPA, 2008) (Figura 1).

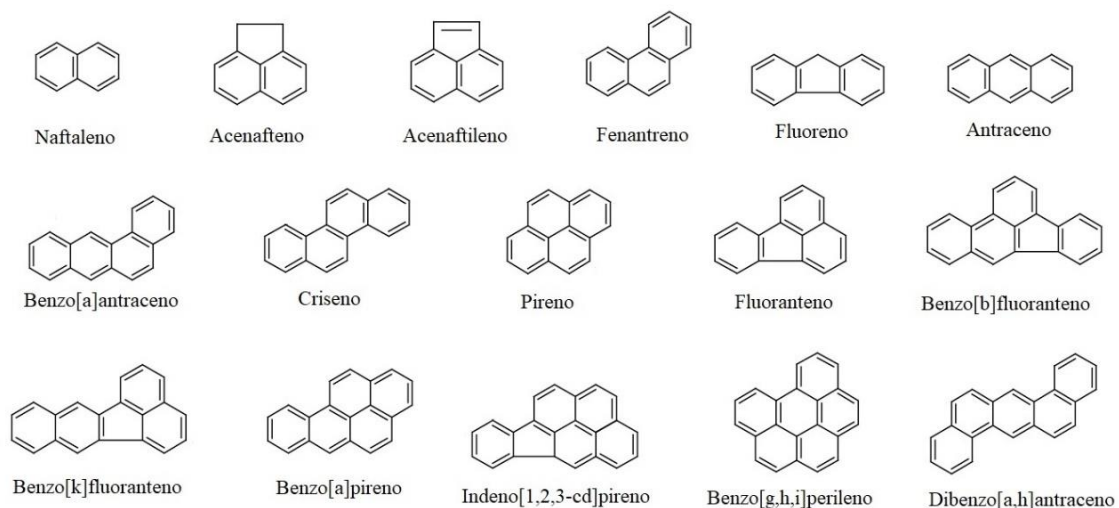


Figura 1. Estructura de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos incluidos en el listado de contaminantes prioritarios para la US EPA debido a sus efectos nocivos sobre la salud humana y los ecosistemas. (Modificado de Yan *et al.*, 2004)

Los HAPs pueden ser clasificados en dos grupos basados en su peso molecular: se consideran de bajo peso molecular (BPM) si tienen 2 o 3 anillos, y de alto peso molecular (APM) si tienen cuatro o más anillos. Los HAPs BPM son más susceptibles a la degradación y volatilización, comparado con los APM. A medida que el peso molecular incrementa, la hidrofobicidad incrementa, y la solubilidad en agua y presión de vapor disminuyen, lo que los hace compuestos altamente recalcitrantes según aumenta su tamaño (Alegbeleye, 2017).

Para expresar el potencial mutagénico y carcinogénico, los HAPs requieren activación metabólica. En células de mamífero, el metabolismo ocurre principalmente en los microsomas del retículo endoplásmico, catalizado por la enzima monooxigenasa del citocromo P450 (CYP1). Los metabolitos primarios

son epóxidos, que pueden reordenarse espontáneamente en fenoles o sufrir una transformación metabólica adicional. Por acción de la enzima epóxido hidrolasa, se producen trans-dihidrodiol. Los fenoles y dihidrodiol son excretados principalmente como ésteres glucurónicos y de sulfato. El metabolismo oxidativo adicional de los fenoles y dihidrodiol por enzimas del citocromo P450 produce quinonas, epóxidos de diol y otros productos de mayor oxidación. Los epóxidos de diol son uno de los principales metabolitos carcinógenos activos de la mayoría de los HAPs, ya que pueden ser transformados por enzimas deshidrogenasas en orto-quinonas, las que pueden unirse covalentemente al ADN o participar en la generación de especies reactivas de oxígeno, como radicales hidroxilos y anión superóxido, los que pueden atacar el ADN. Otra ruta de activación comprende la sustracción de un electrón del metabolito primario epóxido por el CYP1 o peroxidasas, lo que lleva a la formación de radicales catiónicos que pueden formar aductos con el ADN, dando como resultado la depurinación (Harvey, 1998; Mastandrea *et al.*, 2005; Vondráček, & Machala, 2021) (Figura 2).

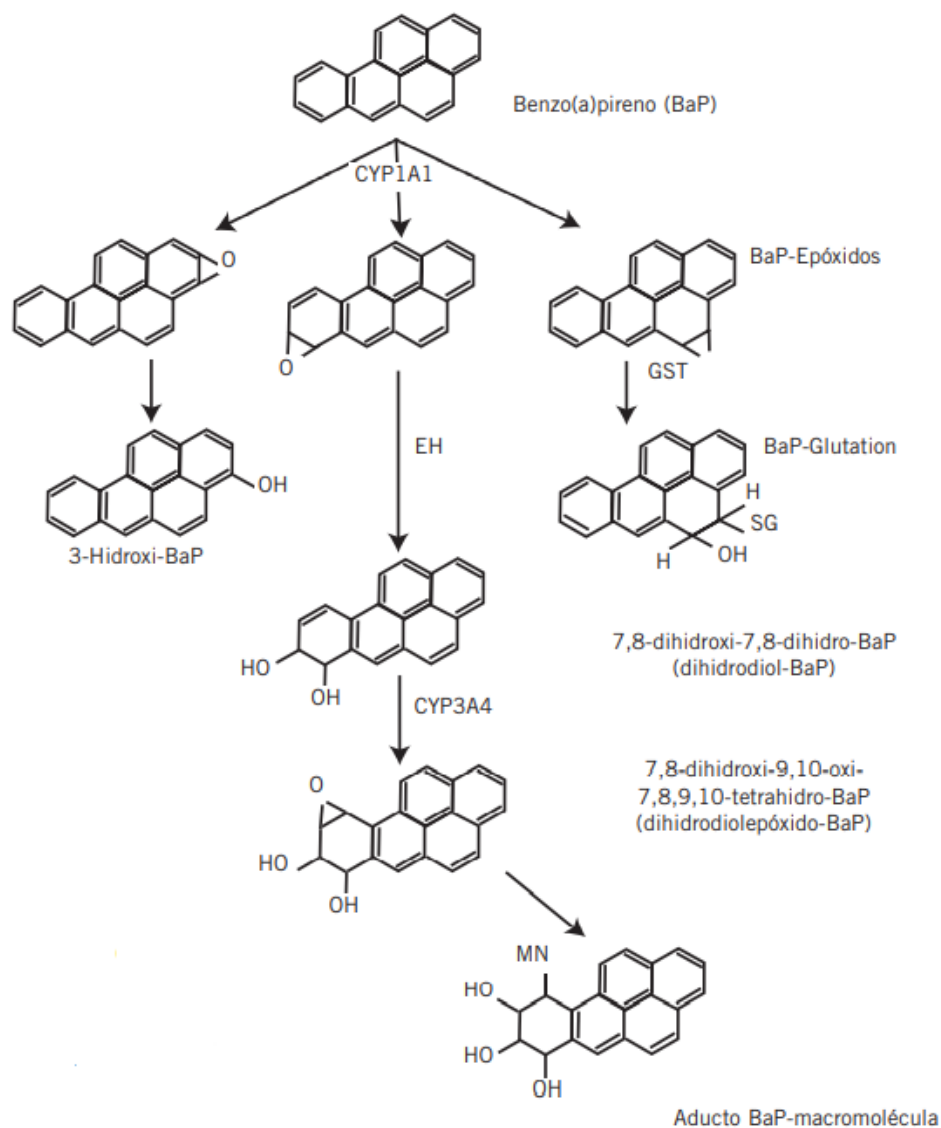


Figura 2. Representación esquemática de la activación metabólica del benzo[a]pireno en células de mamífero. Extraído de Mastandrea *et al.*, 2005.

1.2. Contaminación del medioambiente acuático por HAPs

Con el aumento de las actividades industriales y el desarrollo de actividades relacionadas a la producción de energía, se ha percibido un aumento concomitante de la contaminación por los HAPs en el medio ambiente acuático.

En el año 2002, se estima que la descarga global de HAPs en el ecosistema

acuático fue más de 80.000 toneladas por año (Wright & Welbourn, 2002). Los HAPs pueden persistir en el agua por un largo periodo de tiempo, ya que son menos sensibles a la fotooxidación que en el aire, debido a su hidrofobicidad y los efectos de dilución inducido por turbulencias (Chen & White, 2004). Algunas fuentes puntuales de HAPs en el medio acuático incluyen la descarga de aguas residuales municipales (Abdel-Shafy & Mansour, 2016), los derramamientos de petróleo y las actividades pesqueras de embarcaciones menores con motor fuera de borda (Bonert *et al.*, 2006); mientras que las fuentes no puntuales incluyen la escorrentía de aguas urbanas y superficiales de diversos tipos de uso del suelo y la atmósfera. La distribución y el destino de los distintos HAPs están fuertemente influenciados por su solubilidad e hidrofobicidad relativa.

En el ambiente acuático, los HAPs son absorbidos rápidamente en la materia particulada, por lo que generalmente se encuentran en concentraciones más altas en los sedimentos y más bajas en el agua superficial y las columnas de agua (Stigliani *et al.*, 1993).

Los sedimentos representan los cambios químicos y equilibrios de la solubilidad de los elementos orgánicos e inorgánicos contenidos en la columna de agua, por lo que es una manera de realizar una trazabilidad de los eventos ocurridos en la zona. Rudolph *et al.*, en 2002, evaluaron y detectaron la presencia y concentración de HAPs en los sedimentos marinos en la Bahía Concepción,

Chile. Por medio de un muestreo de cinco estaciones de la bahía, se identificaron principalmente a los HAPs antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno. Luego de analizar la relación entre la concentración de estas especies y su distribución, sugieren que el antraceno provendría principalmente de precursores biogénicos, el fenantreno de oxidación de materia orgánica residual y aguas servidas, el fluoranteno de contaminación por hidrocarburos y el pireno por vía fluvial generado desde incendios forestales en la región (Rudolph *et al.*, 2002). Del mismo modo, Aguirre-Martínez *et al.*, en 2009, evaluaron el contenido de HAPs en sedimentos de los puertos de Iquique, Patache, Talcahuano, San Vicente y caleta Coliumo, donde se obtuvo que el puerto de San Vicente presentó las mayores concentraciones de HAPs de alta toxicidad, destacando la presencia de benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno y benzo[b]fluoranteno. Los autores sugieren que el benzo[b]fluoranteno provendría principalmente de residuos de aceites y grasas lubricantes de aguas de sentina, que aumenta sus concentraciones por residuos de la descarga de la pesca; benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno se asocia a derivados de residuos de petróleo y a productos refinados del petróleo. La mayor concentración de estos HAPs en San Vicente se explicaría por la existencia de un terminal de descarga de petróleo en el área (Aguirre-Martínez *et al.*, 2009).

Debido al potencial efecto cancerígeno y mutagénico de los HAPs, la US EPA ha establecido límites máximos permitidos para algunos HAPs en agua: 0,2 µg/L

para benzo[a]pireno, 0,1 µg/L para benzo[a]antraceno y 0,2 µg/L para la mezcla de benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno y criseno (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2009).

1.3. Biorremediación como alternativa de descontaminación de HAPs en agua

Se han utilizado varios enfoques y estrategias para mitigar los efectos de estos contaminantes y remediar los sitios contaminados, que incluyen la remoción, alteración o el aislamiento del contaminante, que luego es procesado ya sea por tratamiento térmico (incineración, vitrificación, pirólisis y desorción de suelos) o por métodos fisicoquímicos, como la extracción por solventes. Algunas de estas técnicas de remediación convencionales tienen importantes limitaciones, tales como su complejidad tecnológica, alto costo y la falta de aceptación pública. La mayoría de las técnicas son invasivas o simplemente consiste en trasladar el problema de contaminación a un sitio diferente, lo que a menudo requiere una mayor gestión de residuos (Alegbeleye *et al.*, 2017). Aquí radica la importancia de identificar, estudiar e implementar nuevas herramientas efectivas y amigables con el medioambiente para tratar de mejorar la calidad del agua.

La biorremediación es un proceso que implica la transformación de compuestos orgánicos nocivos en compuestos menos dañinos o inocuos mediante la utilización de la capacidad metabólica de los microorganismos, acelerando el

proceso de biodegradación. Para esto, se han aislado y caracterizado varios microorganismos, incluidos bacterias y hongos, que tienen la capacidad de degradar distintos HAPs en compuestos menos complejos, que son transformados en H₂O y CO₂ mediante procesos aeróbicos, o en CO₂ y CH₄ mediante procesos anaeróbicos, proceso conocido como mineralización (Haritash *et al.*, 2009; Alegbeleye *et al.*, 2017). Sin embargo, esta técnica se ve limitada por las condiciones de cultivo, el grado de toxicidad de los HAPs, lo que podría generar inhibición del crecimiento de los microorganismos, la necesidad de adición de otras fuentes de carbono, entre otras (Haritash *et al.*, 2009). Además, la transformación de los contaminantes puede llevar a la obtención de productos más tóxicos o peligrosos, donde muchos de los estudios de biorremediación y mineralización no llegan a definir estos compuestos de degradación.

La capacidad metabólica de los microorganismos está definida principalmente por sus enzimas, por lo que se han utilizado estrategias donde utilizan estas enzimas aisladas de bacterias, hongos y otros organismos para la descontaminación de HAPs (Patel *et al.*, 2020). Las enzimas multicobre oxidadas (MCOs) son enzimas oxidorreductasas que acoplan la oxidación de un sustrato aromático a la reducción de oxígeno diatómico, cuyo principal subproducto de la reacción enzimática es agua (Yaropolov *et al.*, 1994). Es por esto, que las MCOs

representan una alternativa como herramienta amigable para la biorremediación del medio ambiente.

1.4. Lacasas: estructura y características

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son MCOs que catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos, como fenoles, diaminas, aminas aromáticas, compuestos no fenólicos y compuestos inorgánicos, junto a la reacción de reducción de oxígeno asociada. Las lacasas son utilizadas como catalizadores verdes para diversas aplicaciones, como biosensores, deslignificación de madera, industria textil y tratamiento de aguas (Chauhan *et al.*, 2017; Mate & Alcalde, 2017).

Estas enzimas son altamente expresadas en diversas especies, se pueden obtener a partir de hongos, plantas, bacterias e insectos. En dichos organismos, su función está asociada a la detoxificación, defensa frente a otros organismos, morfogénesis, pigmentación celular, oxidación de toxinas y protección contra agentes oxidantes y luz UV (Janusz *et al.*, 2020).

Estructuralmente, las lacasas contienen cuatro sitios de cobre, que difieren en sus características espectroscópicas y paramagnéticas, y se clasifican en tres grupos: un sitio de cobre Tipo 1 (Cu T1), un sitio de cobre tipo 2 (Cu T2) y dos sitios de cobre tipo 3 (Cu T3) (Figura 3). El Cu T1 es el aceptor principal de

electrones, es rápidamente reducido por el sustrato mediante una reacción de un electrón. Está coordinado por dos residuos de histidina y un residuo de cisteína, con un ligando axial variable (Barrios-Estrada *et al.*, 2018). Las lacasas de bajo potencial redox ($< +460$ mV), que se encuentran típicamente en plantas y bacterias, contienen metionina como ligando axial en el Cu T1; las de potencial redox medio ($+460-710$ mV), reportados típicamente en ascomicetos y otros hongos que degradan lignina, contienen el residuo leucina no ligado, en la posición axial del Cu T1; y las de potencial redox alto (>710 mV), típicas en basidiomicetos, contiene el residuo fenilalanina en la misma posición (Arregui *et al.*, 2019). El intenso color azul de la enzima está asociado con la transferencia de carga entre el azufre de la cisteína y el átomo de cobre en el Cu T1, lo que da como resultado una banda de absorción intensa cercana a los 600 nm. La transferencia de carga de la cisteína al cobre también es responsable de una señal electroparamagnética (EPR) característica. El ligando cisteína del Cu T1 está asociado con la transferencia de electrones desde el Cu T1 al centro trinuclear, mediante el enlace con los dos motivos de histidina coordinados por cada Cu T3. El Cu T2 está coordinado por dos residuos de histidina y una molécula de agua como ligando. A diferencia del Cu T1, el Cu T2 no presenta banda de absorción observable, pero sí una señal EPR específica. Los Cu T3 son responsables de la absorción de oxígeno; están coordinados con tres histidinas y un puente hidroxilo, este último es el responsable de la banda de absorción a 330 nm (Barrios-Estrada *et al.*, 2018)

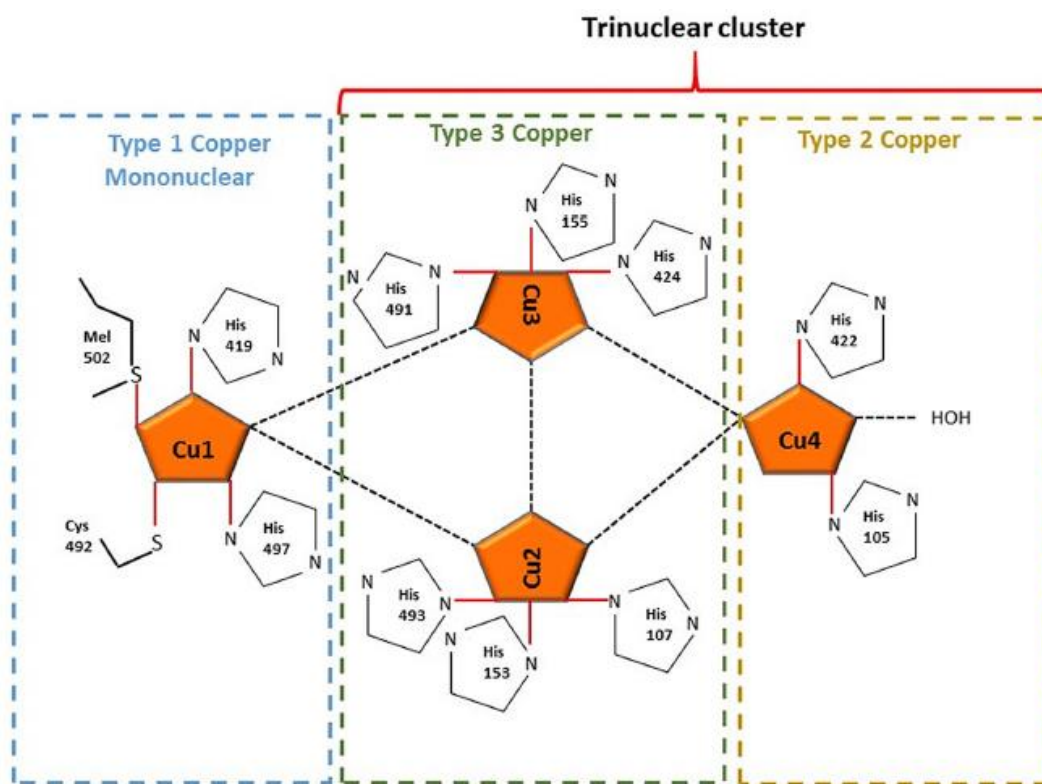


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de la lacasa CotA de *B. subtilis*. Modificado de Barrios-Estrada *et al.*, 2018.

