

## **EXTRACCION, FRACCIONAMIENTO Y PURIFICACION EN CONDICIONES ÓPTIMAS DE ACTIVIDADES AMIDÁSICAS PRESENTES EN UN LODO INDUSTRIAL**

JUANA I. LÓPEZ FERNÁNDEZ; MILAGROS NAVARRO GONZÁLEZ y SALVADOR GONZÁLEZ CARCEDO

Área de Edafología y Química Agrícola. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos. Plza. Missael Bañuelos s/n 09001 Burgos.

**Resumen:** En este trabajo se estudia la solubilidad de tres enzimas amidohidrolíticas (ureasa, asparaginasa y glutaminasa) presentes en un lodo específico de depuradora industrial, así como su purificación mediante procesos de ultrafiltración tangencial y precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$ . Se consiguieron incrementos del 465.8% para la ureasa, del 769.3% para la asparaginasa y del 311.7% para la glutaminasa cuando se utilizaron procesos de ultrafiltración. Del fraccionamiento con  $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$  se deduce que las amidohidrolasas precipitan preferentemente cuando en el medio existe una concentración salina del orden del 60-80%.

## **INTRODUCCIÓN**

Numerosos microorganismos, especialmente *Rizobium* y otros fijadores de  $\text{N}_2$  propios del suelo se inhiben ante la adición de lodos de depuradora. Estos contienen una variada gama de componentes que son potencialmente tóxicos: sales solubles en niveles fitotóxicos, metales pesados y compuestos orgánicos sintéticos (Madariaga and Angele, 1992); sin embargo también contienen numerosos compuestos impulsores del desarrollo microbiano: micronutrientes inorgánicos, nutrientes orgánicos, factores de crecimiento (Bouldin et al, 1985; Pichtel and Hayes, 1990 y Epstein et al, 1976) sobre todo si la adición se realiza siguiendo las pautas de la normativa UE actual en vigor y mucho mejor con las nuevas normas en preparación. Junto a esta discrepancia en el comportamiento del *Rizobium* en suelos enmendados con lodos es adecuado recordar

que el proceso de fijación del  $N_2$  en cuanto a su eficacia viene limitado por la disponibilidad de N-mineralizado existente en el suelo.

En otro orden de actuación, se reconoce la riqueza de N-orgánico que poseen los lodos de depuradora y su posibilidad de mineralización, de tal forma que el límite establecido se determina por un parámetro derivado de su comportamiento en el suelo como es el control de potabilización de  $N-NO_3^-$  en las aguas potables (según la O.M.S.11,3  $mg\ l^{-1}$ ), Fried, 1991 prevee, que como consecuencia del conjunto de adiciones de compuestos nitrogenados de muy diversa naturaleza, el 20% de la población de Francia, el 5% de Alemania y el 8% de Holanda dispondrán únicamente de agua contaminada en  $N-NO_3^-$  en proporciones por encima del citado límite con consecuencias sanitarias y medio ambientales imprevisibles.

Según Spalding et al, 1993 una de estas fuentes conocida y evaluada ambientalmente son los  $N-NO_3^-$  presentes en el abonado inorgánico tanto en cultivos intensivos como extensivos.

Ronen and Margarite, 1985 evalúan la capacidad contaminante de los fitoprotectores nitrogenados utilizados.

Los propios cultivos de leguminosas producen lixiviados muy ricos en  $NO_3^-$ , (Burden, 1982); de la misma forma que pastizales irrigados y suelos dedicados a la horticultura, (Spalding and Exner, 1993). Incidiendo en este tema de focos de contaminación Spalding et al 1993 establecen que los residuos sólidos urbanos y los lodos de depuradora son capaces de generar niveles de contaminación nitrogenada por  $N-NO_3^-$  muy elevados. (Los suelos del entorno de las ciudades incrementan su contenido en  $N-NO_3^-$  un 10% de forma sistemática).

Toda adición de residuos orgánicos de ciudad tiene pues, la capacidad de aportar al suelo un N orgánico, cuya evolución bioquímica y posterior mineralización y oxidación reside en capacidades bioquímicas presentes tanto en el residuo como en el suelo receptor. La intensidad simultánea de estas actividades (del lodo y del suelo) condicionan la velocidad del proceso proteolítico y de lisis de ácidos nucleicos y simultáneamente la amoniólisis (liberación de  $N-NH_4^+$ ) condiciona a su vez tanto la fijación de  $N_2$  por *Rizobium*, como la nitrificación. Una preservación del medio ambiente natural, en lo que a aguas subterráneas y superficiales se refiere deberá de pasar obligatoriamente por el conocimiento de esas potencialidades bioquímicas de lodos y suelos en su caso de su regulación, tanto en los lodos de adición como en los suelos receptores. De esta forma el dilema inhibición del *Rizobium* quedará delimitado en su problemática respecto al N disponible.

