



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

OPTIMIZACIÓN DE EXTRACCIÓN DE PROTEASAS A PARTIR DE UN EFLUENTE DE ALTO IMPACTO AMBIENTAL

Mariana Folmer¹

¹Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC-UNL-CONICET), Güemes 3450, Santa Fe, 3000, Argentina.

Directora: Eugenia Lovato, Codirector: Ricardo Manzo

Área temática: Ciencias biológicas

Palabras clave: enzimología, remediación, lixiviados

INTRODUCCIÓN

Los lixiviados de relleno sanitario son efluentes acuosos originados tanto en la fermentación como en la infiltración de agua de los residuos dispuestos en vertederos urbanos. Usualmente se encuentran altamente contaminados con hidrocarburos halogenados, compuestos orgánicos, sales inorgánicas, gases tóxicos, sales inorgánicas y una gran cantidad de metales pesados que conllevan una gran amenaza a la salud pública y ambiental. (Babaei 2021). Particularmente, los lixiviados del relleno sanitario de Santa Fe poseen un bajo pH, alta salinidad, alta conductividad y alta concentración de sustancias húmicas y metales pesados (resultados propios no publicados).

Cuando matrices complejas como los suelos se contaminan, son perturbadas de forma irreversible debido a la adaptación de la microbiota a la presencia de esos compuestos recalcitrantes, evidente por la reducción de ciertos géneros de microorganismos y la adaptación de otros asociados con la tolerancia ambiental extrema y a la posibilidad de neutralizar, inhibir o metabolizar estos contaminantes. Las enzimas microbianas juegan un rol preponderante en el mantenimiento o retorno a la salud de suelos contaminados, por lo que caracterizar a las enzimas y sus fuentes se vuelve un rol fundamental de la ciencia en la restauración ambiental (Kumar, Sharma 2019). Debido a la gran dificultad en el aislamiento y cultivo de ambientes extremos, se vuelve esencial desarrollar herramientas como el análisis enzimático y la metaproteómica para su diagnóstico y tratamiento.

Entre las enzimas más importantes para la degradación de contaminantes se encuentran las proteasas, que son un diverso grupo de hidrolasas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas para producir péptidos y/o aminoácidos libres y juegan un papel importante en la fijación de nitrógeno en el suelo (Greenfield 2021).

TÍTULO DEL PROYECTO: "Evaluación de estrategias biológicas de remediación para el tratamiento y disposición de contaminantes persistentes presentes en lodos activados del relleno sanitario de la ciudad de Santa Fe

INSTRUMENTO: Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica PICT-2020-SERIEA-I-GRF-

AÑO DE CONVOCATORIA: 2020

ORGANISMO FINANCIADOR: UNL

DIRECTOR: Ricardo M. Manzo



Son principalmente extracelulares y pueden permanecer activas durante largos períodos de tiempo por estar protegidas contra la degradación al interactuar con otras partículas reactivas o a través de su atrapamiento en moléculas húmicas. Por esta razón, se elige en el presente trabajo comenzar el desarrollo de perfiles enzimáticos de lodos del relleno sanitario con la medición de la actividad proteasa. Debido a la falta de estudios relacionados con la extracción de proteínas y la medición de actividades enzimáticas en lixiviados, validamos varios métodos de extracción de proteínas previamente empleados en diferentes estudios de suelo y los adaptamos para muestras de lixiviados.

OBJETIVOS

- Obtener extractos proteicos que conserven su actividad enzimática a partir de un efluente complejo.
- Desarrollar técnicas analíticas que permitan identificar y cuantificar actividades enzimáticas de interés en los extractos para aplicaciones en biorremediación.

METODOLOGÍA

Extracción proteica. Se analizaron múltiples protocolos de extracción de proteínas entre los cuales se destacaron los propuestos por Masciandaro (2007), Chen (2009), Kondratiuk (2015), Margenota (2018), a partir de los cuales se diseñaron nuevos protocolos con variabilidad en diferentes parámetros.