Las lacasas son enzimas que oxidan una amplia gama de sustratos. Pueden catalizar la síntesis y la reacción de degradación de varios compuestos orgánicos y aromáticos. Sustratos como ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 2,6-dimetilfenol (2,6-DMP), siringaldazina (SGZ), acetosiringona (AS), guayacol y L-DOPA, se utilizan ampliamente, siendo los primeros tres los sustratos más utilizados para los ensayos y estudios enzimáticos de la lacasa. Sin embargo, una gran cantidad de sustratos, como lo son varios colores tipo azo o antraquinónicos, no pueden ser oxidados directamente por la lacasa, ya que poseen un alto potencial redox o son

demasiado grandes para caber en el sitio activo de la enzima, por lo que requieren de un mediador entre ellos y la lacasa para llevar a cabo la reacción, lo que se conoce como sistema mediador de lacasa (LMS). Los mediadores son generalmente sustratos de lacasa de bajo peso molecular, cuya oxidación enzimática provoca intermediarios estables de alto potencial redox; éstos reaccionan químicamente con otros compuestos que no pueden ser oxidados directamente por la lacasa. Estos mediadores pueden ser naturales, como siringaldehído (SA) y AS, o sintéticos, como ABTS y 1-hidroxibenzotriazol (HBT) (Guan *et al.*, 2018).

1.5. Potencial uso de lacasas para la biorremediación

Las lacasas han sido mayoritariamente descritas y caracterizadas a partir de plantas y hongos, donde las lacasas fúngicas son las más utilizadas en aplicaciones biotecnológicas para la biorremediación de aguas residuales industriales. Estas enzimas funcionan eficientemente en condiciones ácidas suaves (pH 4-6), mientras que el rango de temperatura para la actividad catalítica está entre los 30-55°C. Entre sus aplicaciones, se ha descrito la utilización de las lacasas fúngicas en la oxidación de HAPs. En un estudio realizado por Hu *et al.*, en 2007, utilizaron la lacasa de *T. versicolor* para oxidar benzo[a]pireno, identificando los intermediarios de degradación y evaluando la citotoxicidad y genotoxicidad de dichos metabolitos en cultivos primarios y líneas celulares (Hu *et al.*, 2007). En otro estudio, utilizaron la lacasa comercial de *T. versicolor* para

evaluar la degradación de fenantreno, antraceno, benzo[a]antraceno y benzo[b]fluoranteno, donde identificaron los compuestos de degradación de benzo[a]antraceno y propusieron el mecanismo por el cual la enzima es capaz de degradar dicho HAP (Xu *et al.*, 2020).

En contraste con lo anteriormente mencionado, la información sobre las aplicaciones de las lacasas bacterianas en la degradación de HAPs es más acotada. Las características bioquímicas más importantes de las lacasas bacterianas son su estabilidad en varias condiciones de pH, temperatura, solventes orgánicos y concentración de sales (Arregui *et al.*, 2019). En un estudio realizado por Zeng *et al.* en 2011, se utilizó el extracto crudo de la lacasa CueO de *E. coli* para evaluar la degradación de antraceno, benzo[a]pireno, naftaleno y fluoreno (98-94%), acenaftileno (87%), fenantreno (52%) y benzo[a]antraceno (41%), además de obtener los compuestos de degradación de antraceno y benzo[a]pireno (Zeng *et al.*, 2011). En otro estudio, se utilizó la enzima purificada CotA de *B. subtilis* para evaluar la oxidación de 15 HAPs, obteniendo un mayor porcentaje de degradación de antraceno y benzo[a]pireno (>80% a 60°C) (Zeng *et al.*, 2016). En el estudio realizado por Dai *et al.*, en 2020, se utilizó un sistema de consorcio bacteriano más una lacasa inmovilizada para evaluar la degradación de piscinas experimentales contaminadas por petróleo. Específicamente, se utilizó la enzima recombinante de *B. subtilis* cepa 168 inmovilizada, en un consorcio bacteriano de *Brevibacillus* sp. DL-1, *Bacillus* sp.

DL-13, y *Acinetobacter* sp. DL-34, bacterias capaces de degradar petróleo. Del estudio, se obtuvo que dicho sistema pudo degradar a los HAPs de más de tres anillos bencénicos (Dai *et al.*, 2020).

Por otro lado, las lacasas provenientes de bacterias termófilas han demostrado una funcionalidad y comportamiento diferente con respecto a sus contrapartes mesófilas, particularmente en ambientes de alta temperatura (Chandra & Chowdhary, 2015). Son generalmente más resistentes a la desnaturalización y pérdida de actividad que sus contrapartes mesófilas. En el trabajo realizado por Rahimi *et al.*, 2022, se evaluó el uso de la lacasa proveniente de la bacteria halófila *Alkalibacillus salilacus* para la degradación de antraceno (Rahimi *et al.*, 2022). Además, se utilizó esta misma lacasa para evaluar la degradación de fenantreno (Valizadeh *et al.*, 2022).

En Fundación Científica y Cultural Biociencia, se logró purificar una lacasa a partir de una bacteria termoalcalófila formadora de esporas, identificada como *Bacillus* sp. FNT, aislada de una muestra ambiental de un sitio geotermal. La enzima nativa presenta su máxima actividad a 70°C y pH 7,0, y debido a estas interesantes características se desarrolló la versión recombinante de esta lacasa, que es sobreexpresada de forma soluble y funcional en *E. coli* BL21. Al caracterizarla bioquímicamente, demostró ser altamente termoactiva y termoestable, con una actividad catalítica muy alta hacia siringaldazina,

guayacol, ácido gálico y ABTS. Específicamente, al realizar el ensayo enzimático con el sustrato siringaldazina, la enzima presentó actividad a temperaturas entre 20 y 90°C. A 80°C, se obtuvo una actividad específica de 515.000 U/mg; mientras que, a 20°C, se obtuvo una actividad específica de 75.000 U/mg (Espina *et al.*, 2021). Al comparar estos valores con la lacasa comercial de *Rhus vernicifera* (L2157, Sigma-Aldrich), que posee una actividad específica de 50 U/mg a 30°C, utilizando el mismo ensayo y definición de unidad enzimática, se evidencia y destaca la alta actividad que tiene la lacasa recombinante de *Bacillus* sp. FNT en un amplio rango de temperatura.

Además, se ha observado que a 40°C la enzima es capaz de efectuar la rápida decoloración de tintes sintéticos tipo azo, como rojo congo, naranja de metilo y rojo de metilo; tipo triarilmetano, como verde malaquita, azul bromofenol, cristal violeta y azul de Coomassie R250; y colorantes tipo antraquinónicos como azul brillante de remazol (Espina *et al.*, 2021) (Figura 4a). Este último es de mayor relevancia para esta investigación, ya que posee una estructura policíclica aromática de gran tamaño, lo que sugiere que la lacasa FNT podría tener actividad catalítica frente a los HAPs (Figura 4b).

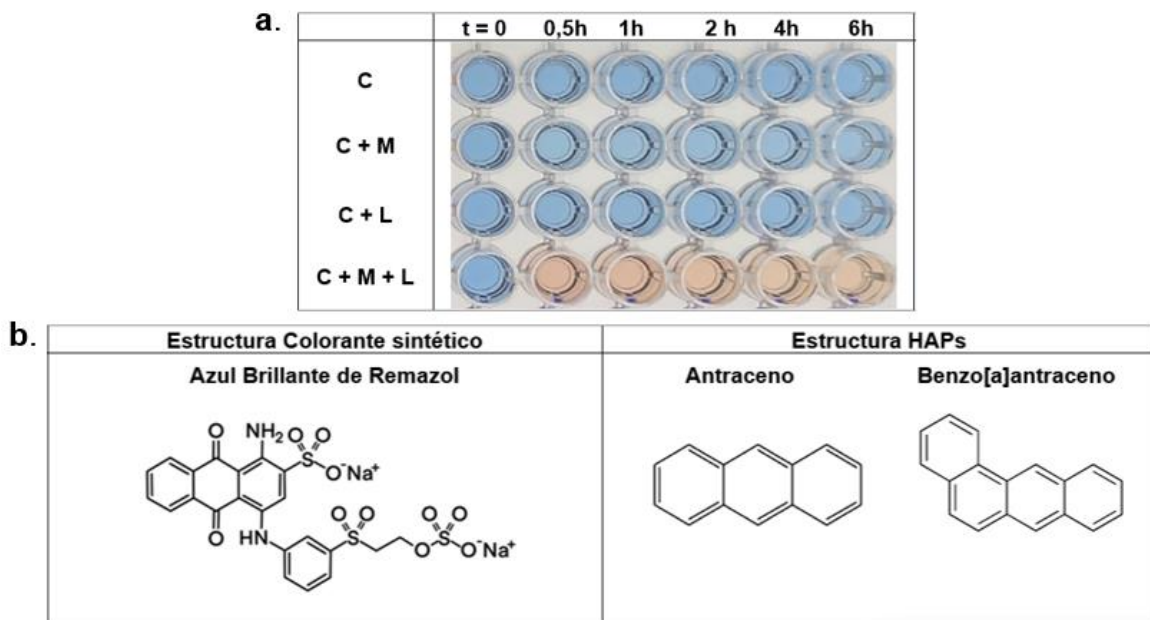


Figura 4. Decoloración del colorante Azul Brillante de Remazol por la lacasa recombinante de *Bacillus* sp. FNT. La reacción fue incubada a 40°C y 150 rev/min. C: Colorante (50 mg/L); M: Mediador acetosiringona 2 mM; L: lacasa 0,1 mg/ml. **a.** Evaluación de la decoloración en el tiempo. **b.** Comparación de las estructuras del colorante tipo antraquinónico y los HAPs. Modificado de Espina *et al.*, 2021

Esta nueva enzima lacasa bacteriana recombinante presenta una actividad catalítica mucho mayor que su versión nativa y es muy superior en términos de termoactividad y estabilidad térmica a otras enzimas, sobre todo fúngicas. Debido a los antecedentes presentados, se propone que la lacasa recombinante de *Bacillus* sp. FNT tiene un gran potencial para ser utilizada en la degradación de HAPs para el tratamiento de agua contaminada.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

La lacasa recombinante proveniente del microorganismo termoalcalófilo *Bacillus* sp. FNT cataliza la degradación de antraceno, benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la degradación de tres hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), antraceno, benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno, mediante el uso de la lacasa recombinante de *Bacillus* sp. FNT.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la degradación de tres HAPs de reconocida toxicidad mediante el uso de la lacasa recombinante de *Bacillus* sp. FNT.
2. Detectar los compuestos de degradación de los HAPs.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Medios de cultivo

Se utilizó el medio Luria-Bertani para preparar los preinóculos de *E. coli* BL21, que contiene triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L. Se utilizó el medio de autoinducción TBA-Cu para crecer las cepas recombinantes que expresan la enzima lacasa de *Bacillus* sp. FNT (FNTL), que contiene triptona 12 g/L, levadura 24 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3,3 g/L, KH₂PO₄ 6,8 g/L, Na₂HPO₄ 7,1 g/L, glucosa 0,5 g/L, lactosa 2 g/L, MgSO₄ 0,15 g/L y CuSO₄ 0,3 g/L.

3.2. Preparación del extracto crudo de enzima lacasa FNTL

La lacasa recombinante fue obtenida a partir de la cepa de *E. coli* BL21-pJ444-*fntlac*, que contiene el plásmido con el gen codificante para la expresión de la enzima lacasa FNTL bajo el control del promotor T5, además de un gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección. A partir de la cepa almacenada como stock en glicerol a -80°C, se realizó un preinóculo de 20 mL, cultivando aeróbicamente en medio Luria-Bertani suplementado con kanamicina (50 µg/mL) a 30°C y 160 rpm por toda la noche. Luego, se midió la densidad óptica a 600 nm del preinóculo y se añadió el volumen correspondiente para alcanzar una OD_{600nm}=0,05, en 400 mL de medio TBA-Cu previamente suplementado con kanamicina (50 µg/mL). Éste se incubó a 23°C y 160 rpm por 30 horas, y luego, las células fueron centrifugadas a 7.690 x g por 10 min a 4°C. Se resuspendió el pellet celular en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,0, se añadió 1

mg/mL de lisozima y se incubó a 37°C por 1 hora. Luego, se sonicó la muestra por 10 min y se centrifugó a 19.642 x g por 30 min, con el objetivo de separar el citosol de la membrana y cuerpos de inclusión. Se recolectó el sobrenadante (fracción soluble) y se sometió a choque térmico a 85°C por 5 min con el fin de desnaturar proteínas nativas del huésped heterólogo. Posteriormente, se centrifugó a 19.642 x g por 30 min. De forma paralela, el sedimento obtenido por la centrifugación de la fracción total (fracción insoluble, que contiene debris y cuerpos de inclusión) se resuspendió en urea 8 M, con el fin de tener un control de expresión no funcional de la enzima. La fracción sometida a choque térmico se concentró utilizando sistema Amicon™ de ultrafiltración con flujo de nitrógeno utilizando filtros de 30 kDa.

3.3. Determinación de la concentración de enzima

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976). Se preparó una curva de calibración utilizando BSA como estándar de proteínas. Se utilizaron concentraciones de 0,05, 0,1, 0,2 y 0,4 mg/mL de BSA, se diluyó el reactivo de Bradford (Bio-rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se midió la absorbancia a 595 nm, en triplicado. Para generar la curva de calibración e interpolar la absorbancia de las muestras, se utilizó el programa Gen5 asociado al espectrofotómetro lector de microplacas EPOCH 2 (BioTek).

3.4. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE)

Para analizar las fracciones obtenidas durante la obtención del extracto crudo y comprobar la sobreexpresión de la enzima recombinante, se realizó la separación de dichas fracciones por electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE) (Gallagher & Sasse, 1998). Se prepararon muestras de 15 µg que contenían las fracciones anteriormente descritas y buffer de carga 4X, y se desnaturalaron por incubación a 95°C por 5 minutos. El buffer de carga contenía SDS 10 % (p/v) β-mercaptoetanol 10 mM, glicerol 20 % (v/v), Tris-HCl 0,2 M pH 6,8 y azul de bromofenol 0,05 % (p/v). Se utilizó el estándar de proteínas Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (Bio-rad) y buffer de corrida Tris-glicina-SDS (Winkler). Se cargaron las muestras en un gel al 10% de poliacrilamida. Se realizó la electroforesis a 80 V por 30 min y 120 V por 1 hora. Luego, se tiñó el gel con solución de tinción, que contenía Azul de Coomasie R-250 (0,125 % p/v), metanol 45% p/v y ácido acético 10% v/v, durante toda la noche. Posteriormente, se incubó con solución de destinción (ácido acético 10% v/v, metanol 30 % v/v y agua 60% v/v) y se fotografió para su comparación.

3.5. Ensayo actividad lacasa

Se midió la actividad enzimática de la lacasa espectrofotométricamente siguiendo la oxidación del sustrato siringaldazina (SGZ) a tetra-metoxi-azo-bis-metilenquinona a 530 nm, a modo de control de la expresión funcional de la

enzima. Los ensayos se realizaron a 70°C en un volumen de 3 mL que contenía buffer KH₂PO₄ pH 6.0 y SGZ 0,216 mM. La reacción se inició mediante la adición de la enzima luego de una preincubación de la mezcla de reacción a 70°C durante 2 min. Se monitoreó la reacción midiendo el cambio de absorbancia del producto formado en el tiempo a 530 nm, que da cuenta de la transformación del sustrato en función del tiempo, utilizando un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu) (Espina *et al.*, 2021).

En base a la literatura, se definió una unidad de actividad (U) no estándar, como la cantidad de enzima que produce el cambio de 0,001 unidades de absorbancia por minuto, relativo a las condiciones ensayadas (Lante *et al.*, 2000; Bains *et al.*, 2003). Se puede calcular la actividad volumétrica con la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{mL} = \frac{((Abs_{530nm}/ \text{min } \textit{ensayo}) - (Abs_{530nm}/ \text{min } \textit{blanco})) \times FD}{0,001 \times 0,005}$$

Donde U/mL son las unidades volumétricas de actividad lacasa, FD es el factor de dilución de la enzima, Abs_{530nm}/min representa el cambio de la absorbancia del producto de oxidación en el tiempo, 0,001 representa el valor relativo de incremento en unidades de absorbancia a 530 nm por minuto en el ensayo utilizado, relacionado con el cambio de 0,045 nmoles por minuto (Ver Anexo) y 0,005 es el volumen en mL de enzima utilizada (Espina *et al.*, 2021).

3.6. Espectroscopía de fluorescencia

Debido a su estructura, los hidrocarburos aromáticos policíclicos producen emisión de fluorescencia, la que aumenta con el número de anillos y con el grado de conjugación del compuesto (Skoog *et al.*, 2015). Se puede utilizar este principio para poder hacer un seguimiento de la oxidación de los HAPs por acción de la lacasa, mediante espectroscopía de fluorescencia total.

3.6.1. Determinación preliminar de HAPs en medio de reacción sin enzima

Se prepararon mezclas acuosas de cada HAP: antraceno (ANT), benzo[a]antraceno (BaA) y benzo[a]pireno (BaP), de forma independiente, a 0,1, 0,3 y 0,5 mg/mL, se incubaron a 30°C por 24 hr y agitación 150 rpm (Niu *et al.*, 2013), para simular las condiciones de las reacciones futuras. Se realizó una extracción líquido-líquido con n-hexano, utilizando 300 μ L de la mezcla acuosa y 600 μ L de n-hexano. Se agitó en vórtex por 1 min. La mezcla se separa en fase acuosa y fase orgánica. Se recuperó la fase orgánica y se repitió el proceso dos veces más (Gran-Scheuch *et al.*, 2017). Se guardaron los extractos a 4°C hasta su uso.

Posteriormente, se midió la fluorescencia total de las muestras, representado como una matriz de excitación y emisión (EEM), en un espectrofluorímetro Varian Cary-Eclipse (Agilent Technologies). Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los espectros de excitación-emisión se registraron en los intervalos de λ_{ex} : 220-400 nm cada 5 nm y λ_{em} : 324-550 nm cada 2 nm, con slits de

excitación y emisión de 10 nm (Gran-Scheuch *et al.*, 2017). Las rutinas de pretratamiento de datos para eliminar la interferencia de la dispersión de Raman y Rayleigh de las EEMs se implementaron utilizando el programa MATLAB, para luego ser analizadas mediante la interfaz gráfica MVC2 (Alarcón *et al.*, 2013).