## **OBJETIVOS**

En este trabajo se pretende conocer el potencial enzimático existente en lodos industriales, en el punto clave de la mineralización del N: la liberación de  $\text{N-NH}_4^+$  por amidasas.

Como objetivos generales se proponen los siguientes:

1. Conocer los niveles de actividad amidásica (ureasa, asparaginasa y glutaminasa) en los lodos industriales.
2. Evaluar las actividades enzimáticas amidihidrolíticas movilizables y retenidas por la matriz del lodo.
3. Desarrollar la posibilidad de purificación de estas amidasas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Lodos residuales**

Los lodos residuales utilizados en este experimento proceden de la fracción sólida que se separa en el tratamiento biológico de las aguas residuales de una empresa ubicada en Burgos dedicada a la síntesis de metionina con fines alimentarios en el sector ganadero (Rhône-Poulenc). Es un sólido pulverulento oscuro, de aspecto poroso y de gran dureza cuando se seca. En las [tablas 1 y 2](#) se presenta el contenido de metales pesados de estos lodos y sus características químicas.

### **Metodología de trabajo.**

#### *Preparación de la muestra.*

Una vez recogidos los lodos de los tanques de la depuradora se sometieron a una filtración a vacío con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua posible. Se extendieron sobre papel de filtro y se dejaron secar en habitación aireada a una temperatura de 20-25°C. Una vez secados a temperatura ambiente se pulverizaron en un molino de bolas (Pulversitte mod. 6 Fristch). Molturada la muestra, se congeló a -20°C, hasta su utilización.

En todas las pruebas realizadas se determinó según el método Guitián y Carballas, (1976) la humedad de la muestra con objeto de referir todos los resultados a unidad en peso de lodo seco.

#### *Método de extracción*

La extracción de fracción orgánica con actividad enzimática se aborda mediante los métodos de extracción de complejos húmicos-enzimáticos, revisados exhaustivamente por Jasdol (1985), siendo el pirofosfato (PP) y el fosfato, los extractantes más utilizados.

Para ello se toma una muestra de 10 g. de lodo, mezclados con 100 ml. de extractante ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , 0,1 M, pH 8), en un bote de centrífuga de 250 ml. Dicha mezcla se agita vibracionalmente (vibrador Selecta mod. vibromatic) a intensidad media (200 osc. min<sup>-1</sup>) durante 30 minutos. A continuación la muestra se centrifuga 30 min. a 9.000 g. (centrífuga Kubota 2.000 C, refrigerada a 4°C.).

#### *Purificación del extracto.*

La purificación del extracto se realizó mediante micro y ultrafiltración tangencial, siguiendo los esquemas establecidos en las [Figuras 1 y 2](#).

#### *Determinación de proteínas.*

Las proteínas fueron determinadas según el método descrito por Lowry y al. (1951)

#### *Determinación de la actividad Ureásica.*

La mayor parte de los métodos empleados en la determinación de la actividad ureásica incluyen el análisis cuantitativo del  $\text{N-NH}_4^+$  liberado en la reacción del lodo en solución tamponada y utilizando como sustrato la urea (Zantua y Bremner, 1975).

De todos los métodos presentes en la bibliografía optamos por la medida colorimétrica de la actividad ureásica propuesta por Hoffmann y Teicher (1961) y modificada por González Carcedo y Barriuso (1982).

#### *Determinación de la actividad Glutaminásica.*

Se basa en la determinación del ión amonio liberado, a partir de la glutamina, por la actividad glutaminásica del lodo. Se sigue el método de Galstyan y Saakyan, (1973) modificado por González Carcedo y García Melús ( )

#### *Determinación de la actividad asparaginásica.*

Para su determinación se utilizó el mismo método que en el caso de la actividad glutaminásica modificando exclusivamente la presencia y concentración del sustrato enzimático: asparragina.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de las amidohidrolasas.