Los procedimientos consistieron en agregar el buffer de extracción seleccionado (A) a una cantidad definida de lodo para alcanzar una dilución (B), seguido de agitación magnética durante 60 minutos a 25°C. Algunas de las muestras fueron sometidas a sonicación utilizando un sonicador de sonda continua (C). Luego, las muestras se centrifugaron a 10000xg durante 10 minutos a 4°C y se filtraron mediante una membrana de 0,45 μm (D). Las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio (E), y se centrifugaron para recuperar las proteínas precipitadas, las cuales se disolvieron y desalaron posteriormente con una columna de exclusión molecular PD-10 Sephadex G-25 (F).

Se probaron las siguientes condiciones y buffers: Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) 50 mM pH 8,1; pirofosfato de sodio pH 7 100 mM; TRIS 50 mM con 7 mg mL⁻¹ de Tritón X-100 y [con y sin la adición de 1:4 de 1M CaCl₂, 14 mg mL⁻¹ de albúmina sérica bovina (BSA) o 5 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)]. Los dos últimos tampones también se probaron con la adición de 10% m/m de polivinilpirrolidona (PVPP). Se probaron condiciones en presencia y ausencia de sonicación, precipitación y/o desalinización. Después de la desalinización, se llevó a cabo un cambio de tampón a un buffer de fosfato sódico pH 7 25 mM.

Luego de la obtención de los diferentes extractos, se sometieron a pruebas para la cuantificación de proteínas y la actividad de las proteasas, como se resume a continuación:

Cuantificación de proteínas. Con el objetivo de determinar cuál es la actividad específica del lodo se debe encontrar una técnica que permita determinar la cantidad de proteína soluble presente en la misma, para lo que se utiliza el método de Bradford (1976) modificado: 100 μL de muestra se hacen reaccionar con 2,5 mL de reactivo de Bradford y se realiza una medición de la absorbancia a 595 nm. Se realiza una curva de calibrado con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) en agua destilada de concentración 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Actividad de enzima proteasa. En primer lugar, se realiza una reacción enzimática adaptada de propuestas de Landi (2011) en tubos eppendorf de 2 mL, haciendo reaccionar 500 μL de muestra con 500 μL de caseína 2% m/v (preparada en buffer TRIS 50 mM y llevada a pH 8,1



por 25 minutos a 40°C. La reacción se corta con 500 μL de una solución stopper ácido tricloro acético (TCA) 0,92M por 10 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifuga a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C para precipitar excedentes de caseína y otros compuestos. Se mide luego la L- Tirosina (L-Tyr) liberada a partir de la caseína en la digestión enzimática con la reacción colorimétrica de FC (Waterborg 2002) según el protocolo adaptado de Aspevik (2015) por espectrofotometría a 760nm. Para la cuantificación se realiza una curva de calibrado propia de L-Tyr a la cual se realiza el mismo tratamiento que a las muestras.

Por último, a modo de efectuar controles positivos para evidenciar si la actividad proteasa era relevante en otras matrices complejas de alta actividad biológica, se realizó uno de los protocolos de extracción proteico con mejores resultados en tres muestras: un compost de marca comercial avejentado (huertero), un suelo fitorremediado y posteriormente esterilizado (fitorrem 1) y un compost de alta actividad recién producido (compost 1).

RESULTADOS

Se produjeron y midieron más de cuarenta extractos, de los cuales cuatro mostraron una actividad considerable de proteasa y una mayor extracción de proteínas. Los datos de los extractos se enumeran a continuación (Tabla 1):

Tabla 1. Datos de cuantificación proteica y actividad enzimática de los extractos más relevantes

	Buffer de Extracción	μg proteína/g lodo	μg Tyr/g lodo	μg Tyr/ μg proteína
E.19	Tris T100X	142 +/- 8,8	38.8 +/- 58,8	0,273239437
E. 24	Tris T100X EDTA PVPP	69 +/- 13,1	54.4 +/- 75,6	0,788405797
E. 28	Tris T100X	729 +/- 3	239.9 +/- 6,2	0,329080933
E. 29	Tris T100X EDTA	596 +/- 11,2	151.41 +/- 84,5	0,254043624

Los extractos seleccionados parecen alcanzar una sensibilidad aceptable para estimar la actividad de las proteasas de esta muestra de lodo dada. A continuación (Tabla 2), se muestran los resultados para los suelos provenientes de diferentes fuentes que fueron analizados con el mismo protocolo de extracción que el extracto 19 (E. 19).