3.6.2. Determinación de HAPs posterior a la incubación con enzima FNTL

Se preparó una mezcla acuosa de cada HAP a 0,025 y 0,05 mg/mL. Las condiciones fueron: Solo HAP, HAP + lacasa, HAP + lacasa + ABTS y HAP + lacasa + AS. Se utilizó el extracto crudo de lacasa a 0,1 mg/mL y cada mediador a 1 mM (Zeng *et al.*, 2016). Se incubó la reacción a 30 °C por 24 horas y agitación de 150 rpm (Niu *et al.*, 2013). Pasado el tiempo, se añadió la mitad del volumen de acetonitrilo para detener la reacción y permitir una mejor solubilización de los HAPs remanentes (Zeng *et al.*, 2016). De la mezcla acuosa, se separó una alícuota para su posterior extracción y el resto se guardó a 4°C hasta su uso.

Se realizó la extracción líquido-líquido con n-hexano como se describió anteriormente en la sección 6.1. Se midió la fluorescencia total tanto de las soluciones acuosas como de las extracciones. Las soluciones de HAPs a 0,025 mg/mL se llevaron a una concentración final de 20 µg/L (BaA y BaP) y 2 µg/L (ANT) y las de 0,05 mg/mL se llevaron a una concentración final de 40 µg/L (BaA y BaP) y 4 µg/L (ANT). Estas diluciones se prepararon utilizando H₂O para las muestras acuosas y n-hexano para las muestras extraídas.

Además, se midió la fluorescencia total tanto en solución acuosa como en muestras extraídas de preparaciones de lacasa, ABTS, AS, lacasa + ABTS y lacasa + AS, para descartar que estos compuestos presentaran fluorescencia en las soluciones a utilizar. Se prepararon las diluciones del mismo modo que las muestras con HAPs.

3.7. Análisis de la degradación de HAPs mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD)

3.7.1. Evaluación de la degradación de HAPs por acción de la enzima FNTL

Se utilizaron los HAPs ANT, BaA y BaP a 0,025 mg/mL, lacasa 0,1 mg/mL, mediadores ABTS y AS 1 mM y 2 mM. Se incubó la reacción a 30°C y agitación a 150 rpm por 7 días, añadiendo enzima a los 3 días de incubación. Posteriormente, se añadió acetonitrilo en una relación 3:1 para precipitar la enzima y detener la reacción (Zeng *et al.*, 2011), se centrifugó a 19.642 x g por 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Todas las reacciones se realizaron en triplicado.

3.7.2. Evaluación de la influencia del pH del medio de reacción en la degradación de antraceno

Las reacciones se realizaron utilizando ANT 0,05 mg/mL, lacasa 0,5 mg/mL, ABTS y HBT 2 mM y los siguientes buffers, según corresponda: buffer citrato de

sodio 50 mM (pH 5 y 6), fosfato de sodio 50 mM (pH 7) (Zeng *et al.*, 2016). Se incubaron las reacciones a 40°C y 150 rpm por 8 días, añadiendo enzima cada 4 días. Posteriormente, se agregó acetonitrilo en una relación 3:1 para precipitar la enzima y detener la reacción, se centrifugó a 19.642 x g por 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Las muestras se filtraron utilizando filtros de 0,22 µm. Todas las reacciones se realizaron en triplicado.

3.7.3. Diseño de experimentos – metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta es un conjunto de herramientas estadísticas y matemáticas utilizado para desarrollar y optimizar procesos, usando un enfoque más rápido y económico. Entre estos, los diseños de experimentos factoriales son ampliamente utilizados cuando se desea evaluar una o más respuestas donde estén involucrados varios factores o variables independientes y donde es necesario investigar el efecto conjunto de dichos factores sobre una variable de respuesta (Myers *et al.*, 2016).

Se empleó un diseño de compuesto central rotatable ($2^2 + 2 \times 2 +$ centros) para analizar los efectos e interacciones de dos variables independientes, pH y tiempo de incubación de la reacción (días), sobre la degradación de ANT (Bezerra *et al.*, 2008; Ike *et al.*, 2019). Los niveles codificados y reales de ambas variables se presentan en la Tabla 1; mientras que en la Tabla 2 se muestran los 11 experimentos realizados (4 experimentos factoriales, 4 experimentos axiales y 3 réplicas del punto central (Ike *et al.*, 2019)). Por otra parte, la temperatura,

concentración de ANT y enzima y uso de mediador ABTS o AS (evaluado por separado) se fijaron en base a experimentos previos.

Se prepararon las reacciones utilizando ANT 0,05 mg/mL, lacasa 0,5 mg/mL, ABTS 2 mM o AS 2 mM, según corresponda, y el buffer universal Britton-Robinson 0,02 M ajustado a los distintos pH (Alva *et al.*, 2023), utilizando las combinaciones de pH y tiempo de reacción como se muestra en la Tabla 2. Se incubaron las reacciones a 40°C y 150 rpm por los días que correspondía según el diseño. Posteriormente, se detuvo la reacción y se precipitó la enzima de acuerdo con lo descrito en el punto 7.1.

Tabla 1. Valores codificados y reales de las variables utilizadas en la evaluación de degradación de antraceno en el diseño de compuesto central

Variable independiente	Niveles				
	$-\alpha$ (-1,41)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,41)
pH	3,5	4	5	6	6,5
días	8	9	12	15	16

Tabla 2. Configuración experimental del diseño de compuesto central 2² para evaluar la degradación de ANT

Serie	Codificado		Real	
	pH	Tiempo (días)	pH	Tiempo (días)
1	-1	-1	4	9
2	+1	-1	6	9
3	-1	+1	4	15
4	+1	+1	6	15
5	-1,41	0	3,5	12
6	+1,41	0	6,5	12
7	0	-1,41	5	8
8	0	+1,41	5	16
9	0	0	5	12
10	0	0	5	12
11	0	0	5	12

3.7.4. Confirmación de las condiciones optimizadas de degradación de HAPs

Se prepararon las reacciones utilizando ANT 0,05 mg/mL, lacasa 0,5 mg/mL, ABTS 2 mM o AS 2 mM, según corresponda, y buffer universal Britton-Robinson ajustado al pH predicho por el diseño de experimento. Se incubaron las reacciones a 40°C, 150 rpm a pH 5,0, por 4, 8, 12, 16 y 20 días, añadiendo enzima cada 4 días. Se agregó acetonitrilo en una relación 3:1 para precipitar la enzima

y detener la reacción cuando correspondía, se centrifugó a 19.642 x g por 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Las muestras se filtraron utilizando filtros de 0,22 µm.

Además, se realizaron preparaciones de reacciones de BaA y BaP, siguiendo la misma configuración experimental, para probar si dichas condiciones optimizadas por el diseño de experimentos (uso de ABTS o AS, 40°C, pH y días de incubación predichas) permitían la degradación de estos HAPs.

3.8. Parámetros cromatográficos

Finalmente, se evaluó la oxidación de los HAPs, asociada a la degradación de éstos, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) (Shimadzu). La separación de los analitos se realizó en columna C18 de fase reversa (250 mm x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm) (NUCLEODUR, Macherey-Nagel), con elución en gradiente de 50-100% de acetonitrilo/agua en 30 min para ANT, 40 min para BaA y 50 min para BaP, flujo de 1 ml/min y selección de los cromatogramas asociado a la absorbancia a 254 nm.

3.9. Análisis de datos

Se determinó el porcentaje de degradación en relación con el área del pico cromatográfico obtenido para la condición control de HAP, incubado bajo las mismas condiciones experimentales, calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Degradación HAPs (\%)} = \frac{(A_0 - A) \times 100}{A_0}$$

Donde A_0 es el área del pico cromatográfico del HAP en la condición control (sin enzima ni mediadores) y A es el área del pico cromatográfico del HAP luego de la incubación con lacasa y/o lacasa + mediadores, según corresponda experimentalmente.

3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism (Versión 8.0.2., GraphPad Software). Los resultados se expresaron como el promedio de los triplicados \pm desviación estándar (SD). La significancia estadística se determinó evaluando el valor p con 95% de nivel de significancia obtenido usando el análisis de varianza de una vía (*one-way ANOVA*), seguido de comparaciones múltiples entre los tratamientos y el grupo control utilizando la prueba de Dunnett. Para las comparaciones entre distintas condiciones (concentración o tiempo) para un mismo grupo de tratamientos enzimáticos, se utilizó el test t . La validación del modelo obtenido con el diseño de compuesto central para optimizar el pH y tiempo de degradación se realizó mediante ANOVA de la regresión empleando el programa Statgraphics Centurion XV.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de la enzima recombinante FNTL parcialmente purificada

Con el fin de visualizar las distintas fracciones y confirmar la obtención de la enzima FNTL parcialmente purificada, se realizó una separación electroforética de las distintas fracciones obtenidas. En la Figura 4, se puede observar que se obtuvo una banda prominente alrededor de los 58 kDa, resaltada con la flecha roja, que concuerda con resultados obtenidos previamente para la expresión de esta enzima recombinante (Espina *et al.*, 2021). No obstante, no se obtuvo un enriquecimiento comparable con el trabajo mencionado anteriormente, ya que en ese trabajo se realizó adicionalmente purificación por cromatografía de intercambio aniónico. A pesar de esto, se puede observar la purificación parcial de la enzima, efectuada de forma fácil y rápida mediante el tratamiento por choque térmico a 85°C por 5 min, que permitió desnaturar proteínas nativas de *E. coli*.

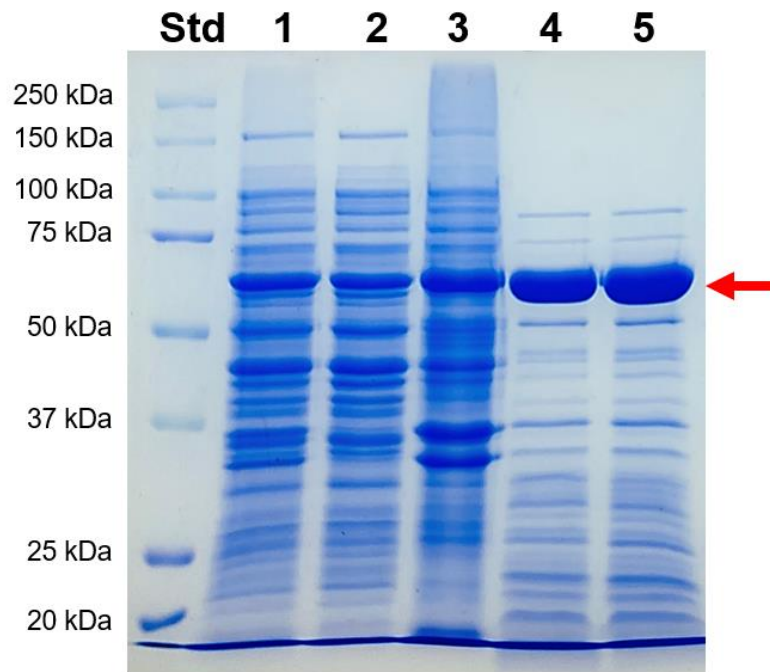


Figura 5. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la preparación de enzima lacasa. Std: Estándar de peso molecular. Carril 1: Lisado de *E.coli* BL21-*pJ444fntlac* (fracción total). Carril 2: Extracto libre de células (fracción soluble). Carril 3: Cuerpos de inclusión solubilizados (fracción insoluble). Carril 4: extracto crudo parcialmente purificado por choque térmico. Carril 5: Fracción sometida a choque térmico concentrada en AMICON. Se cargaron 15 µg de proteína en cada carril. La flecha roja indica la banda correspondiente a la enzima FNTL.

Se determinó la actividad lacasa correspondiente a cada fracción mediante ensayo enzimático con el sustrato siringaldazina, a 70°C y pH 6 (Tabla 3). Se obtuvo una actividad específica de 546.742 U/mg en el extracto crudo parcialmente purificado y concentrado de FNTL, con un rendimiento de 56%.

Tabla 3. Comparación de la actividad lacasa en las distintas fracciones obtenidas en la expresión de la enzima FNTL.

Fracción	Concentración (mg/mL)	Proteínas totales (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)
Total	7,70 ± 0,15	616,00	41.088.000 ± 4.210.889	66.701 ± 6.836	100
Soluble	6,00 ± 0,50	420,00	30.520.000 ± 2.689.749	72.667 ± 6.404	74
Insoluble	1,68 ± 0,28	3,36	76.960 ± 7.534	22.905 ± 2.242	0
Choque térmico	0,67 ± 0,16	43,55	20.592.000 ± 312.000	472.836 ± 7.164	50
Choque térmico concentrada	7,06 ± 0,44	42,36	23.160.000 ± 1.209.800	546.742 ± 28.560	56

Al definir una unidad de actividad como la cantidad de enzima que cataliza la reacción de 1 μmol de sustrato por min, usando el coeficiente de extinción a 530 nm del producto tetra-metoxi-azo-bis-metilenquinona $\epsilon=65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, volumen total de ensayo de 3 mL (0,003 L) en cubeta con paso óptico de 1 cm y utilizando 5 μL (0,005 mL) de enzima, con un factor de dilución de 100, el cálculo para la actividad volumétrica sería:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta A \times V_{\text{total}} \times FD}{\Delta t \times \epsilon \times l \times V_{\text{enzima}}}$$

$$\frac{U}{mL} = \frac{0,186 \times 0,003 L \times 100}{1 \text{ min} \times 64000 M^{-1}cm^{-1} \times 1 \text{ cm} \times 0,005 mL} = 174 \mu\text{moles}/\text{min} \times mL$$

$$\text{Actividad volumétrica} = 174 \frac{U}{mL}$$

Y la expresión de actividad específica:

$$\frac{U}{mg} = \frac{174 \mu\text{moles}}{\text{min} \times mL \times 7,06 \text{ mg}/mL} = 25 \mu\text{moles}/\text{min} \times mg$$

$$\text{Actividad específica} = 25 \frac{U}{mg}$$

4.2. Determinación preliminar de HAPs en medio de reacción sin enzima por espectroscopía de fluorescencia total

De forma preliminar, se verificó si era posible detectar los HAPs luego de la incubación simulando las condiciones de reacción, en una extracción líquida-líquida con n-hexano. Se presentan los resultados como la EEM de cada condición, representado a modo de ejemplo en la Figura 6 como la fluorescencia total de dos muestras de benzo[a]pireno, tanto del patrón puro de BaP como de la muestra extraída, ambas a una misma concentración (Figura 6a). Los resultados indican que la intensidad de fluorescencia en la muestra extraída de BaP correspondía sólo a un 24% con respecto al patrón del HAP utilizado (Figura 6b).

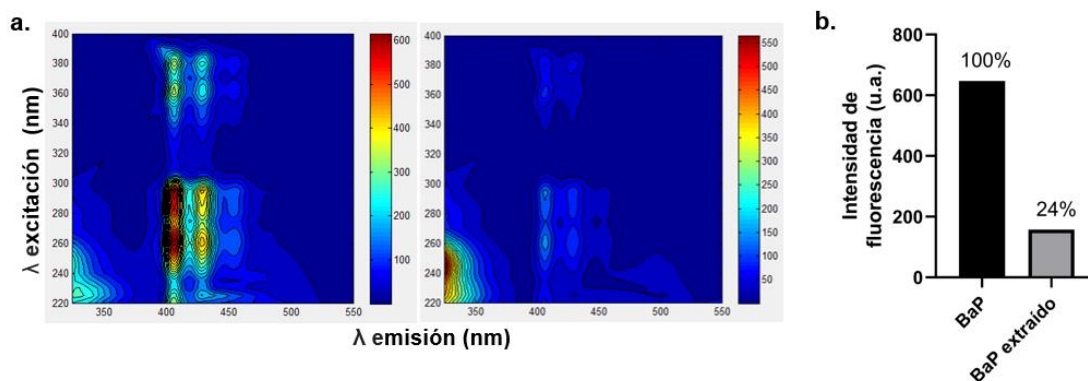


Figura 6. Espectroscopía de fluorescencia de la matriz de emisión-excitación de benzo[a]pireno 0,3 mg/mL. a. EEM del patrón puro de BaP sin incubar, concentración final 50 μ g/L (izquierda), EEM de la muestra extraída de BaP post incubación simulando condiciones de reacción (derecha). **b.** Comparación de los picos de mayor intensidad de fluorescencia entre las dos muestras.

4.3. Determinación preliminar de la degradación de HAPs por acción de la enzima FNTL por espectroscopía de fluorescencia total

Debido a la baja partición de BaP hacia el hexano, se consideró la posibilidad de determinar su presencia directamente en el medio acuoso de reacción. Para ello, se decidió evaluar si los componentes de la reacción, tanto la enzima como los mediadores, presentaban fluorescencia a las longitudes de onda de emisión de los HAPs, que pudieran significar interferencias al momento de medir directamente en las muestras acuosas. El resultado se presenta en la Figura 7, donde se puede observar que los EEMs de los componentes de la reacción en las muestras acuosas y extraídas por n-hexano no presentan fluorescencia en la región donde emiten los HAPs y, por lo tanto, no interfieren su señal, por lo que es posible evaluar directamente los HAPs en medio acuoso de reacción.

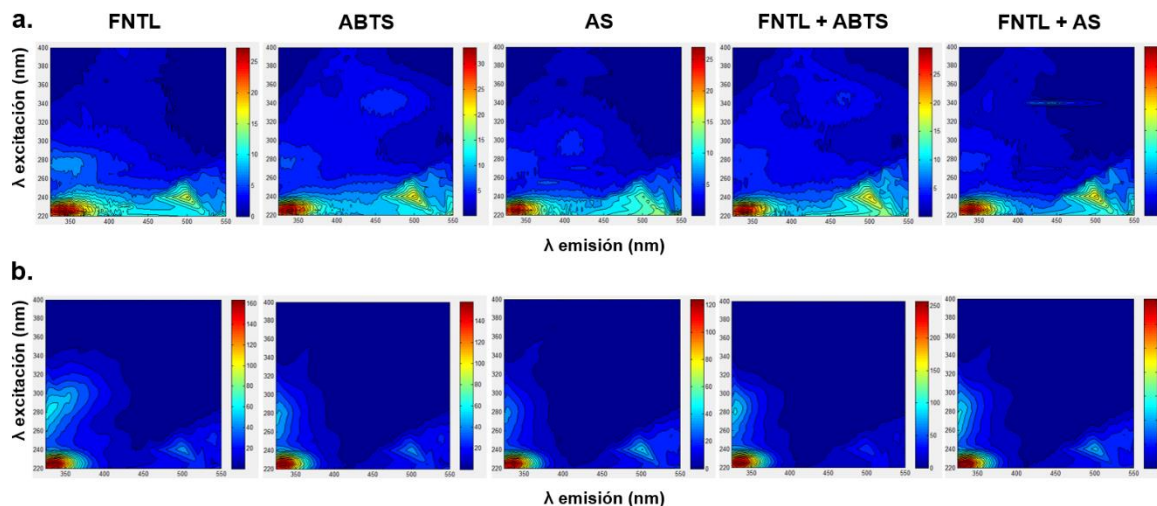


Figura 7. Espectroscopía de fluorescencia de la matriz de emisión-excitación de los componentes de la mezcla de reacción. a. Muestras acuosas. **b.** Muestras extraídas con n-hexano. Se utilizó lacasa 0,1 mg/mL y mediadores ABTS y AS 1 mM. Se incubaron las mezclas a 30°C y agitación 150 rpm por 24 horas.