Una vez establecido el extractante y las condiciones óptimas de extracción (López Fernández, 1993) para el conjunto de los tres enzimas (pirofosfato sódico, 0,1M y pH 8), se aplicaron a la extracción del lodo para establecer los balances de actividad. Los valores obtenidos en el lodo, extracto bruto y residuo ([Tabla 3](#)) nos permitió establecer porcentajes de eficacia de extracción por un lado y de retención por otro.

Destaca el nivel porcentual que adquiere la suma de extracto más residuo en cada una de las tres actividades amidohidrolásicas estudiadas, las cuales, aunque tengan distinta localización parecen comportarse de manera similar a estos efectos.

De entre las tres amidohidrolasas se sigue respetando el orden de eficacia hidrolítica que aparecía en el lodo inicial; el orden de eficacia que se establece es el siguiente:

Ureasa > Glutaminasa > Asparaginasa (3,7: 3: 1).

Esta relación de eficacia hidrolítica no se mantiene en el residuo de extracción, ya que ureasa y glutaminasa adquieren valores muy próximos de actividad (3,7: 3,5: 1). Ello nos hace pensar que la ureasa, si bien es el enzima más abundante también es el más móvil y posiblemente el más sensible a procesos de degradación proteolítica y/o desnaturalización.

Purificación.

El proceso de purificación se inicia aplicando la técnica de ultrafiltración tangencial ([Figura 1](#)) al objeto de poder fraccionar los compuestos orgánicos movilizados por el pirofosfato y simultáneamente acumular en la fracción de tamaño inferior a 10.000 Dalton al citado extractante y a moléculas de pequeño tamaño molecular que pudieran generar inhibición enzimática.

Para las actividades asparaginásica y glutaminásica ([figuras 3](#) y [4](#)) en el extracto se desarrolla un importante proceso de inhibición, posiblemente por exceso de producto, que limita el valor de la medida realizada ya que en ambos casos, la suma de las actividades encontradas en UF<sub>2</sub> y UF<sub>3</sub>. supera a la encontrada en el extracto. (Actividad glutaminásica: 112.8% y actividad asparaginásica: 160.3%).

Estos porcentajes se incrementan cuando el punto de referencia es el lodo, ya que la suma de ambas fracciones es para la glutaminasa 262,4% y para la asparaginasa 377,2%.

La actividad ureásica ([figura 5](#)) tal como se viene diciendo, es un enzima más lábil en este medio salino, y como consecuencia, las medidas obtenidas entre UF<sub>2</sub> y UF<sub>3</sub> no

alcanzan la actividad inicial del extracto, perdiéndose en el proceso de ultrafiltración tangencial el 9,74%. Sin embargo, hay que resaltar que el tamaño molecular predominante se encuentra entre 10.000 Dalton y 0,45  $\mu\text{m}$  ( $\text{UF}_2$ ).

En todos los casos hay que señalar que se ha realizado una auténtica purificación, de lo cual es reflejo el incremento de la actividad específica que se resume en la [tabla 4](#), sobre todo en la fracción de menor tamaño molecular típicamente exocelular (ureasa y glutaminasa) y en la fracción  $\text{UF}_3$  para los enzimas de membranas (asparaginasa).

Un segundo paso de purificación se desarrolló volviendo a realizar el proceso de ultrafiltración completo sobre la fracción  $\text{UF}_2$ , ([figura 6](#)) una vez comprobado que es allí donde se encuentran retenidos los mayores niveles de cada actividad.

Se señala que este paso se dio transcurridos siete días, a la espera de que, durante ese tiempo, las fracciones guardadas en frigorífico han podido sufrir procesos de hidrólisis parcial y reagrupamiento molecular sólo esto puede justificar el hecho de que aparezcan actividades enzimáticas en todas las subfracciones conseguidas.

Este nuevo paso de ultrafiltración nos muestra la intensidad con que aún en extractos ultrafiltrados se encuentra inhibida la actividad enzimática ([tabla 5](#)), pues de la suma total de las nuevas subfracciones se consiguen incrementos que suponen el 465,8% para la ureásica, el 769,3% para la asparaginásica y el 311,7% para la glutaminásica.

En todos los casos la fracción donde se acumula fundamentalmente la actividad enzimática es la fracción  $\text{UF}_{22}$  lo cual indica que las amido-hidrolasas procedentes de este lodo, tienen un tamaño molecular, entre 10.000 y 30.000 Dalton, sin olvidar que las fracciones concomitantes  $\text{UF}_{21}$  y  $\text{UF}_{23}$  tienen valores que se aproximan y superan a la actividad medida inicialmente en el lodo.