Tabla 2. Datos de cuantificación proteica y actividad enzimática de suelos alternativos.

	Buffer de Extracción	μg proteína/g muestra	μg Tyr/g muestra	μg Tyr/ μg proteína
Huertero	Tris T100X	80,5 +/- 4,7	0	0
Fitorrem 1	Tris T100X	21,3 +/- 0	0	0
Compost 1	Tris T100X	3620 +/- 90	1999,2 +/- 46,6	0,55

Se puede observar que el suelo más nuevo y no esterilizado, en el que se esperaba mayor actividad biológica, se evidencia una extracción proteica y actividad proteasa mayor.



CONCLUSIONES

La obtención de un protocolo efectivo para la extracción de enzimas proteasas podría ser el inicio de un análisis que nos lleve a la caracterización tanto de lixiviados como de múltiples lodos biorremediados disponibles en nuestro laboratorio, con el fin de diseñar una base de datos que nos permita relacionar perfiles enzimáticos con diferentes estados del tratamiento de descontaminación de un suelo. Para lograr lo mencionado, esperamos poder adaptar los mejores protocolos para la extracción de otras enzimas responsables de la degradación de compuestos recalcitrantes tales como lacasas, oxidasa, deshidrogenasas, etc. Por otro lado, se pudo evidenciar que suelos con alta actividad biológica presentan alta cantidad de proteínas y alta actividad proteasa. Poder conocer la estructura enzimática de este lixiviado de relleno sanitario podría permitir estimularlo adecuadamente y realizar un ensayo potencial de remediación enzimática. Por último, se considera que el análisis enzimático del lodo podría llevar a la caracterización u obtención de enzimas novedosas y altamente resistentes a condiciones extremas de interés ambiental o industrial.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Aitken A.** (2002). Protein Determination by UV Absorption. Walker, J. The Handbook of proteins. © 2002 Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, USA.
- Aspevik, T.** (2016). A Systematic Approach to the Comparison of Cost Efficiency of Endopeptidases for the Hydrolysis of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) By-Products. Food Technology and Biotechnology.
- Babaei, S.** (2021). Combined landfill leachate treatment methods: an overview. Environ Sci Pollut Res Int Nov;28(42):59594-59607.
- 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.
- Chen, S.** (2009). Improving soil protein extraction for metaproteome analysis and glomalin-related soil protein detection. Proteomics.
- Gessesse, A.** et al (2003). Lipase and protease extraction from activated sludge. Water Research.
- Greenfield, L. M.** et al (2021) Synthesis of methods used to assess soil protease activity. Soil Biology and Biochemistry.
- Kondratiuk, A. S.,** et al. (2015) Optimization of protein extraction for Lichen Thalli. Mycobiology.
- Kumar, A. Sharma, S.** (2019) Microbes and Enzymes in Soil Health and Bioremediation. Microbes for sustainability Vol. 16. Springer Nature Singapore Pte Ltd.
- Landi, L.** (2011). Activities of proteolytic enzymes. Dick R.P., Methods of Soil Enzymology. (pp. 247-257). Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Margenota, A. J.** et al. (2018) Methodological recommendations for optimizing assays of enzyme activities in soil samples.
- Masciandaro G.** et al (2007). Comparison of extraction methods for recovery of extracellular β -glucosidase in two different forest soils. Soil Biology & Biochemistry.
- Waterborg, H.** (2002). The Lowry Method for Protein Quantitation. Walker, J. The Handbook of proteins. © 2002 Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, USA