Posteriormente, se realizó la comparación de la detección de cada HAP luego de la incubación con la enzima FNTL y los mediadores ABTS o AS en las mezclas acuosas de reacción mediante la evaluación de la intensidad de fluorescencia de cada HAP por análisis de las EEM.

En el caso del antraceno, contrariamente a lo esperado, se observa un aumento en la IF al utilizar lacasa o lacasa y mediador, comparado con el control (Figura 8). Este aumento es casi el triple al utilizar solo enzima FNTL, y aumenta el doble y el cuádruple en presencia de los mediadores ABTS y AS, respectivamente.

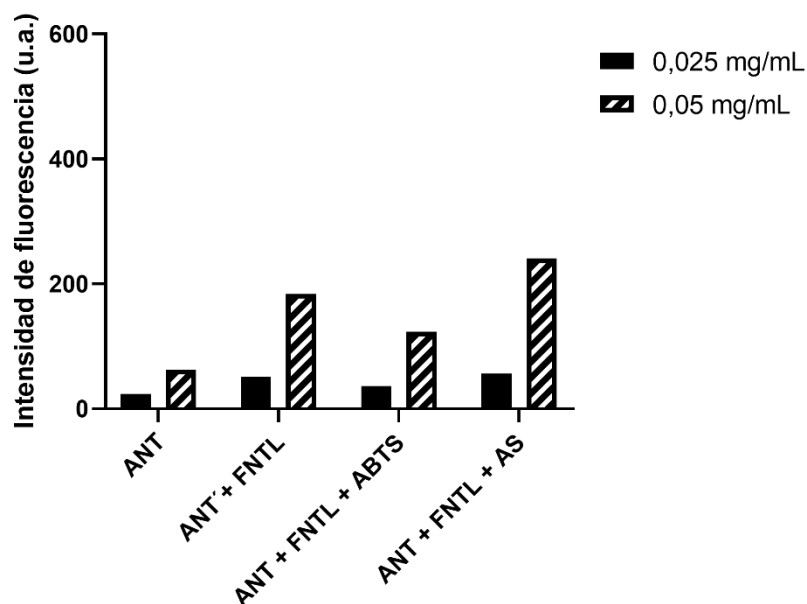


Figura 8. Intensidad de fluorescencia del antraceno luego del tratamiento enzimático. Datos obtenidos a partir de la medición de la fluorescencia total de las muestras acuosas luego del tratamiento enzimático con la enzima lacasa recombinante FNTL, utilizando mediadores según lo indicado. Se utilizó antraceno 0,025 y 0,05 mg/mL, lacasa 0,1 mg/mL y mediadores ABTS y AS 1 mM. Reacciones incubadas a 30°C y agitación 150 rpm por 24 h.

Para el caso del benzo[a]antraceno, contrariamente a lo esperado, se observa un aumento de la IF al utilizar lacasa o lacasa y mediador, comparado con el control (Figura 9). Al utilizar enzima FNTL, este aumento fue de un 40% con respecto al control, aumentando en un 65% y 100% en presencia de los mediadores ABTS y AS, respectivamente, al evaluar la concentración más alta de BaA.

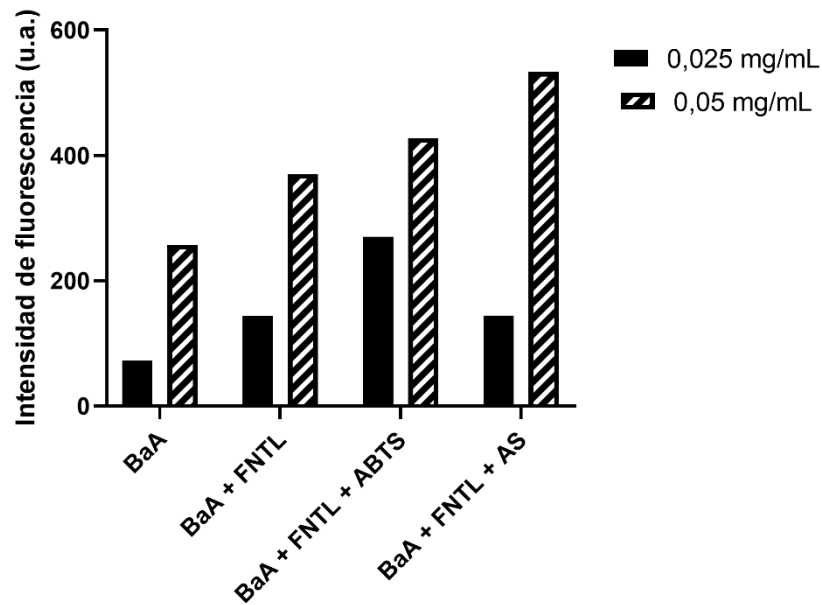


Figura 9. Intensidad de fluorescencia del benzo[a]antraceno luego del tratamiento enzimático. Datos obtenidos a partir de la medición de la fluorescencia total de las muestras acuosas luego del tratamiento enzimático con la enzima lacasa recombinante FNTL, utilizando mediadores según lo indicado. Se utilizó benzo[a]antraceno 0,025 y 0,05 mg/mL, lacasa 0,1 mg/mL y mediadores ABTS y AS 1 mM. Reacciones incubadas a 30°C y agitación 150 rpm por 24 h.

Para el benzo[a]pireno, al comparar entre los distintos tratamientos, se observa que no hubo aumento de la IF al utilizar lacasa o lacasa y mediador, comparado con el control (Figura 10).

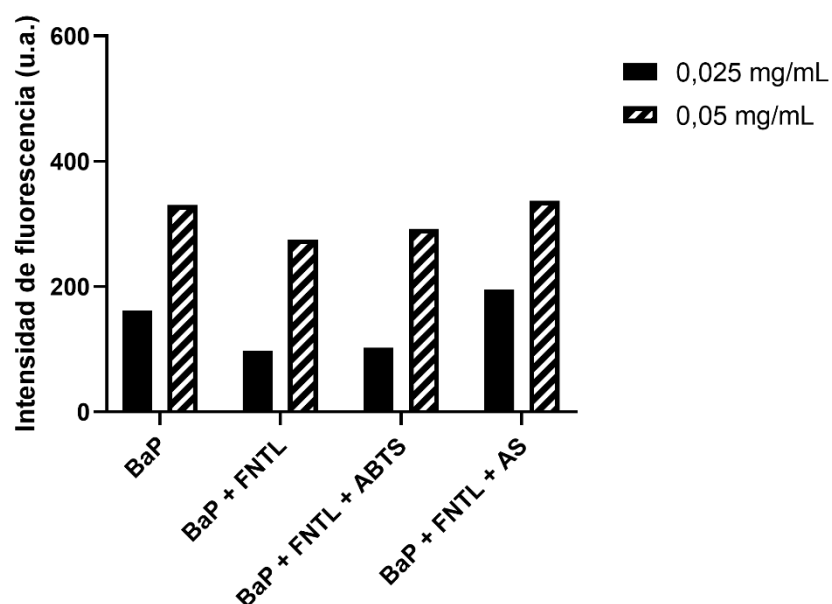


Figura 10. Intensidad de fluorescencia del benzo[a]pireno luego del tratamiento enzimático. Datos obtenidos a partir de la medición de la fluorescencia total de las muestras acuosas luego del tratamiento enzimático con la enzima lacasa recombinante FNTL, utilizando mediadores según lo indicado. Se utilizó benzo[a]pireno 0,025 y 0,05 mg/mL, lacasa 0,1 mg/mL y mediadores ABTS y AS 1 mM. Reacciones incubadas a 30°C y agitación 150 rpm por 24 h.

4.4. Evaluación de la degradación de HAPs por acción de la enzima FNTL mediante HPLC-DAD

Con el objetivo de utilizar una técnica que permitiese la separación previa de los HAPs y sus posibles productos luego del tratamiento enzimático, se realizó la evaluación de la degradación de los tres HAPs estudiados mediante HPLC-DAD, utilizando ABTS y AS para evaluar el rol de un mediador de origen sintético y uno de origen natural, respectivamente.

Los resultados indican que la enzima es capaz de oxidar a BaA directamente, en cambio ANT y BaP parecen necesitar la presencia de un mediador en el medio

de reacción (Figura 11). Al comparar los porcentajes de degradación entre los tres HAPs, se obtuvo más de un 40% de oxidación a los 7 días de incubación de la enzima con el HAP ANT, utilizando 2 mM de ABTS. En el caso de ANT, si bien se observa una mayor acción de la enzima al utilizar ABTS, se obtuvo cerca del 35% de degradación al utilizar AS, sin cambios significativos entre las dos concentraciones utilizadas (Figura 11a). En el caso de BaA, también se obtuvo un mayor porcentaje de degradación utilizando ABTS, cerca de un 30% al utilizar 1 mM, pero la reacción parece ser inhibida al utilizar 2 mM de éste. En cambio, al utilizar AS, se obtuvo cerca de un 25% de oxidación, sin cambios significativos entre las dos concentraciones evaluadas (Figura 11b). Para el caso de BaP, es el HAP con el que se obtuvo un menor porcentaje de degradación, siendo cerca del 20% al utilizar 2 mM de AS (Figura 11c).

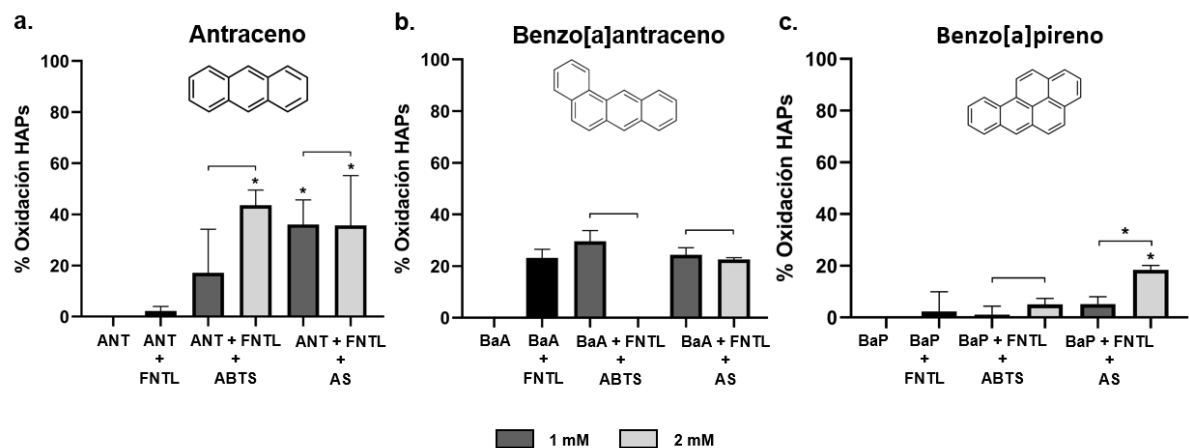


Figura 11. Degradación de 3 HAPs mediante el uso de la lacasa FNTL. a. Antraceno. **b.** Benzo[a]antraceno. **c.** Benzo[a]pireno. Se utilizó HAPs a 0,025 mg/mL, lacasa 0,1 mg/mL, mediadores ABTS y AS 1 mM y 2 mM. Se incubó la reacción a 30°C y agitación a 150 rpm por 7 días, añadiendo nuevamente enzima a los 3 días de incubación. Las diferencias significativas, tanto al comparar los distintos tratamientos enzimáticos con el control como entre las distintas concentraciones de un mismo tratamiento, se indican como * = $p < 0,05$.

4.4.1. Influencia del pH en la degradación de antraceno por acción de la enzima FNTL

Debido a que fue el HAP que presentó un mayor porcentaje de degradación en las condiciones ensayadas, se decidió continuar evaluando la degradación de antraceno por acción de la enzima lacasa FNTL.

Al evaluar el efecto de diferentes pHs en la reacción, se obtuvo que el porcentaje de oxidación fue más alto al pH 5,0, siendo un 40% al utilizar solo la enzima FNTL y cercano al 50% en presencia de enzima FNTL y mediador ABTS (Figura 12a). Para el caso del mediador HBT, si bien se obtuvo un porcentaje de degradación alto, comparando los distintos pH, éste fue más bajo que el obtenido al utilizar solo enzima, y parece inhibir ligeramente la reacción, por lo que fue descartado para las futuras reacciones. A pH 6,0, la reacción utilizando FNTL alcanzó alrededor de un 30% de degradación. Sin embargo, ninguno de los mediadores utilizados influye en la obtención de una mayor tasa de degradación (Figura 12b). A pH 7,0, se obtuvieron los menores porcentajes de degradación, siendo menores a 20%, y no se observa efecto significativo en el uso de mediadores con respecto al control (Figura 12c).

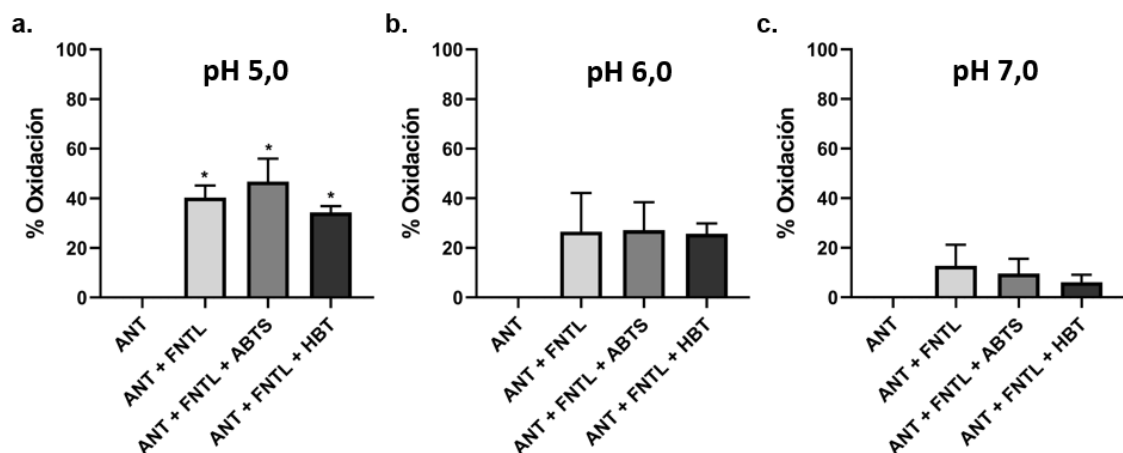


Figura 12. Influencia del pH en la degradación de ANT por la enzima lacasa FNTL. Se utilizó ANT 0,05 mg/mL, lacasa 0,5 mg/mL, mediadores ABTS y HBT 2 mM, buffer citrato de sodio 50 mM (pH 5,0 y 6,0) y fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0). Se incubó la reacción a 40°C y agitación a 150 rpm por 8 días, añadiendo enzima nuevamente a los 4 días. Las diferencias significativas al comparar los distintos tratamientos enzimáticos con el control se indican como * = $p < 0,05$.

4.4.2. Evaluación de la degradación de antraceno mediante diseño de experimentos

4.4.2.1. Uso de mediador ABTS

Se utilizó un diseño de experimentos de compuesto central con el objetivo de evaluar la influencia del pH del medio de reacción y el tiempo de incubación de antraceno con la enzima FNTL en presencia del mediador ABTS. Se presentan la respuesta medida y predicha por el modelo ajustado, para los 11 experimentos definidos por el diseño (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de oxidación de antraceno obtenido por la interacción de las variables evaluadas en el diseño de compuesto central 2², por acción de la lacasa FNTL y el mediador ABTS.

Serie	Variable independiente		Respuesta medida	Respuesta predicha
	pH	tiempo	% oxidación	% oxidación
1	4	9	18,48	32,53
2	6	9	26,60	34,61
3	4	15	77,97	72,43
4	6	15	83,52	74,51
5	3,5	12	49,24	44,40
6	6,5	12	46,01	47,51
7	5	8	48,87	33,02
8	5	16	74,60	86,22
9	5	12	67,86	62,92
10	5	12	62,76	62,92
11	5	12	58,10	62,92

La tabla 5 presenta el análisis de varianza (ANOVA) de la regresión. Como se puede observar, los datos tienen un buen ajuste al modelo, ya que la suma de cuadrados medio del modelo (SCM) es distinta a la SCM del residuo ($p < 0,05$); no habiendo además diferencias entre la SCM de la carencia de ajuste y el error puro ($p > 0,05$) (Gutierrez & de la Vara, 2008).

Tabla 5. Análisis de varianza de la regresión del modelo, evaluando porcentaje de degradación de antraceno mediante acción de la enzima FNTL y ABTS

Porcentaje de degradación de antraceno					
Fuente de variación	SC	Grados libertad	SCM	Razón F	Valor p
Total	4244,84	10	-		
Modelo	3424,24	4	852,93		
Residuos	833,14	6	138,86	6,14	0,03
Carencia de ajuste	785,48	4	196,37	8,24	0,11
Error puro	47,66	2	23,83		

SC = suma de cuadrados

SCM = suma de cuadrados medios

$R^2 = 80,37\%$

R^2 ajustado a g. libertad = 67,29%

En cuanto a la magnitud y la importancia de los efectos de los parámetros evaluados, el diagrama de Pareto indica que el tiempo de incubación de la reacción tiene el mayor efecto sobre la respuesta, siendo éste el único dato estadísticamente significativo (Figura 13). Así mismo, se observó que la interacción entre el pH y el tiempo de reacción tuvo el menor efecto sobre el porcentaje de oxidación de antraceno, razón por la cual fue eliminado del modelo.

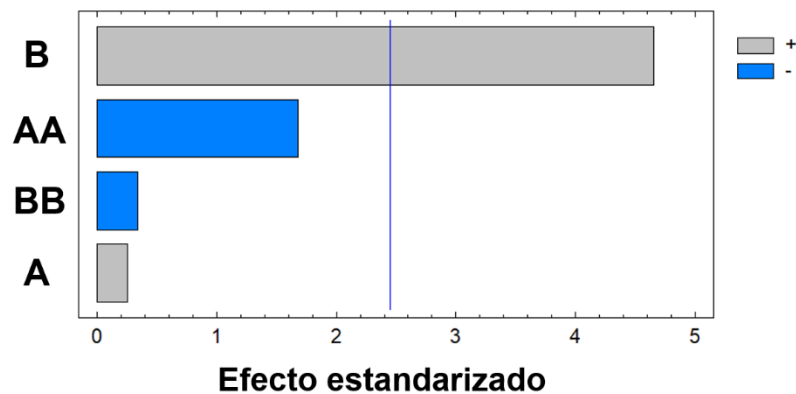


Figura 13. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados generado a partir de la evaluación del porcentaje de degradación de antraceno mediante acción de la enzima FNTL y ABTS. B: tiempo de incubación de la reacción. A: pH. Línea vertical indica la significancia estadística de los efectos estudiados.

En la optimización de la respuesta del modelo generado, se obtuvo que a pH 5,0 y 16 días de incubación de la reacción se debería lograr un máximo de oxidación de antraceno, con un porcentaje de degradación predicho de 86%, mediante la acción de la enzima FNTL junto con ABTS, a 40°C (Figura 14).