Comprobando si este nuevo paso por ultrafiltración nos ha generado también un incremento de los valores en la actividad específica ([tabla 6](#)) nos encontramos en primer lugar con que respecto a la [tabla 3](#), se han elevado sustancialmente los valores de actividad específica que ya obteníamos en el ultrafiltrado  $\text{UF}_2$ .

Sin embargo no es coincidente el hecho de la purificación con el de la acumulación de actividad enzimática salvo, para la actividad ureásica y la actividad glutaminásica, enzimas de los cuales ya hemos indicado su carácter exocelular.

Un tercer paso de purificación selectiva se aplicó sobre la fracción más rica en actividad enzimática, la  $\text{UF}_{22}$  tamaño molecular entre 100.000-30.000 Dalton con el fin de separar por precipitación fraccionada la materia orgánica extraída que no presenta actividad enzimática.

Las tres amidohidrolasas presentan un punto de acumulación cuando en el medio existe una concentración de sulfato amónico del 60% que se acompaña con cantidades muy

elevadas de actividad en el 70 y 80%. Por debajo de esta concentración de sulfato amónico, si bien hay niveles de actividades enzimáticas significativas se reducen considerablemente éstos.

Si representamos las actividades específicas ([figura 7](#)), nos encontramos un comportamiento paralelo de purificación con máximos de actividad específica acumulada entre el 60 y 80% de sulfato amónico.

A pesar de los bajos niveles de actividad específica que adquiere la actividad asparaginásica se ha multiplicado por 81,4 veces la pureza de este enzima, si lo comparamos con la actividad específica encontrada en el extracto, seguida de la actividad glutaminásica que incrementa el valor de actividad específica en 70 veces y la ureásica 40 veces.

## CONCLUSIONES

Como conclusiones globales de todo el estudio de extracción y purificación sobre un lodo de depuradora industrial específico, podemos realizar las siguientes:

- 1.- Una vez efectuada la extracción la materia orgánica residual (residuo) retiene entre el 57 y el 37% de las actividades enzimáticas evaluadas (ureásica, glutaminásica y asparaginásica) directamente en el lodo, incrementándose notoriamente los niveles de actividad en el extracto 234,8%.
- 2.- Realizada una primera ultrafiltración aparece, como norma general, una acumulación de la actividad enzimática en la fracción cuyo tamaño molecular medio entre 10.000 Dalton y 0,45  $\mu$ .
- 3.- Realizado un segundo paso de purificación en base a repetir el proceso de ultrafiltración sobre la fracción UF<sub>2</sub>, podemos puntualizar que las amidohidrolasas manifiestan tener un tamaño molecular entre 100.000 y 30.000 Dalton (UF<sub>22</sub>).
- 4.- El fraccionamiento con sulfato amónico nos muestra que las tres amidohidrolasas precipitan preferencialmente entre el 60 y el 80% de concentración de sulfato amónico, hecho ya detectado para otros enzimas en lodos de depuradora urbana.
- 5.- El seguimiento del proceso de purificación tiene como referencia los valores que adquieren las actividades específicas, nos permite afirmar que gracias a este proceso se puede conseguir purificar la asparaginasa 80 veces, la glutaminasa 70 veces y la ureasa 40 veces.

6.- Este trabajo permite un cierto optimismo a la hora de obtener amidohidrolasas, de gran interés en edafología y biogeoquímica.

## REFERENCIAS

Galstyan, a. Sh. and Saakyan, E. G. (1973). Determining the Activity of Soil Glutaminase. *Soviet Soil* 5(3)335-337.

González, S. y Barriuso, E. (1982). Problemas de adaptación de la técnica de Hoffmann and Tiecher a la determinación de microtrazas de A. U. en suelos.

Hoffmann, G. and Teicher, K. (1961). Colorimetric determination of urease activity in soils. *Z. Pflanz Düng Bodenk.* 95:55-63.

López Fernández, J. I. (1993). Amidohidrolasas y proteasas presentes en un lodo depuradora industrial: Extracción y purificación. Tesis de Licenciatura. Facultad de C. Químicas. Universidad de Valladolid.

Lowry, O. H. and al (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Biochemistry.* 193:265-275.

Portal Diez, M. E. (1987). Génesis, evolución enzimática y potencial agrícola de un lodo industrial específico. Tesis Doctoral. Facultad C. Químicas. Universidad de Valladolid.

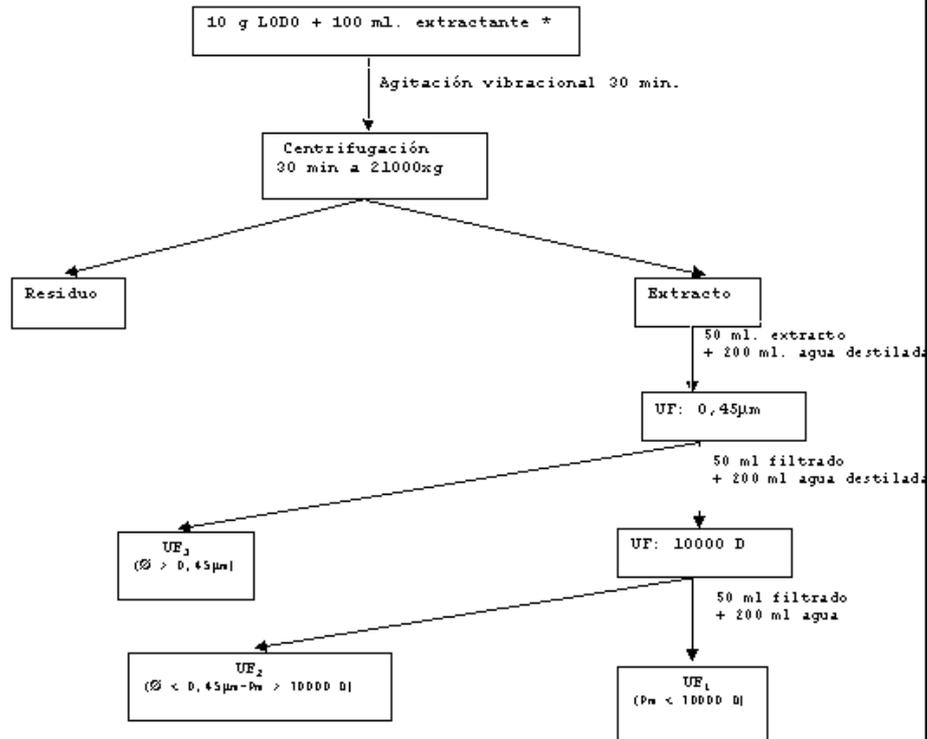
Spalding, R. F. and Exner, M. E. (1993). Occurrence of nitrate in ground water: A Review. *J. Environ Qual.* 22:392-402.

Spalding, R. F. and al (1993). Effect of sludge disposal on ground water nitrate concentrations. *J. Hydrol* 142:213-228.

Zantua, M. I. and Bremner, J. M. (1975). Preservation of soil Samples for assay of urease activity soil biol. *Biochem.* 7:297-299.

## Tablas y Figuras.

Figura 1. Esquema de extracción y purificación de fracciones con actividad enzimática (Fraccionamiento 1)



\* Extractante  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , 0.1 M pH 8

Figura 2. Esquema de extracción y purificación de fracciones con actividad enzimática (Fraccionamiento 2)