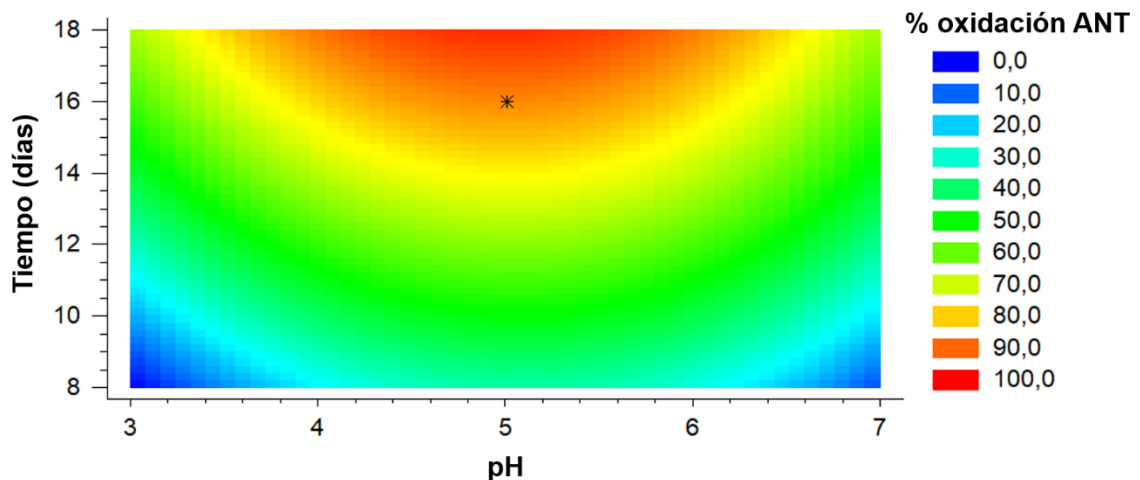


Figura 14. Gráfico de contorno generado a partir de los resultados experimentales del diseño de experimentos al utilizar enzima FNTL y ABTS. * indica las condiciones para obtener el máximo de degradación de ANT (pH = 5,0 y 16 días) con un valor predicho = 86%.

4.4.2.2. Uso de mediador AS

Se utilizó un diseño de experimentos de compuesto central con el objetivo de evaluar la influencia del pH del medio de reacción y el tiempo de incubación del antraceno con la enzima FNTL en presencia del mediador AS.

Se presentan la respuesta medida y predicha por el modelo ajustado, para los 11 experimentos definidos por el diseño (Tabla 6).

La tabla 7 presenta el ANOVA de la regresión. Como se puede observar, los datos tienen un buen ajuste al modelo, ya que la suma de cuadrados medio del modelo (SCM) es distinta a la SCM del residuo ($p < 0,05$); no habiendo además diferencias entre la SCM de la carencia de ajuste y el error puro ($p > 0,05$) (Gutierrez & de la Vara, 2008).

Tabla 6. Porcentaje de oxidación de antraceno obtenido por la interacción de las variables evaluadas en el diseño de compuesto central 2², por acción de la lacasa FNTL y el mediador AS.

Serie	Variable independiente		Respuesta medida	Respuesta predicha
	pH	tiempo	% oxidación	% oxidación
1	4	9	50,61	49,62
2	6	9	40,74	43,63
3	4	15	52,97	50,36
4	6	15	55,08	56,35
5	3,5	12	40,45	44,71
6	6,5	12	49,21	44,71
7	5	8	51,01	49,64
8	5	16	57,56	58,62
9	5	12	49,84	47,99
10	5	12	46,74	47,99
11	5	12	47,39	47,99

Tabla 7. Análisis de varianza de la regresión del modelo, evaluando porcentaje de degradación de antraceno mediante acción de la enzima FNTL y AS

Porcentaje de degradación de antraceno					
Fuente de variación	SC	Grados libertad	SCM	Razón F	Valor p
Total	281,80	10	-		
Modelo	192,05	4	54,33		
Residuos	64,48	6	10,75	5,05	0,04
Carencia de ajuste	20,77	3	6,92	0,47	0,72
Error puro	43,71	3	14,57		

SC = suma de cuadrados

SCM = suma de cuadrados medios

$R^2 = 77,12\%$

R^2 ajustado g. libertad = 61,86%

En cuanto a la magnitud y la importancia de los efectos de los parámetros evaluados, el diagrama de Pareto indica que el tiempo de incubación de la reacción entrega el mayor efecto a la respuesta, siendo éste el único dato estadísticamente significativo (Figura 15).

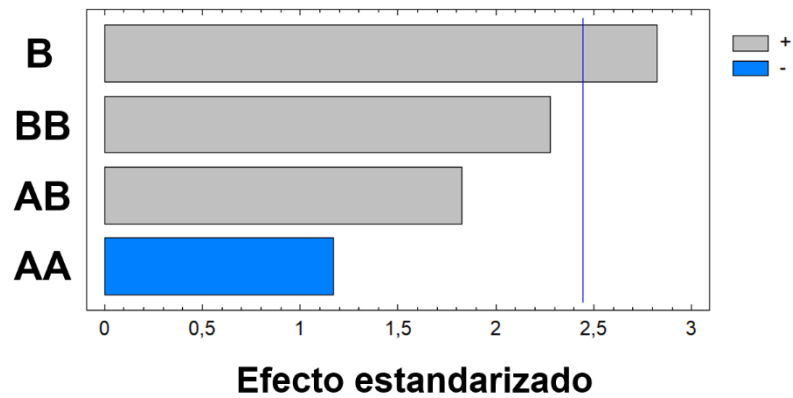


Figura 15. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados generado a partir de la evaluación del porcentaje de degradación de antraceno mediante acción de la enzima FNTL y AS. B: tiempo de incubación de la reacción. A: pH. Línea vertical indica la significancia estadística de los efectos estudiados.

En la optimización de la respuesta del modelo generado, se obtuvo que a pH 6,4 y 16 días de incubación de la reacción se debería lograr un máximo de oxidación de antraceno, con un porcentaje de degradación predicho de 61%, mediante la acción de la enzima FNTL junto con AS, a 40°C (Figura 16).

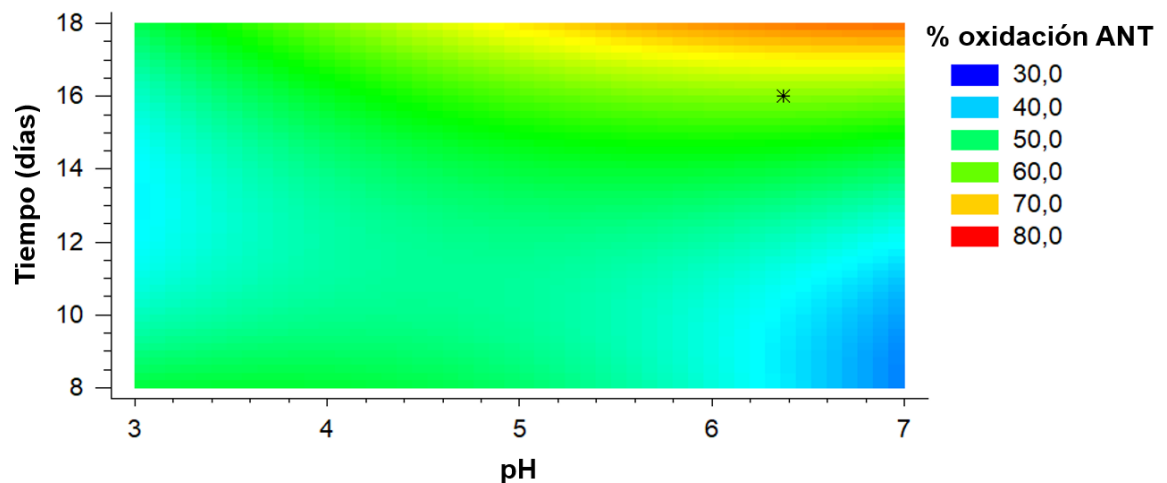


Figura 16. Gráfico de contorno generado a partir de los resultados experimentales del diseño de experimentos al utilizar enzima FNTL y AS. * indica las condiciones para obtener el máximo de degradación de ANT (pH = 6,4 y 16 días) con un valor predicho = 61%.

4.5. Confirmación de la degradación de antraceno utilizando los parámetros obtenidos en el diseño de experimentos

Luego, se confirmó si los parámetros seleccionados a partir del diseño de experimento eran correctos, es decir, utilizando medio de reacción a pH 5,0 y 16 días de incubación de la reacción con ABTS como mediador. Así, se realizó un seguimiento de la oxidación de ANT en el tiempo.

Se puede observar que a medida que aumentan los días de incubación de la reacción, aumenta el porcentaje de degradación de ANT al utilizar la enzima y el mediador ABTS, en las condiciones ensayadas, llegando a un máximo de 65% de oxidación a los 16 días. Sin embargo, no se observa un cambio significativo entre los 16 y 20 días de reacción (Figura 17a). Al evaluar la degradación al utilizar enzima y AS, se pudo obtener casi un 60% de oxidación a los 16 días, bajo las condiciones ensayadas. Sin embargo, no se observa un cambio significativo entre los 16 y 20 días de reacción (17b). Cabe destacar que, en el diseño de experimento realizado con este mediador, el modelo generó la optimización de la oxidación a pH 6,4 (Figura 16), lo que deberá corroborarse en futuros experimentos. Al utilizar solo enzima FNLT, se pudo obtener cerca de un 45% de degradación a los 16 días. No obstante, es menor que al utilizar los mediadores (17c).

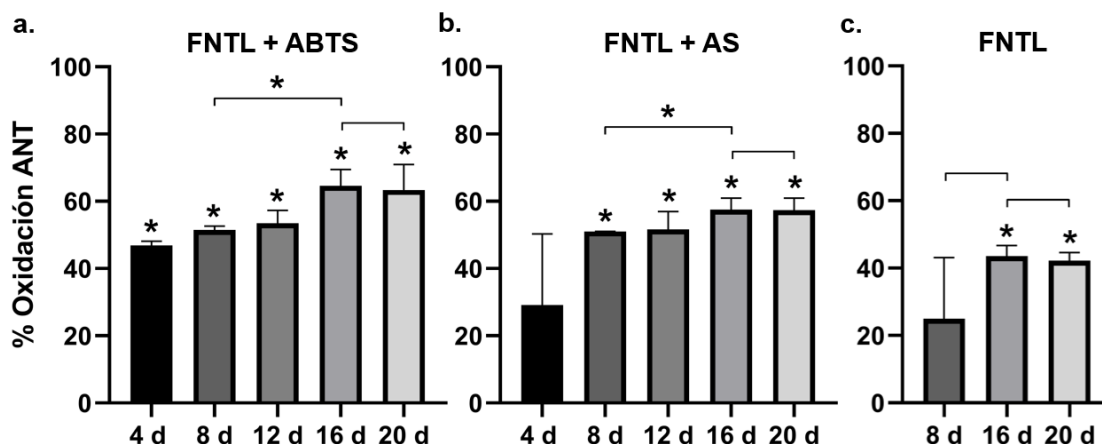


Figura 17. Evaluación de la degradación de antraceno en el tiempo, mediante el uso de enzima FNTL y mediadores ABTS o AS. a. FNTL + ABTS, b. FNTL + AS, C. FNTL. Se utilizó ANT 0,05 mg/mL, lacasa 0,5 mg/mL, mediador ABTS y AS 2 mM y buffer universal Britton–Robinson pH 5,0. Se incubó la reacción a 40°C y agitación a 150 rpm por 4, 8, 12, 16 y 20 días, agregando enzima cada 4 días. Las diferencias significativas, tanto al comparar las reacciones incubadas en el tiempo con el control (no graficado), entre los 8 y 16 días y entre los 16 y 20 días, se indican como * = $p < 0,05$.

4.6. Extrapolación de las condiciones de reacción a la degradación de benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno

Adicionalmente, se decidió evaluar el nivel de degradación de BaA y BaP bajo las condiciones ensayadas para ANT (40°C, 16 días de incubación y mediadores ABTS y AS 2 mM). Así, se realizó un seguimiento de la oxidación de estos HAPs en el tiempo.

En los resultados de la evaluación de la degradación de BaA, se observa que al utilizar solo enzima FNTL, sin la presencia de mediadores, se obtuvo un porcentaje de degradación cercano al 30%, en las condiciones ensayadas. Al ser comparado con las reacciones en las que se utilizó enzima y ABTS (Figura 18a)

o AS (Figura 18b), los resultados indican que el uso de mediadores no influye en la obtención de un mayor porcentaje de degradación (Figura 18).

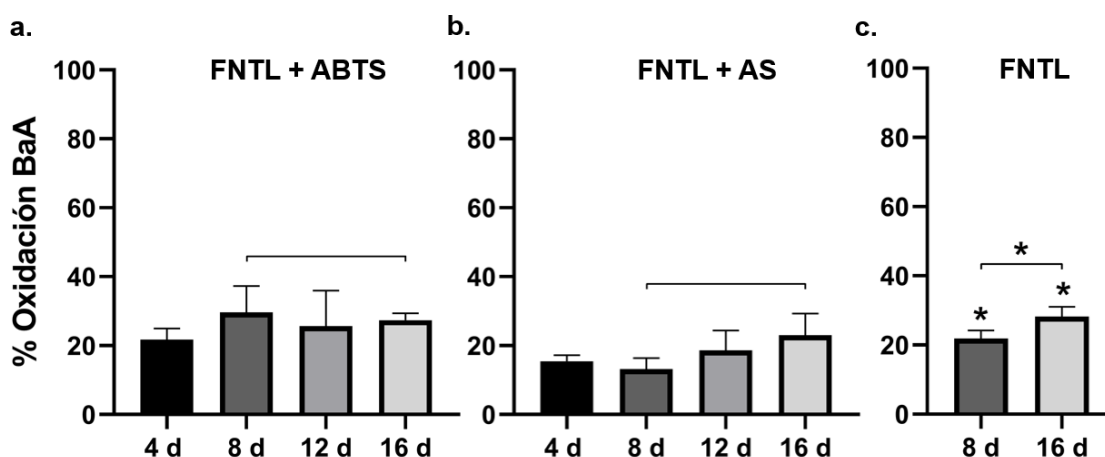


Figura 18. Evaluación de la degradación de benzo[a]antraceno en el tiempo. a. FNTL + ABTS, **b.** FNTL + AS, **c.** FNTL. Se utilizó BaA 0,05 mg/mL, lacasa 0,5 mg/mL, mediador ABTS y AS 2 mM y buffer universal Britton–Robinson pH 5,0. Se incubó la reacción a 40°C y agitación a 150 rpm por 4, 8, 12 y 16, agregando enzima cada 4 días. Las diferencias significativas, tanto al comparar las reacciones incubadas en el tiempo con el control (no graficado) como entre los 8 y 16 días de incubación en un mismo tratamiento enzimático, se indican como * = $p < 0,05$.

En el caso de BaP, se obtuvo un mayor porcentaje de degradación al utilizar enzima y ABTS, siendo éste cercano a un 70% a los 16 días de incubación de la reacción, con un aumento de casi un 15% de oxidación entre los 8 y 16 días (Figura 19a). Al evaluar los resultados del uso de enzima con el mediador AS, si bien se obtuvo una menor respuesta que al utilizar ABTS, el porcentaje de degradación alcanzó cerca del 30% a los 12 días de incubación de la reacción (Figura 19b). Los resultados indican que la enzima requiere el uso de mediadores para poder oxidar BaP de forma eficiente (Figura 19c).

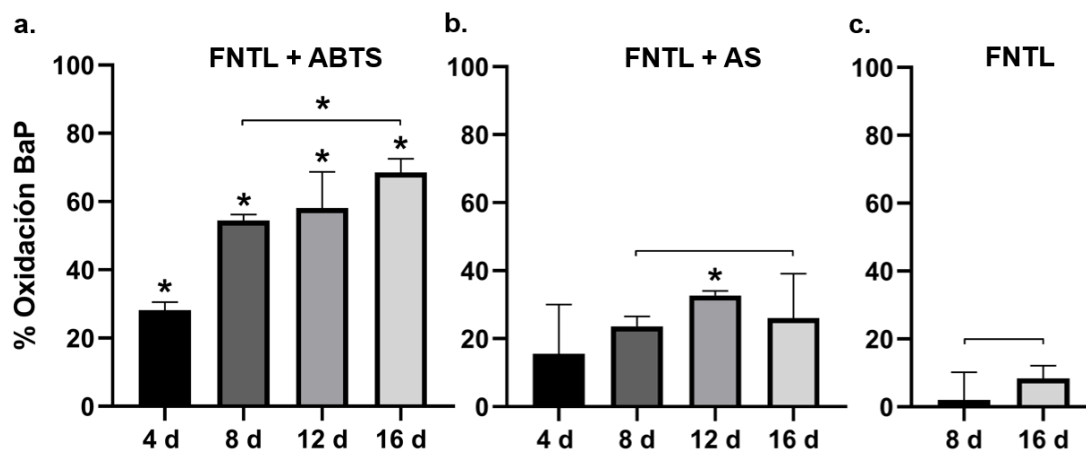


Figura 19. Evaluación de la degradación de benzo[a]pireno en el tiempo. a. FNTL + ABTS, b. FNTL + AS, c. FNTL Se utilizó BaP 0,05 mg/mL, lacasa 0,5 mg/mL, mediador ABTS y AS 2 mM y buffer universal Britton–Robinson pH 5,0. Se incubó la reacción a 40°C y agitación a 150 rpm por 4, 8, 12 y 16 días, agregando enzima cada 4 días. Las diferencias significativas, tanto al comparar las reacciones incubadas en el tiempo con el control (no graficado) como entre los 8 y 16 días de incubación en un mismo tratamiento enzimático, se indican como * = $p < 0,05$.

4.7. Detección de los compuestos de degradación de los HAPs estudiados.

Con el fin de detectar la formación de los posibles compuestos de degradación, se seleccionaron los cromatogramas correspondientes a las condiciones en las que se obtuvo un mayor porcentaje de degradación, siendo 16 días de incubación a 40°C y pH 5,0 empleando FNTL para BaA, y FNTL junto con el mediador ABTS para ANT y BaP.

Al evaluar los cromatogramas, se puede observar el pico cromatográfico correspondiente a la detección de los HAPs parentales: ANT, con un tiempo de retención de 20,449 min (Figura 20); BaA, con un tiempo de retención de 31,665 min (Figura 21); BaP, con un tiempo de retención de 36,637 min (Figura 22). Además, se puede observar la aparición de nuevos picos cromatográficos

asociados a la formación de moléculas más polares y que por consiguiente tienen un menor tiempo de retención que los HAPs estudiados, que corresponderían a los compuestos de degradación formados por la reacción.

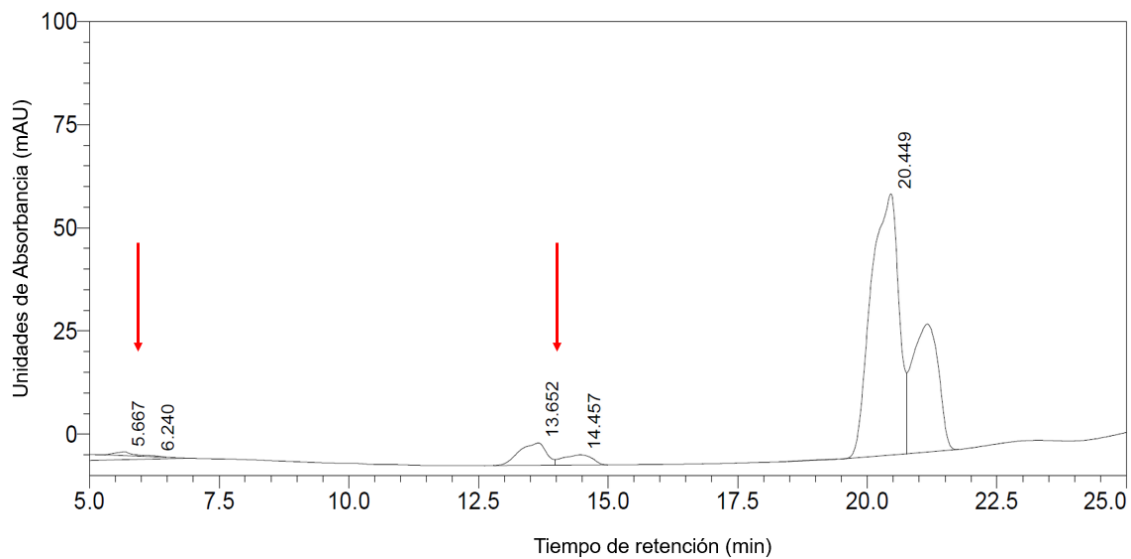


Figura 20. Cromatograma de la muestra de reacción de antraceno con enzima FNTL y ABTS. Números sobre los picos cromatográficos corresponden a los tiempos de retención de los analitos eluidos. Flechas rojas indican la aparición de los posibles productos de degradación.

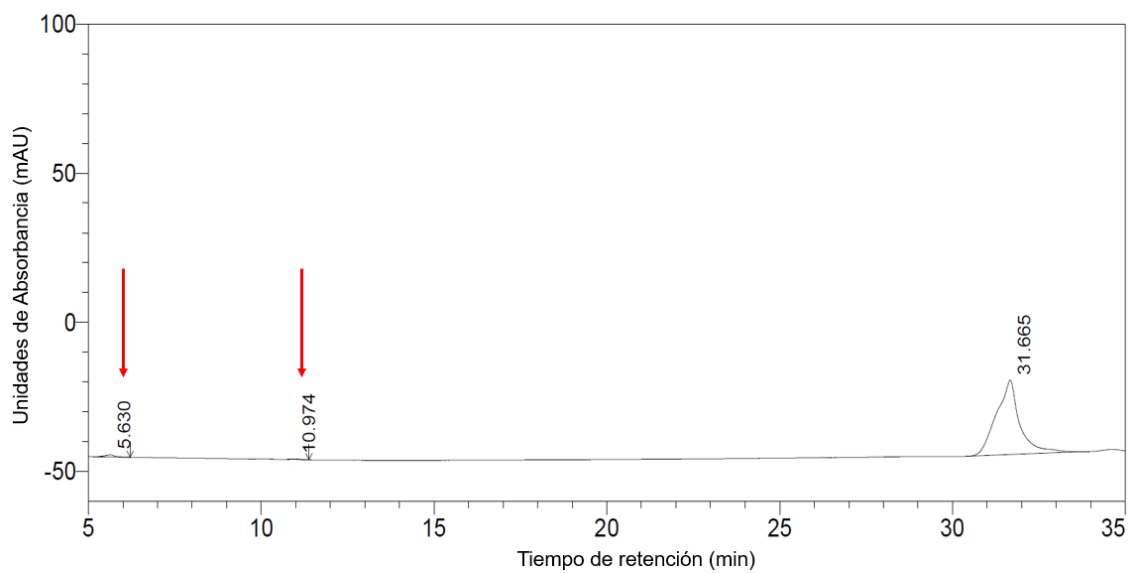


Figura 21. Cromatograma de la muestra de reacción de benzo[a]antraceno con enzima FNTL. Números sobre los picos cromatográficos corresponden a los tiempos de retención de los analitos eluidos. Flechas rojas indican la aparición de los posibles productos de degradación

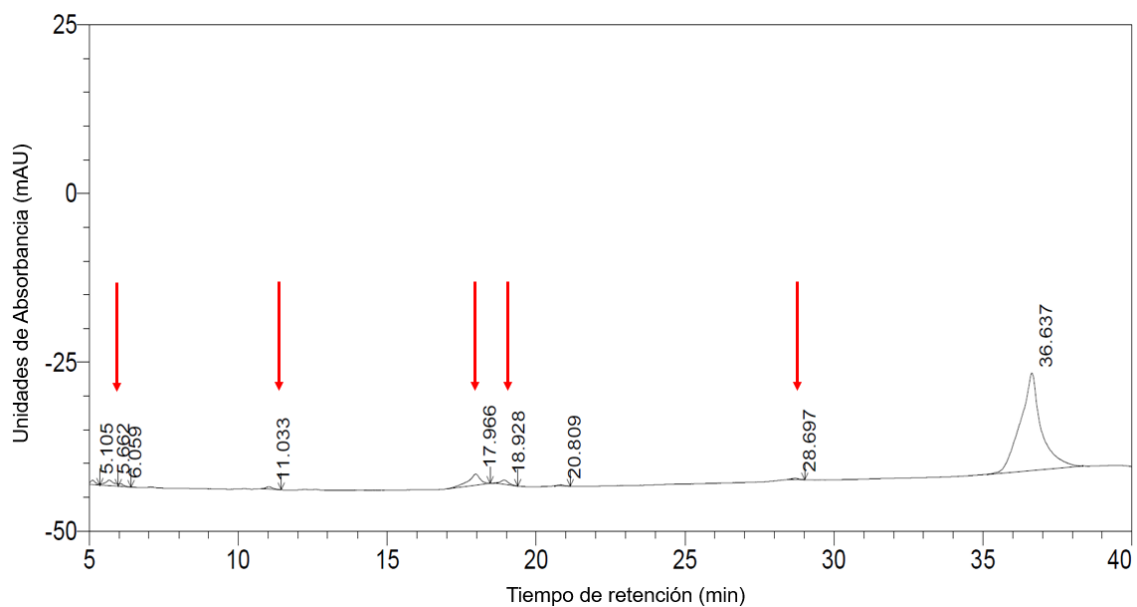


Figura 22. Cromatograma de la muestra de reacción de benzo[a]pireno con enzima FNTL y ABTS. Números sobre los picos cromatográficos corresponden a los tiempos de retención de los analitos eluidos. Flechas rojas indican la aparición de los posibles productos de degradación

5. DISCUSIÓN

5.1. Actividad lacasa de la enzima recombinante FNTL parcialmente purificada

Al realizar el ensayo enzimático a modo de control de la expresión funcional de la enzima recombinante, frente al sustrato SGZ, se obtuvo una actividad específica de 546.742 U/mg. La lacasa recombinante de *Bacillus* sp. FNT ha sido previamente comparada directamente con otras lacasas comerciales de origen fúngico, donde se demostró que FNTL es más activa en un amplio rango de temperatura (20-80 °C), utilizando en esta comparación el mismo ensayo y definición de unidad (Espina *et al.*, 2022).

Definiendo una unidad de actividad como la cantidad de enzima que cataliza la reacción de 1 μ mol de sustrato por minuto, se recalculó la actividad específica de esta enzima, siendo de 25 U/mg. Al comparar la actividad específica utilizando condiciones experimentales similares a las utilizadas en este estudio, con el sustrato SGZ y similar coeficiente de extinción usado para recalcular la actividad, la lacasa rBsu de *B. subtilis* presentó una actividad específica de 11,6 U/mg a 55°C (Basheer *et al.*, 2018) y el extracto crudo de la lacasa extracelular fúngica de la familia *Chaetomiaceae* presentó una actividad específica de 10,5 U/mg a 30°C (Saito *et al.*, 2003), por lo que la enzima FNTL parcialmente purificada utilizada en este trabajo presenta una actividad mayor y comparable a otras lacasas fúngicas y bacterianas.

El alto potencial biotecnológico de esta enzima lacasa FNT recombinante, desarrollada en Fundación Biociencia y objeto de estudio de esta tesis, amerita continuar los estudios, tanto desde el punto de vista fundamental como aplicado.

5.2. Determinación preliminar de HAPs y evaluación de su degradación por acción de la enzima lacasa FNTL mediante espectroscopía de fluorescencia total

Se escogió determinar los HAPs remanentes luego de la degradación mediante espectroscopía de fluorescencia total debido a que es una técnica eficiente para detectar HAPs de forma sencilla y rápida (Bortolato *et al.*, 2008). Esto permitió utilizarlo como una herramienta de *screening* previo a la separación por cromatografía.

Al analizar los resultados, se obtuvo que la intensidad de fluorescencia en la muestra extraída correspondía a aproximadamente un 24% con respecto al patrón del HAP utilizado (Figura 6b). Esto nos indicó que se estaba obteniendo una baja eficiencia en la extracción con n-hexano, lo que podría deberse a que el plástico utilizado para esos ensayos como material de trabajo estaba adsorbiendo los HAPs (Lee *et al.*, 2014), haciéndolos menos disponibles para la partición y, por lo tanto, no estarían pasando a la fase orgánica en la extracción. Es por eso que se decidió utilizar de aquí en adelante solo material de vidrio al utilizar los HAPs en solución acuosa y, además, evaluar si era posible obtener los espectros de fluorescencia sin necesidad de realizar la extracción, dado la

baja eficiencia de esta. Además, se decidió probar concentraciones más bajas de cada HAP, para permitir una mejor solubilización de éstos en el medio acuoso.

Al comparar la intensidad de fluorescencia de los HAPs en las distintas condiciones (Figura 8-10), se pudo observar que, en la mayoría de los casos, la señal aumenta en las condiciones donde se utiliza lacasa y mediador, con respecto al control (solo HAP). Dado que se determinan los HAPs remanentes luego de la degradación, se esperaba que la fluorescencia disminuyera con respecto al control. Al observar las EEMs de la enzima y/o enzima junto con los mediadores (Figura 7), se puede ver que el resto de los componentes de la reacción no influyen en la forma ni la intensidad de los espectros de fluorescencia de los HAPs, ya que no emiten en la región que emiten éstos; por lo que se les descartó como causantes del incremento de la fluorescencia luego de la incubación con la enzima. El aumento en la intensidad de fluorescencia de los HAPs podría explicarse por el hecho de que las moléculas policíclicas aromáticas sustituidas con grupos donantes de electrones como $-OH$ y $-OR$, presentan un aumento en el coeficiente de absorción molar, lo que resulta en un incremento de la absorbancia y consecuentemente de la fluorescencia, sin gran modificación de su espectro (Valeur & Berberan-Santos, 2012). Por lo tanto, el aumento de la intensidad de fluorescencia podría indicar que la lacasa estaría sustituyendo la molécula base, ya que los espectros de fluorescencia obtenidos para el control y los HAPs tratados no muestran diferencias en forma ni desplazamiento de las

longitudes de onda de emisión. Sin embargo, sí se observan diferencias en la intensidad de fluorescencia.

En base a lo mencionado anteriormente, algunas de las posibles moléculas generadas por la oxidación de estos HAPs podrían ser *cis*-1,2-dihidroantraceno-1,2-diol (Van Herwijnen *et al.*, 2003) o antraceno-9,10-diol (Swaathy *et al.*, 2014; Bibi *et al.*, 2018) para el caso del ANT; benzo[a]antraceno-10,11-diol, benzo[a]antraceno-8,9-diol, benzo[a]antraceno-5,6-diol (Schneider *et al.*, 1996; Moody *et al.*, 2005; Kunihiro *et al.*, 2013), benzo[a]antraceno-1,2-diol o benzo[a]antraceno-3,4-diol (Kunihiro *et al.*, 2013) para el caso del BaA. En cuanto a BaP, no se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia provocado por el tratamiento enzimático luego de 24 horas, lo que es esperable considerando que es un HAP que posee una gran estructura y, por lo tanto, es altamente recalcitrante y podría necesitar un mayor tiempo de incubación de la reacción.

Cabe destacar que estos resultados son preliminares y que al ser un *screening* inicial no cuentan con triplicados, por lo que no se puede realizar un análisis estadístico adecuado para la degradación de los HAPs mediante espectroscopía de fluorescencia total en las condiciones ensayadas. Sin embargo, es una técnica que permitió obtener información preliminar importante para poder realizar los cambios en cuanto a la concentración de los HAPs y de enzima utilizadas en las reacciones.

5.3. Evaluación de la degradación de HAPs por acción de la enzima lacasa FNTL y sus mediadores, mediante HPLC-DAD

Si bien se quería realizar la evaluación mediante espectroscopía de fluorescencia debido a que presenta ventajas en cuanto a gestión de residuos y tiempo, una de las técnicas más utilizadas para detectar HAPs en medio acuoso es mediante HPLC (Filipkowska *et al.*, 2005; Díaz-Moroles *et al.*, 2007); la que además permite separar los compuestos originales de sus productos de degradación.

Al evaluar la acción de la enzima FNTL y los mediadores sobre los HAPs, mediante HPLC-DAD, se obtuvo más de un 30% de degradación para ANT, a 30°C y 7 días de incubación de la reacción. Debido a que fue este HAP el que presentó mejores resultados y que las reacciones enzimáticas dependen fuertemente del pH utilizado en el medio de reacción y de la temperatura (Jin *et al.*, 2016; Bisswanger, 2017), recordando que esta enzima es termófila (Espina *et al.*, 2021), se decidió evaluar la degradación de ANT a pH 5,0, 6,0 y 7,0 y aumentar la temperatura a 40°C.

El pH óptimo obtenido para la degradación de ANT utilizando la enzima FNTL con el mediador ABTS resultó ser pH 5,0, lo que se condice con otros estudios en la evaluación de la oxidación de este HAP. Por ejemplo, al utilizar la lacasa fúngica de *Trametes versicolor* (pH 5,0) (Johannes *et al.*, 1996) o las lacasas bacterianas CotA de *B. subtilis* (pH 4,0) (Zeng *et al.*, 2016), CueO de *E. coli* pH

4,5) (Zeng *et al.*, 2011) y Lach5 de *Bacillus atrophaeus* (pH 5,0) (Wang *et al.*, 2022).

Una buena forma de evaluar una respuesta al contar con dos variables independientes, es evaluar cómo influye la interacción de estas variables a la vez y predecir la optimización de la respuesta, es el diseño de experimentos (Myers *et al.*, 2016). Se delimitó la evaluación a pHs ácidos cercanos al 5,0, ya que eran los pH del medio de reacción donde se habían obtenido porcentajes de degradación más altos. Además, se evaluó el uso de ABTS y AS. En el resultado de ambos modelos, se puede ver que se obtuvo altos porcentajes de degradación, y que este aumentaba a medida que aumentaban los días de incubación de la reacción. Si comparamos la respuesta experimental con la predicción de la respuesta dada por el modelo, podemos observar diferencias debido a que existe un error estadístico asociado (Myers *et al.*, 2016). Es por eso que, al confirmar los parámetros optimizados por el modelo, no se obtuvo el porcentaje de degradación de ANT esperado. Esto podría deberse al efecto de una variable experimental influyente no controlada y que requeriría ser identificada (Gutierrez & de la Vara, 2008).

Al evaluar la acción de la enzima FNTL y los mediadores sobre la degradación de BaA a 40°C y pH 5, se pudo observar que la enzima es capaz de oxidar directamente a BaA sin la necesidad de un mediador (Figura 18), lo que se

condice con lo obtenido en las primeras aproximaciones de su degradación (Figura 11).

Algunos estudios relacionan la capacidad de oxidación de las enzimas con el potencial de ionización (IP) de los HAPs. El IP se define como la energía necesaria para eliminar un electrón y formar un radical catión. Se ha descrito que las lacasas pueden oxidar HAPs de IPs $\leq 7,45$ eV (Cavaliere *et al.*, 1983). A modo de ejemplo, la lacasa fúngica de *Marasmius quercophilus* pudo oxidar ANT y BaP, con IPs menores a 7,5 eV, pero no pudo oxidar naftaleno (IP= 8,10 eV) ni fenantreno (IP= 8,19 eV) (Farnet *et al.* 2009). En base a esto, se podría esperar que la degradación de los HAPs estudiados dependan de sus IPs, lo que explicaría que la enzima FNTL pueda oxidar directamente a ANT (IP=7,45) y BaA (IP=7,43) (Lias *et al.*, 1988). No obstante, esta relación no fue observada en el caso de BaP, que posee una IP= 7,12 (Lias *et al.*, 1988). Esto se puede deber a que es un HAP de APM, y que por impedimento estérico no pueda entrar al sitio activo de la lacasa, impidiendo la oxidación directa de BaP.

El rol de los mediadores en la oxidación de los compuestos no fenólicos, como los HAPs, es aumentar la eficiencia catalítica de la reacción por formación de intermediarios con mayores potenciales redox que la lacasa, y que permiten el movimiento de los electrones entre la enzima y el sustrato (Guan *et al.*, 2018). Entre los mediadores más utilizados, se encuentran ABTS y HBT (Zeng *et al.*, 2016; Dodor *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022). Para el ABTS, la oxidación ocurre

en dos pasos: primero, ocurre la oxidación enzimática de ABTS al catión radical $ABTS^{\bullet+}$, seguido de su oxidación para formar el dicatión $ABTS^{+2}$. El primer paso es más rápido que el segundo, siendo el segundo paso el determinante de la velocidad, y que puede ser facilitado y acelerado por el aumento del oxígeno disponible en el medio de reacción (Wang *et al.*, 2022). En el caso de BaP, se ha visto una baja transformación en presencia de $ABTS^{\bullet+}$, la que incrementa considerablemente en presencia de $ABTS^{+2}$, siendo éste fundamental para su biotransformación (Mougin *et al.*, 2002). Para el HBT, la oxidación enzimática lleva a la formación de HBT^{\bullet} (Guan *et al.*, 2018). Los mecanismos por los cuales actúan estos intermediarios pueden ser por transferencia de electrones (ET) para el caso de ABTS, y transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), para el caso de HBT. Se ha visto que el intermediario formado por lacasa y HBT no es estable y se descompone en un compuesto no reducible, a diferencia del intermediario de ABTS, que es estable y cuya formación es reversible (Mougin *et al.*, 2002), lo que explicaría la baja obtención del porcentaje de degradación para ANT en este estudio (Figura 12).