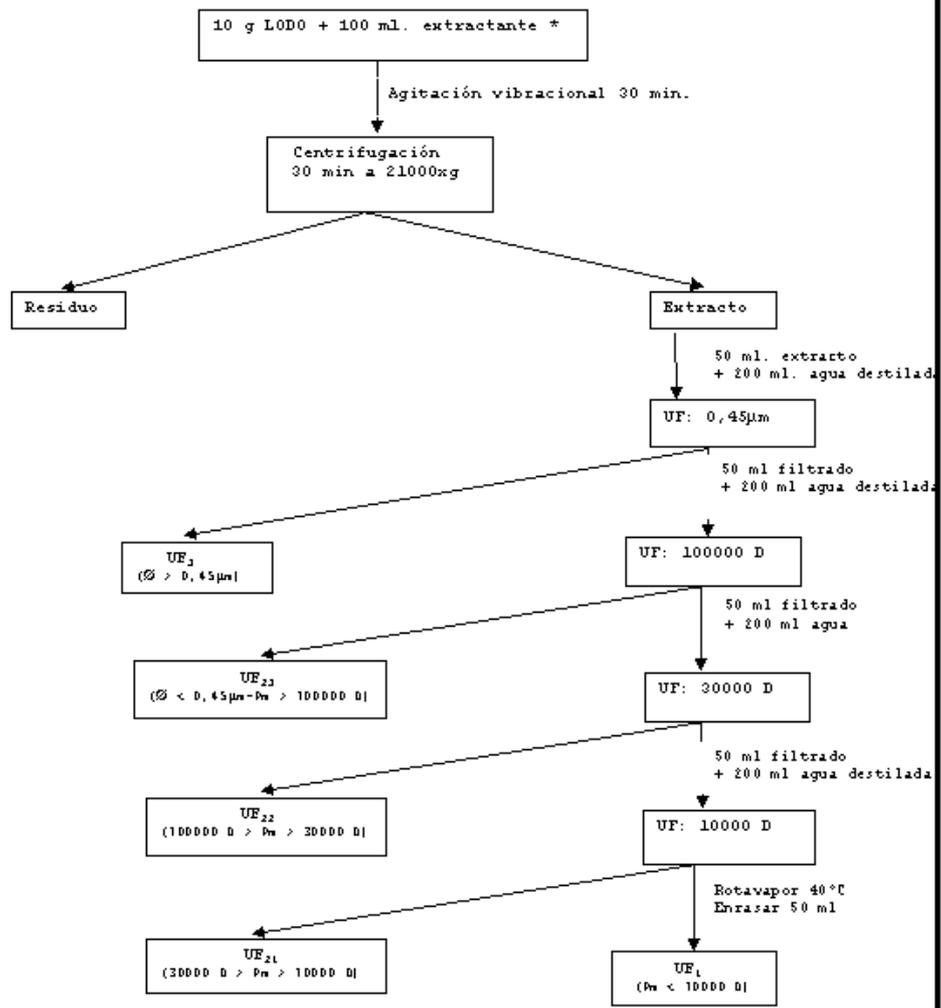


Figura 3. Porcentaje de Actividad Asparaginásica tras el proceso de purificación.

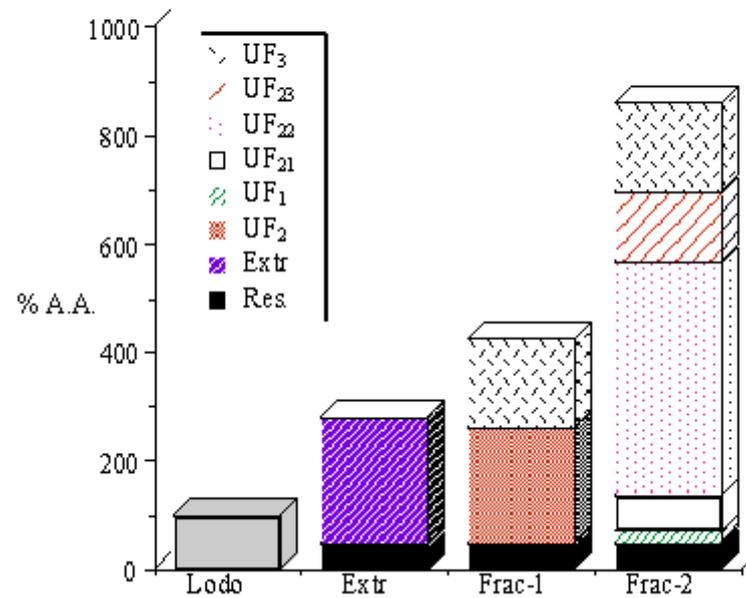


Figura 4. Porcentaje de Actividad Glutaminásica tras el proceso de purificación.