A pesar de ser los mediadores sintéticos antes mencionados los más utilizados, se propone el uso de AS, un mediador de origen natural, de menor costo y más amigable con el medioambiente (Mani *et al.*, 2018), y es por estas ventajas que se ha empleado últimamente en el estudio de degradación de compuestos tóxicos, por ejemplo, en los tintes textiles (Espina *et al.*, 2021). Se ha propuesto que la vía del sistema lacasa-AS puede ser tanto a través de la ET como de la

HAT (Mani *et al.*, 2018). En este estudio, se obtuvo cerca de un 60% y 30%, tanto para ANT como para BaP, respectivamente, a pH 5,0 y 16 días de incubación de la reacción. A pesar de esto, sería interesante evaluar la oxidación a pH 6,4, confirmando la optimización del diseño de experimento.

En cuanto a BaA, se pudo observar que la presencia de mediadores no influyó en la obtención de un mayor porcentaje de degradación, probablemente porque la enzima FNTL debe presentar mayor afinidad por este HAP que por ABTS o AS. Se pueden realizar estudios de cinética enzimática utilizando BaA como sustrato para poder comparar y confirmar (Nelson & Cox, 2009).

Si bien se obtuvo un buen porcentaje de degradación para los tres HAPs estudiados, mayor al 60% de degradación para el caso de ANT y BaP y cercano al 30% en el caso de BaA, la oxidación de los HAPs podría ser afectada por diversos factores, tales como la estructura de la molécula, el potencial redox, la concentración de la enzima y la presencia de detergentes (Pozdnyakova, *et al.*, 2006). Se podría aumentar la eficiencia de la acción de la enzima, por ejemplo, mediante el uso de un sistema de micelas inversas en donde se forma un agregado de surfactante/solvente orgánico/enzima, el que ha demostrado poder mejorar la degradación de HAPs como fenantreno, antraceno, benzo[a]antraceno y benzo[b]fluoranteno (Xu *et al.*, 2020). Otra forma de aumentar la eficiencia enzimática es el uso de enzimas inmovilizadas, tal es el caso de la lacasa de *T. versicolor* inmovilizada en partículas magnéticas de Fe₃O₄ recubiertas de

quitosano, lo que ha mostrado una eficiente degradación de ANT y BaP en 48 h (Deng *et al.*, 2022).

Como se mencionó al principio de este estudio, esta enzima termófila es activa en un amplio rango de temperaturas. A 40°C, presenta una actividad menor al 40% con respecto a su temperatura óptima, que es 80°C (Espina *et al.*, 2021). A pesar de esto, se puede ver que la enzima es capaz de oxidar los HAPs con y sin la presencia de mediadores en el medio de reacción a una temperatura menor a la óptima. Sería interesante evaluar la oxidación de los HAPs a temperaturas cercanas a su óptimo, pues se presume que este porcentaje podría ser aún mayor o bien, en un menor tiempo de reacción.

Debido a que el medio ambiente acuático está contaminado por una mezcla de HAPs y no por compuestos individuales, otro enfoque importante de proyección en el estudio de la degradación de HAPs, es evaluar la acción de esta enzima FNTL y el sistema mediador de lacasa con ABTS o AS sobre una mezcla de estos contaminantes altamente recalcitrantes. En un estudio realizado por Dodor *et al.*, 2018, se utilizó la lacasa de *T. versicolor* inmovilizada en la degradación de mezclas de ANT, BaP, BaA y pireno. En éste se observó que, a pesar de tener un buen porcentaje de degradación de manera individual, la lacasa tenía una mayor afinidad por la oxidación de ANT en la mezcla de compuestos (Dodor *et al.*, 2018), por lo que sería interesante evaluar la aplicación biotecnológica en la oxidación de mezclas de HAPs por la enzima FNTL.

5.4. Posibles productos de la degradación de HAPs por la enzima FNTL

Al evaluar los cromatogramas de las mezclas de reacción donde se obtuvo mayores porcentajes de degradación, se puede observar la formación de picos cromatográficos que eluyen a un tiempo de retención menor a los de los HAPs parentales y que no están asociados a los picos cromatográficos esperados para los mediadores (datos no mostrados). Esto indica la formación de moléculas más polares en la mezcla de reacción.

Al comparar con otros estudios, se ha demostrado que los productos de oxidación de ANT y BaP por la lacasa CueO de *E. coli* son los mismos que los obtenidos al utilizar la lacasa fúngica de *T. versicolor* (Zeng *et al.*, 2011). Como se ha visto en otros estudios, las quinonas son los principales productos de la oxidación de los HAPs, identificando a la antraquinona como producto final de la oxidación de la ANT (Alcalde *et al.*, 2002; Cañas *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2011). Este es un compuesto relativamente inerte que no se reduce con los reactivos habituales utilizados para la reducción de quinonas (Alcalde *et al.*, 2002). Específicamente, la 9,10-antraquinona fue el principal producto identificado por separación por HPLC al usar la lacasa CueO de *E. coli* con ABTS 1 mM (Zeng *et al.*, 2011), y lo mismo se encontró al usar la lacasa de *T. versicolor* con ABTS 2 mM (Johannes *et al.*, 1996). Además, la antrona y la antraquinona fueron los productos identificados por separación GC-MS utilizando lacasa de *Leucoagaricus gongylophorus* (Ike *et al.*, 2019).

En el caso de la vía de degradación de BaP, cuando ABTS está presente como mediador redox, la lacasa oxida el sustrato a benzo[a]pireno-1,6-, 3,6- y 6,12-quinonas (Hu *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2011 Kadri *et al.*, 2017). Una vez que BaP es oxidado por el ABTS⁺², el radical catiónico de BaP quedaría susceptible a ataques nucleofílicos de las moléculas presentes en el medio de reacción, por ejemplo, por aniones acetatos al utilizar buffer acetato de sodio, el que llevaría a la formación de 6-benzo[a]pirenil acetato (Cañas *et al.*, 2007).

Por otro lado, para BaA, se ha propuesto que, primero, se forma el intermedio 9,10-dihidroxibenzo[a]antraceno y, luego, se produce la oxidación y escisión del anillo para formar fenantreno, siendo catalizado de la misma manera para formar ftalato de dietilo. Este ftalato de dietilo se convierte en 1,2-benceno dicarboxílico, 1-etiléster por hidrólisis de cadena lateral, concluyendo con la formación de anhídrido butírico causado por la ruptura del anillo y la deshidratación (Xu *et al.*, 2020).

Considerando lo anteriormente mencionado, se esperaría que los picos cromatográficos detectados en los cromatogramas correspondieran a las quinonas formadas por la acción de la enzima sobre los HAPs, o bien, que ocurra la apertura del anillo base, dando como resultado la formación de moléculas menos complejas y más polares. Teniendo en cuenta lo reportado en la literatura para otras lacasas bacterianas y fúngicas descritas anteriormente, es posible plantear un perfil de degradación de HAPs similar para FNTL. Sin embargo, se

requieren análisis específicos adicionales para detectar e identificar estos compuestos formados. Dentro de los posibles análisis a realizar, el análisis por GC-MS o HPLC-MS permitiría dilucidar el mecanismo de degradación para esta enzima por identificación de los compuestos de degradación generados.

Finalmente, se ha reportado el uso de los posibles productos de degradación mencionados como precursores y reactivos en diferentes ámbitos de la industria. El anhídrido butírico se ha utilizado en la síntesis de surfactantes (Zhang *et al.*, 2017) y modificación química de polímeros para mejorar sus propiedades (Narlıoğlu, 2022). Los derivados antraquinónicos, como 9,10-antraquinona, tienen diversas aplicaciones en la industria, por ejemplo, en el mejoramiento de baterías (Guo *et al.*, 2015) y modificación química de celdas solares orgánicas (Do *et al.*, 2017).

6. CONCLUSIONES

- Los resultados de este estudio demuestran que esta nueva lacasa recombinante, proveniente del microorganismo termoalcalófilo *Bacillus* sp. FNT, presenta potencial para utilizarse en la eliminación de HAPs en ambientes acuáticos. A la fecha, la lacasa FNT es la primera lacasa proveniente de una bacteria termófila reportada con la capacidad de degradar los HAPs evaluados en este estudio, representativos de estos contaminantes orgánicos de 3-5 anillos.
- Mediante el método de superficie de respuesta se establecieron las condiciones que permitieron maximizar la degradación de los HAPs; siendo de 16 días de incubación y pH 5,0 en el uso de ABTS y 16 días de incubación y pH 6,4 para AS.
- Se logró más de un 60% de degradación de ANT y BaP mediante la acción de la enzima FNTL junto con el mediador ABTS, a los 16 días de reacción. Mientras que para BaA, se logró una oxidación directa por parte de la enzima FNTL, alcanzando cerca de un 30% de degradación a los 16 días de incubación de la reacción.

7. PROYECCIONES

- Identificación de los compuestos obtenidos por la degradación mediante GC-MS o HPLC-MS.
- Es necesario realizar estudios de genotoxicidad y/o citotoxicidad de los compuestos obtenidos por la degradación antes de utilizar esta enzima en la biorremediación de agua contaminada con HAPs.

REFERENCIAS

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107-123.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2009). Case Studies in Environmental Medicine. Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).
- Aguirre-Martínez, G., Rudolph, A., Ahumada, R., Loyola, R., & Medina, V. (2009). Toxicidad no específica en sedimentos portuarios, una aproximación al contenido de contaminantes críticos: An approach to the content of critical pollutants. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44(3), 725-735.
- Alarcón, F., Báez, M. E., Bravo, M., Richter, P., Escandar, G. M., Olivieri, A. C., & Fuentes, E. (2013). Feasibility of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils via unfolded partial least-squares/residual bilinearization and parallel factor analysis of fluorescence excitation emission matrices. *Talanta*, 103, 361-370.
- Alcalde, M., Bulter, T., & Arnold, F. H. (2002). Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *SLAS Discovery*, 7(6), 547-553.
- Alegbeleye, O. O., Opeolu, B. O., & Jackson, V. A. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation. *Environmental Management*, 60(4), 758-783.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., de los Santos, M. H., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 200.

- Bains, J., Capalash, N., & Sharma, P. (2003). Laccase from a non-melanogenic, alkalotolerant γ -proteobacterium JB isolated from industrial wastewater drained soil. *Biotechnology Letters*, 25, 1155-1159.
- Barrios-Estrada, C., de Jesús Rostro-Alanis, M., Muñoz-Gutiérrez, B. D., Iqbal, H. M., Kannan, S., & Parra-Saldívar, R. (2018). Emergent contaminants: endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation—a review. *Science of The Total Environment*, 612, 1516-1531.
- Basheer, S., Rashid, N., Akram, M. S., & Akhtar, M. (2018). A highly stable laccase from *Bacillus subtilis* strain R5: gene cloning and characterization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(3), 436-445.
- Bauer, R., & Rupe, C. O. (1971). Use of syringaldazine in a photometric method for estimating "free" chlorine in water. *Analytical Chemistry*, 43(3), 421-425.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Bibi, N., Hamayun, M., Khan, S. A., Iqbal, A., Islam, B., Shah, F., Khan, M. A. & Lee, I. J. (2018). Anthracene biodegradation capacity of newly isolated rhizospheric bacteria *Bacillus cereus* S13. *Plos One*, 13(8), e0201620.
- Bisswanger, H. (2017). pH and temperature dependence of enzymes. *Enzyme Kinetics*, 145-152.
- Bonert, C., Pinto, L., & Estrada, R. (2006). Determinación de hidrocarburos en muestras de agua y sedimentos alrededor de la isla Robinson Crusoe. *Ciencia y Tecnología del Mar*, 29(2), 23-26.
- Bortolato, S. A., Arancibia, J. A., & Escandar, G. M. (2008). Chemometrics-assisted excitation– emission fluorescence spectroscopy on nylon membranes. Simultaneous determination of benzo [a] pyrene and dibenz [a, h] anthracene at parts-per-trillion levels in the presence of the remaining

EPA PAH priority pollutants as interferences. *Analytical Chemistry*, 80(21), 8276-8286.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C., & Arnold, F. H. (2003). Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 987-995.
- Cañas, A. I., Alcalde, M., Plou, F., Martínez, M. J., Martínez, Á. T., & Camarero, S. (2007). Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environmental Science & Technology*, 41(8), 2964-2971.
- Cavalieri, E. L., Rogan, E. G., Roth, R. W., Saugier, R. K., & Hakam, A. (1983). The relationship between ionization potential and horseradish peroxidase/hydrogen peroxide-catalyzed binding of aromatic hydrocarbons to DNA. *Chemico-biological Interactions*, 47(1), 87-109.
- Chandra, R., & Chowdhary, P. (2015). Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(2), 326-342.
- Chauhan, P. S., Goradia, B., & Saxena, A. (2017). Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech*, 7(5), 323.
- Chaurasia, P. K., Bharati, S. L., Yadava, S., & Yadav, R. S. S. (2015). Purification, characterization, and synthetic application of a thermally stable laccase from *Hexagonia tenuis* MTCC-1119. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 52, 60-67.
- Chefetz, B., Chen, Y., & Hadar, Y. (1998). Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3175-3179.

- Chen, G., & White, P. A. (2004). The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(2-3), 151-225.
- Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. (2da edición). Wiley-VCH, Inc.
- Dai, X., Lv, J., Yan, G., Chen, C., Guo, S., & Fu, P. (2020). Bioremediation of intertidal zones polluted by heavy oil spilling using immobilized laccase-bacteria consortium. *Bioresource Technology*, 123305.
- Deng, J., Wang, H., Zhan, H., Wu, C., Huang, Y., Yang, B., Mosa, A. & Ling, W. (2022). Catalyzed degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by recoverable magnetic chitosan immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 301, 134753.
- Díaz-Moroles, N. E., Garza-Ulloa, H. J., Castro-Ríos, R., Ramírez-Villarreal, E. G., Barbarín-Castillo, J. M., dela Luz Salazar-Cavazos, M., & Waksman-de Torres, N. (2007). A comparison of the performance of two chromatographic and three extraction techniques for the analysis of PAHs in sources of drinking water. *Journal of Chromatographic Science*, 45(2), 57-62.
- Do, T. T., Rundel, K., Gu, Q., Gann, E., Manzhos, S., Feron, K., ... & Sonar, P. (2017). 9-Fluorenone and 9, 10-anthraquinone potential fused aromatic building blocks to synthesize electron acceptors for organic solar cells. *New Journal of Chemistry*, 41(8), 2899-2909.
- Dodor, D. E., Miyittah, M., & Ahiabor, B. D. (2018). Immobilized laccase mediator-catalyzed oxidation of aqueous mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 40(3), 563-573.
- Espina, G., Cáceres-Moreno, P., Mejías-Navarrete, G., Ji, M., Sun, J., & Blamey, J. M. (2021). A novel and highly active recombinant spore-coat bacterial laccase, able to rapidly biodecolorize azo, triarylmethane and anthraquinonic dyestuffs. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 298-306.

- Espina, G., Muñoz-Ibacache, S. A., Cáceres-Moreno, P., Amenabar, M. J., & Blamey, J. M. (2022). From the discovery of Extremozymes to an enzymatic product: roadmap based on their applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 752281.
- Farnet, A. M., Gil, G., Ruaudel, F., Chevremont, A. C., & Ferre, E. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon transformation with laccases of a white-rot fungus isolated from a Mediterranean *Schlerophyllous litter*. *Geoderma*, 149(3-4), 267-271.
- Gallagher, S., & Sasse, J. (1998). Protein analysis by SDS-PAGE and detection by Coomassie blue or silver staining. *Current Protocols in Pharmacology*, 2(1), A-3B.
- Gran-Scheuch, A., Fuentes, E., Bravo, D. M., Jiménez, J. C., & Pérez-Donoso, J. M. (2017). Isolation and characterization of phenanthrene degrading bacteria from diesel fuel-contaminated Antarctic soils. *Frontiers in Microbiology*, 1634.
- Guan, Z. B., Luo, Q., Wang, H. R., Chen, Y., & Liao, X. R. (2018). Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(19), 3569-3592.
- Guo, L., & Lee, H. K. (2011). Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1218(31), 5040-5046.
- Gutierrez, H & de la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. (2da edición). McGraw Hill.
- Gyórfy, E., Anna, L., Győri, Z., Segesdi, J., Minárovits, J., Soltész, I., ... & Schoket, B. (2004). DNA adducts in tumor, normal peripheral lung and bronchus, and peripheral blood lymphocytes from smoking and non-smoking lung cancer patients: correlations between tissues and detection

by 32 P-postlabelling and immunoassay. *Carcinogenesis*, 25(7), 1201-1209.

- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 1-15.
- Harris, D. C. (2003). *Análisis químico cuantitativo*. (3da edición). Editorial Reverté
- Harvey, R. G. (1998). Environmental chemistry of PAHs. En Neilson, A. (Ed.), *PAHs and related compounds* (pp. 1-54). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Henkler, F., Stolpmann, K., & Luch, A. (2012). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 3: Environmental Toxicology*, 107-131.
- Hernández-Sámano, A. C., Guzmán-García, X., García-Barrientos, R., Ascencio-Valle, F., Sierra-Beltrán, A., Vallejo-Córdoba, B., González-Córdoba, A. F., Torres-Llanez, M. J., & Guerrero-Legarreta, I. (2015). Extracción y caracterización de proteasas de pepino de mar *Isostichopus fuscus* recolectado en el Golfo de California, México. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(1), 35-47.
- Holmgren, A., & Bjornstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. En *Methods in Enzymology* (Vol. 252, pp. 199-208). Academic Press.
- Hu, X., Wang, P., & Hwang, H. M. (2009). Oxidation of anthracene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, 100(21), 4963-4968.
- Hu, X., Zhang, Y., Zhao, X., & Hwang, H. M. (2007). Biodegradation of benzo[a]pyrene with immobilized laccase: Genotoxicity of the products in HaCat and A3 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48(2), 106-113.

- Ike, P. T. L., Birolli, W. G., Dos Santos, D. M., Porto, A. L. M., & Souza, D. H. F. (2019). Biodegradation of anthracene and different PAHs by a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 8675-8684.
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 966.
- Jin, X., Yu, X., Zhu, G., Zheng, Z., Feng, F., & Zhang, Z. (2016). Conditions optimizing and application of laccase-mediator system (LMS) for the laccase-catalyzed pesticide degradation. *Scientific Reports*, 6(1), 35787.
- Johannes, C., Majcherczyk, A., & Hüttermann, A. (1996). Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 313-317.
- Kadri, T., Rouissi, T., Brar, S. K., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 51, 52-74.
- Kunihiro, M., Ozeki, Y., Nogi, Y., Hamamura, N., & Kanaly, R. A. (2013). Benz[a]anthracene biotransformation and production of ring fission products by *Sphingobium* sp. strain KK22. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4410-4420.
- Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A., & Spettoli, P. (2000). Biodegradation of phenols by laccase immobilized in a membrane reactor. *Process Biochemistry*, 36(1-2), 51-58.
- Lee, H., Shim, W. J., & Kwon, J. H. (2014). Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals. *Science of The Total Environment*, 470, 1545-1552.