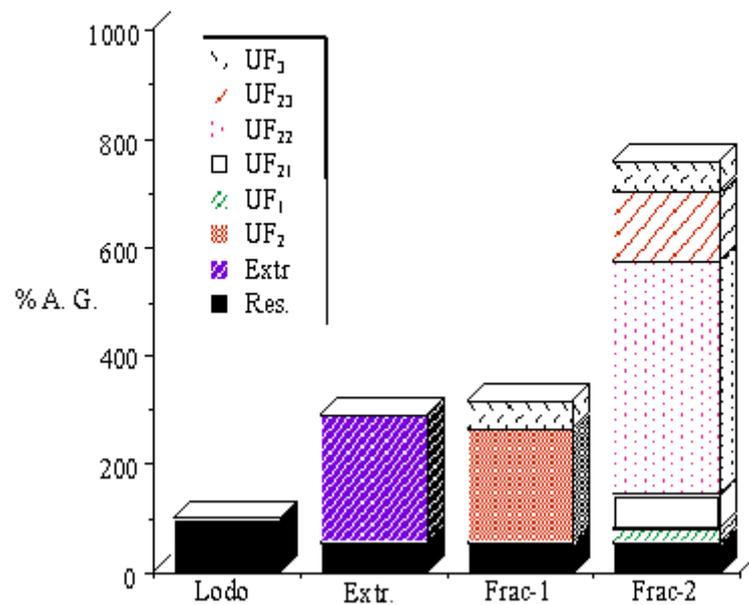


Figura 5. Porcentaje de Actividad Ureásica tras el proceso de purificación.

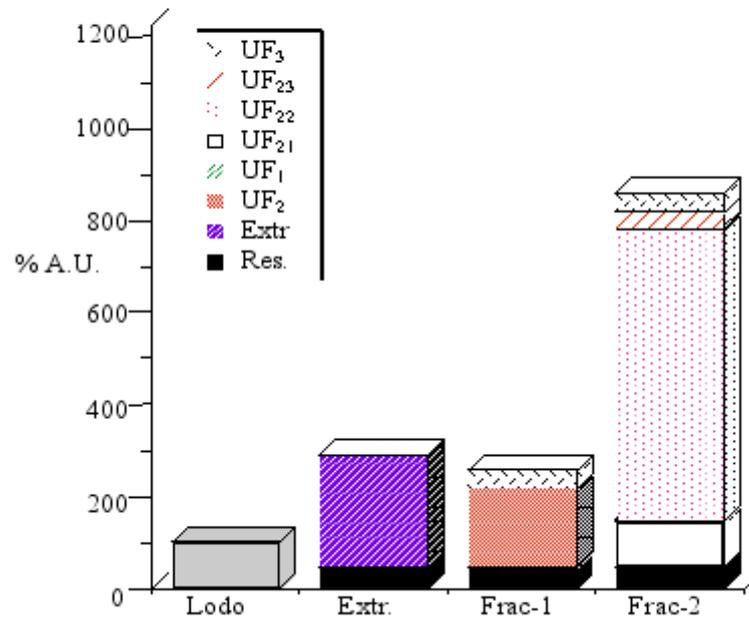


Figura 6. Porcentaje de Actividad Enzimática obtenida tras el proceso de purificación con Sulfato amónico.

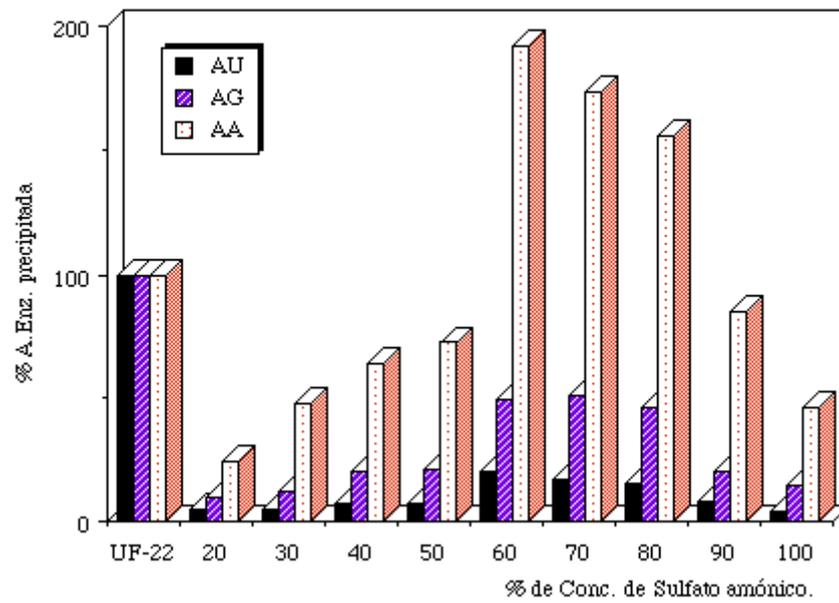


Figura 7. Actividades Enzimáticas Específicas obtenidas tras el proceso de purificación con Sulfato amónico.