- Lias, S. G., Bartmess, J. E., Liebman, J. F., Holmes, J. L., Levin, D., & Mallard, W. G. (1988). Gas phase ion and neutral thermochemistry. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17, S1
- Mani, P., Fidal Kumar, V. T., Keshavarz, T., Chandra, T. S., & Kyazze, G. (2018). The role of natural laccase redox mediators in simultaneous dye decolorization and power production in microbial fuel cells. *Energies*, 11(12), 3455.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., & Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(1), 27-36.
- Mate, D. M., & Alcalde, M. (2017). Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1457-1467.
- Moody, J. D., Freeman, J. P., & Cerniglia, C. E. (2005). Degradation of benz [a] anthracene by *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1. *Biodegradation*, 16, 513-526.
- Mougín, C., Jolival, C., Malosse, C., Chaplain, V., Sigoillot, J. C., & Asther, M. (2002). Interference of soil contaminants with laccase activity during the transformation of complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid media. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 22(3-4), 673-688.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons.
- Narlıoğlu, N. (2022). Effect of butyric anhydride modification on properties of wood-poly(lactic acid) 3D-printed composites. *Bioresources*, 17(1), 132.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). *Lehninger Principios de Bioquímica*. (5ta edición). Ediciones Omega.
- Niu, J., Dai, Y., Guo, H., Xu, J., & Shen, Z. (2013). Adsorption and transformation of PAHs from water by a laccase-loading spider-type reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 248, 254-260.

- Patel, A. B., Shaikh, S., Jain, K. R., Desai, C., & Madamwar, D. (2020). Polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, toxicity, and remediation approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11, 562813.
- Pozdnyakova, N. N., Rodakiewicz-Nowak, J., Turkovskaya, O. V., & Haber, J. (2006). Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 in the presence of synthetic mediators. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(6), 1242-1249.
- Rahimi, E., Rezaei, S., Mohamadnia, S., Valizadeh, S., Tavakoli, O., & Faramarzi, M. A. (2022). Bioremoval and Detoxification of Anthracene by a Halophilic Laccase from *Alkalibacillus salilacus*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 20(2), 67-78.
- Rudolph, A., Franco, C., Becerra, J., Barros, A., & Ahumada, R. (2002). Evaluación de materia orgánica e hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos superficiales, bahía Concepción-Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 47(4), 403-410.
- Saito, T., Hong, P., Kato, K., Okazaki, M., Inagaki, H., Maeda, S., & Yokogawa, Y. (2003). Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family *Chaetomiaceae*) isolated from soil. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4), 520-526.
- Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., & Warshawsky, D. (1996). Degradation of pyrene, benz [a] anthracene, and benzo [a] pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 13-19.
- Skoog, D., West, D., Holler, F. J. y Crouch, S. R. (2015) *Fundamentos de química analítica*. Novena Edición.
- Stigliani, W. M., Jaffe, P. R., & Anderberg, S. (1993). Heavy metal pollution in the Rhine basin. *Environmental Science & Technology*, 27(5), 786-793.
- Swaathy, S., Kavitha, V., Pravin, A. S., Mandal, A. B., & Gnanamani, A. (2014). Microbial surfactant mediated degradation of anthracene in

aqueous phase by marine *Bacillus licheniformis* MTCC 5514. *Biotechnology Reports*, 4, 161-170.

- Tetianec, L., Chaleckaja, A., Vidziunaite, R., Kulys, J., Bachmatova, I., Marcinkeviciene, L., & Meskys, R. (2014). Development of a laccase/syringaldazine system for NAD(P)H oxidation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101, 28-34.
- US EPA. (1998). Locating and estimating air emissions from sources of polycyclic organic matter. *Research Triangle Park (NC): United States Environmental Protection Agency*. Disponible en: <https://www3.epa.gov/ttn/chiefl/pompta.pdf>
- US EPA. (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Disponible en: <https://archive.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/web/pdf/pahs.pdf>
- Valeur, B., & Berberan-Santos, M. N. (2012). *Molecular Fluorescence: principles and applications*. Wiley-VCH
- Valizadeh, S., Rezaei, S., Mohamadnia, S., Rahimi, E., Tavakoli, O., & Faramarzi, M. A. (2022). Elimination and detoxification of phenanthrene assisted by a laccase from halophile *Alkalibacillus almallahensis*. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 20(1), 227-239.
- Van Herwijnen, R., Springael, D., Slot, P., Govers, H. A., & Parsons, J. R. (2003). Degradation of anthracene by *Mycobacterium sp.* strain LB501T proceeds via a novel pathway, through o-phthalic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 186-190.
- Vondráček, J., & Machala, M. (2021). The role of metabolism in toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their non-genotoxic modes of action. *Current Drug Metabolism*, 22(8), 584-595.
- Wang, L., Tan, Y., Sun, S., Zhou, L., Wu, G., Shao, Y., Wang, M. & Xin, Z. (2022). Improving Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Bacillus atrophaeus* Laccase Fused with *Vitreoscilla* Hemoglobin and a Novel Strong Promoter Replacement. *Biology*, 11(8), 1129.

- Wright, D. A., & Welbourn, P. (2002). *Environmental Toxicology* (Vol. 11). Cambridge University Press.
- Xu, P., Du, H., Peng, X., Tang, Y., Zhou, Y., Chen, X., Fei, J., Meng, Y., & Yuan, L. (2020). Degradation of several polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase in reverse micelle system. *Science of The Total Environment*, 708, 134970.
- Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, I., & Kiso, H. (1982). Proteolytic enzymes in green asparagus, kiwi fruit and miut: occurrence and partial characterization. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(8), 1983-1986.
- Yan, J., Wang, L., Fu, P. P., & Yu, H. (2004). Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557(1), 99-108.
- Yaropolov, A. I., Skorobogat'Ko, O. V., Vartanov, S. S., & Varfolomeyev, S. D. (1994). Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49, 257-280.
- Zeng, J., Lin, X., Zhang, J., Li, X., & Wong, M. H. (2011). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the bacterial laccase CueO from *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1841-1849.
- Zeng, J., Zhu, Q., Wu, Y., & Lin, X. (2016). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons using *Bacillus subtilis* CotA with high laccase activity and copper independence. *Chemosphere*, 148, 1-7.
- Zhang, Z., Zhang, Y., Lin, Z., Mulyadi, A., Mu, W., & Deng, Y. (2017). Butyric anhydride modified lignin and its oil-water interfacial properties. *Chemical Engineering Science*, 165, 55-64.

Anexo

Consideraciones sobre la obtención de lacasa recombinante y evaluación de su actividad enzimática

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información acerca de la cinética de la reacción y la especificidad de la enzima por el sustrato.

Cuando se quiere caracterizar una enzima en términos de sus propiedades y actividad catalítica, se requiere obtener una preparación pura de la enzima. Para esto, se realizan distintos pasos y técnicas de purificación, donde se utilizan métodos físicos y/o cromatográficos, aprovechando las distintas propiedades de las proteínas, por ejemplo, su tamaño, cargas o propiedades de unión (Nelson & Cox, 2009). Generalmente, se realizan pasos de purificación por diálisis y cromatografía en columnas (Nelson & Cox, 2009).

La actividad enzimática se refiere a la cantidad de enzima activa presente y a su nivel de actividad catalítica, por lo que la medición de la actividad depende de las condiciones específicas para el ensayo enzimático. Los ensayos enzimáticos miden la cantidad de sustrato consumido o el producto generado en la reacción por unidad de tiempo tomando en cuenta el volumen de reacción (Copeland, 2000). Existe un gran número de métodos diferentes para medir la concentración de sustratos y productos, y las enzimas pueden ser ensayadas de diferentes maneras, con distintas definiciones de unidad de actividad enzimática.

Las unidades totales de actividad enzimática y la concentración de la proteína total disminuyen a medida que se realizan los distintos pasos de purificación de forma exitosa. La actividad disminuye porque siempre se produce alguna pérdida

de actividad debido a inactivación parcial de la enzima o a interacciones no óptimas de la enzima con las matrices cromatográficas o con otras moléculas de la disolución. Por otra parte, la actividad específica de la enzima aumenta debido a que, en cada paso de purificación, las proteínas que no corresponden a la enzima en estudio van siendo eliminadas (Copeland, 2000; Nelson & Cox, 2009), lo que se refleja en la concentración total de proteínas en cada paso de purificación. Así, la actividad específica constituye una medida de la pureza enzimática: aumenta en cada paso de purificación y llega a ser máxima y constante cuando la enzima está pura (Nelson & Cox, 2009).

Con el fin de obtener la lacasa recombinante de *Bacillus* sp. FNT, las células del hospedero heterólogo *E. coli* BL21 transformadas con el vector que contiene el gen codificante de la enzima para expresión intracelular, se crecieron en medio de autoinducción a 23°C por 30 h y agitación de 160 rpm, y luego se cosecharon mediante centrifugación. El pellet celular se homogeneizó en buffer y se incubó con la enzima lisozima, para la lisis de las paredes celulares de las bacterias que expresan la enzima de interés, seguido de lisis por sonicación, como método mecánico. Posteriormente, se realizó el fraccionamiento mediante centrifugación, en donde se obtuvo la fracción soluble, enriquecida con nuestra enzima de interés expresada de forma intracelular. En este trabajo, se realizó un paso de semi purificación donde la fracción soluble fue sometida a un choque térmico a 85°C, el que permitió desnaturar las proteínas nativas de *E. coli* sensibles a temperatura y obtener una fracción enriquecida de nuestra enzima de interés.

Luego, como control de la expresión soluble y funcional de la enzima, se realizó el ensayo de detección de actividad lacasa. Para esto, se realizó una curva de progreso de la formación del producto de la oxidación directa del sustrato siringaldazina a tetra-metoxi-azo-bis-metilenquinona, por acción de la lacasa. Esto se realizó mediante un método espectrofotométrico (ensayo continuo)

siguiendo el cambio de absorbancia a 530 nm en el tiempo (Lante *et al.*, 2000). Para el cálculo de actividad, se selecciona la velocidad inicial de la reacción, en condiciones de saturación de sustrato y concentraciones bajas de enzima (Copeland, 2000). Ya que la velocidad de una reacción a una temperatura y pH dados depende de la concentración de enzima y de la concentración de sustrato. Siempre que la concentración de sustrato se mantenga en exceso, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de enzima.

En general, una "unidad" de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que proporciona una cierta cantidad de actividad catalítica en condiciones específicas. De acuerdo con la definición internacional de unidades (IU) de actividad, se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la transformación de 1 μmol de sustrato por minuto (Copeland, 2000).

Para algunas enzimas, incluidas proteasas y otras oxidoreductasas (Yamaguchi *et al.*, 1981; Holmgren & Björnstedt, 1995; Hernández-Sámano *et al.*, 2015) se utilizan algunas definiciones no estándar de Unidad. Estas consideran el cambio de absorbancia específicamente en el tiempo dentro del intervalo lineal de la curva de progreso en una solución que contiene una concentración de sustrato en exceso.

En un ensayo espectrofotométrico, la curva de progreso se obtiene siguiendo la velocidad a la cual el sustrato se convierte en producto, asociado al cambio de absorbancia del producto formado aplicando la ley de Lambert-Beer (Copeland, 2000):

$$A = \epsilon x l x C$$

Donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción, l es el paso óptico de la cubeta (expresado en cm) y C es la concentración.

Al tomar en cuenta el volumen total del ensayo enzimático y el volumen de la enzima utilizada, se puede expresar la actividad volumétrica como:

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta A \times V_{total} \times FD}{\Delta t \times \epsilon \times l \times V_{enzima}}$$

Donde U/mL corresponde a la actividad volumétrica, $\Delta A/\Delta t$ corresponde al cambio de absorbancia en el tiempo del producto formado, V total es el volumen total del ensayo, FD es el factor de dilución de la enzima, ϵ corresponde al coeficiente de extinción, l corresponde al paso óptico de la cubeta y V enzima es el volumen que se agrega de enzima en el ensayo enzimático.

Al dividir el valor de actividad volumétrica (U/mL) por la concentración de proteínas totales, expresada en mg/mL, se puede calcular la actividad específica (U/mg).

$$\frac{U}{mg} = \frac{U/mL}{mg/mL}$$

El coeficiente de extinción (o absortividad molar) es una característica que corresponde a la cantidad de luz que absorbe una molécula excitada a una longitud de onda determinada (Harris, 2003). El coeficiente de extinción varía en función del disolvente, de la composición de la disolución y la temperatura (Skoog *et al.*, 2015). Se ha determinado el coeficiente de extinción para la SGZ oxidada a 530 nm a 25°C ($\epsilon=65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Bauer *et al.*, 1971). En varios trabajos donde estudian la oxidación de SGZ con la enzima lacasa, se ha usado $\epsilon= 65$

mM⁻¹ cm⁻¹ a 25°C y pH 6 (Bulter *et al.*, 2002; Tetianec *et al.*, 2014) y 50°C y pH 6 (Chaurasia *et al.*, 2015), ε=65.000 M⁻¹ cm⁻¹ a 55°C y pH 7 (Basheer *et al.*, 2018), ε=64.000 M⁻¹ cm⁻¹ a 30°C y pH 7 (Saito *et al.*, 2003) y 50°C y pH 6 (Chefetz *et al.*, 1998). Cabe destacar que, para el caso de estos últimos trabajos donde estudian lacasas, en ninguno se determinó empíricamente el coeficiente de extinción, y las condiciones experimentales difieren de las condiciones óptimas de la lacasa ensayada en este trabajo (70°C). Así, si se quisiera expresar la actividad de la enzima de acuerdo con la definición internacional de unidades, es necesario realizar el cálculo del coeficiente de extinción a 70°C, utilizando buffer KH₂PO₄ pH 6,0, determinado experimentalmente utilizando la ley de Beer (Skoog *et al.*, 2015).

En el caso del ensayo espectrofotométrico de actividad lacasa utilizado en este trabajo, no se utilizó la definición internacional de unidad. Si no que, en base a la literatura y trabajos previos, se definió una unidad de actividad (U) como la cantidad de enzima que incrementa la absorbancia a 530 nm en 0,001 unidades de absorbancia por minuto, en las condiciones ensayadas, siguiendo la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{mL} = \frac{((Abs_{530nm}/\text{min ensayo}) - (Abs_{530nm}/\text{min blanco})) \times FD}{0,001 \times \text{Volumen enzima}}$$

El factor definido como el incremento en 0,001 unidades de absorbancia es relativo al ensayo específico utilizado en las condiciones descritas (concentración final de 0,0216 mM de SGZ en un volumen de 3 mL, en cubeta con paso óptico de 1 cm) midiendo el incremento de absorbancia de la SGZ oxidada en el tiempo, (aparición del producto tetra-metoxi-azo-bis-metilenquinona) al inicio de la reacción (Lante *et al.*, 2000; Bains *et al.*, 2003).

El término 0,001 unidades de absorbancia se asocia a la generación de 0,015 nmoles/mL de tetra-metoxi-azo-bis-metilenquinona según la ecuación de Lambert-Beer considerando el coeficiente de extinción $\epsilon=65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bauer *et al.*, 1971; Basheer *et al.*, 2018):

$$A = \epsilon \times l \times C$$

$$C = \frac{\Delta A (0,001)}{\epsilon (65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm}}$$

$$C = 0,000015 \text{ mM}$$

$$C = 0,000015 \text{ } \mu\text{moles/mL}$$

$$C = 0,015 \text{ nmoles/mL}$$

El ensayo enzimático es realizado en 3 ml, por lo tanto, el término 0,001 en esta definición de unidad está asociado a la producción de 0,045 nanomoles por minuto. Cabe destacar que los resultados obtenidos utilizando esta definición no estándar de unidad enzimática lacasa, solo son comparables con mediciones realizadas utilizando el mismo ensayo en las condiciones descritas y con la misma definición de unidad.

A partir de los datos crudos del cambio de absorbancia en el tiempo en el intervalo lineal de la curva de progreso de la reacción, se seleccionaron los datos obtenidos para nuestra enzima: para una velocidad inicial de $\Delta A/\Delta t = 0,186/\text{min}$ utilizando 5 μl (0,005 mL) de extracto enzimático con un factor de dilución de 100, el cálculo de actividad volumétrica para la definición de unidad como la cantidad de enzima que incrementa la absorbancia a 530 nm en 0,001 unidades de absorbancia por minuto, en las condiciones ensayadas (3 mL) sería.

$$\frac{U}{mL} = \frac{((Abs_{530nm}/ \text{min ensayo}) - (Abs_{530nm}/ \text{min blanco})) \times FD}{0,001 \times \text{Volumen enzima}}$$

$$\frac{U}{mL} = \frac{0,186 \times 100}{0,001 \times 0,005 \text{ mL}} = 3.720.000 \text{ unidades/ min} \times mL$$

$$\text{Actividad volumétrica} = 3.720.000 \frac{U}{mL}$$

Para una concentración de 7,06 mg/mL, se tendría una actividad específica de:

$$\frac{U}{mg} = \frac{3.720.000 \text{ unidades}}{\text{min} \times mL \times 7,06 \text{ mg/mL}} = 526.912 \text{ unidades/ min} \times mg$$

$$\text{Actividad específica} = 526.912 \frac{U}{mg}$$

A partir de los mismos datos crudos del cambio de absorbancia en el tiempo en el rango lineal de la curva de progreso de la reacción, se podría recalcular la velocidad inicial en base a la definición de unidades internacionales, considerando la utilización del coeficiente de extinción molar más cercano a las condiciones del ensayo enzimático (o determinado empíricamente) ($\epsilon=65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 55°C).

Definiendo unidad como la cantidad de enzima que cataliza la reacción de $1 \mu\text{mol}$ de sustrato por min sería, usando el coeficiente de extinción a 530 nm del producto tetra-metoxi-azo-bis-metilenquinona $\epsilon=65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, volumen total de ensayo de 3 mL (0,003 L) en cubeta con paso óptico de 1 cm y utilizando $5 \mu\text{L}$

(0,005 mL) de enzima, con un factor de dilución de 100, el cálculo para la actividad volumétrica sería:

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta A \times V_{total} \times FD}{\Delta t \times \epsilon \times l \times V_{enzima}}$$

$$\frac{U}{mL} = \frac{0,186 \times 0,003 L \times 100}{1 \text{ min} \times 64000 M^{-1}cm^{-1} \times 1 \text{ cm} \times 0,005 mL} = 174 \mu\text{moles}/\text{min} \times mL$$

$$\text{Actividad volumétrica} = 174 \frac{U}{mL}$$

Y la expresión de actividad específica:

$$\frac{U}{mg} = \frac{174 \mu\text{moles}}{\text{min} \times mL \times 7,06 \text{ mg}/mL} = 25 \mu\text{moles}/\text{min} \times mg$$

$$\text{Actividad específica} = 25 \frac{U}{mg}$$

Es importante considerar que la comparación de los valores de actividad catalítica entre enzimas tiene limitaciones, no solo en cuanto a las distintas definiciones de unidad de actividad enzimática utilizada, si no, también a las diferencias metodológicas implementadas por los distintos grupos de investigación, por lo que las comparaciones deben ser realizadas utilizando la misma definición de unidad y bajo las mismas condiciones experimentales.