

# Universidad Miguel Hernández

Facultad de Ciencias Experimentales  
Grado en Biotecnología (2012-2016)

## Instituto de Biología Molecular y Celular

Trabajo Fin de Grado

---

# *Construcción y optimización de soportes bioactivos sostenibles para la degradación de colorantes*

---

María Dolores Sarmiento Ferrández

Dirigido por: Jesús Miguel Sanz Morales

Enma Roig Molina

Beatriz Maestro García-Donas

Elche, 24 de Junio de 2016

# Índice

1. Introducción .....	1
1.1 Problemática de la industria textil. ....	1
1.2 Colorantes empleados en la industria textil. ....	2
1.3 Lacasas.....	3
1.3.1 Origen y función.....	3
1.3.2 Composición.....	4
1.3.3 Mecanismo de catálisis .....	4
1.3.4 Lacasa CueO de <i>Escherichia coli</i> .....	5
1.4 Inmovilización enzimática .....	6
1.4.1 Bioplásticos. Soportes naturales para la inmovilización proteica.....	6
2. Antecedentes y objetivos.....	9
2.1 Antecedentes .....	9
2.2 Objetivos .....	9
3. Materiales y métodos .....	10
3.1 Cepas bacterianas y plásmidos .....	10
3.2 Medios, condiciones de cultivo y de conservación.....	10
3.3 Expresión y purificación de la proteína recombinante BioF-CueO .....	10
3.4 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida .....	11
3.5 Valoración de la concentración de proteína pura.....	11
3.6 Valoración de proteína total en el extracto. ....	11
3.7 Hidratación del soporte (PHB) e inmovilización de la proteína recombinante empleando etiquetas de afinidad BioF-CueO .....	12
3.8 Colorantes empleados en los ensayos de degradación .....	12
3.9 Reactivos utilizados en las industrias textiles .....	13
4. Resultados .....	14
4.1 Efecto de distintas temperatura sobre BioF-CueO inmovilizada en PHB.....	14
4.2 Reciclaje del soporte con BioF-CueO inmovilizada, a distintas temperaturas para los colorantes negro reactivos 5 (RB5) e índigo carmín (IC).....	15
4.3 Efecto de distintos compuestos utilizados en las industrias textiles sobre la actividad degradativa de BioF-CueO.....	17
4.4 Uso de un extracto bacteriano de <i>E. coli</i> que sobreexpresa BioF-CueO (sin purificar) para la degradación de los colorante negro reactivo 5 (RB5) e índigo carmín (IC).....	18

4.4.1 Evaluación de la degradación de los colorantes RB5 e IC a distintas concentraciones de BioF-CueO sin purificar. ....	18
4.4.2 Degradación de RB5 mediante la utilización de diferentes extractos. ....	19
5. Discusión .....	21
5.1 Efecto del colorante a distintas temperaturas.....	21
5.2 Efecto del cobre sobre la degradación de RB5 e IC con la utilización de la enzima BioF-CueO purificada. ....	21
5.3 Reciclaje del soporte con la enzima BioF-CueO purificada .....	21
5.4 Efecto de distintos compuestos sobre BioF-CueO .....	22
5.5 Evaluación de la degradación del colorante RB5 e IC a distintas concentraciones de BioF-CueO sin purificar.....	22
6. Conclusión y perspectiva futura.....	23
6.1 Conclusiones.....	23
6.2 Perspectivas futuras .....	23
7. Bibliografía .....	24



## Resumen

La construcción de soportes bioactivos, capaces de degradar colorantes empleados en la industria textil, supone una estrategia prometedora para la eliminación de estos compuestos de las aguas residuales producidas tras el proceso de teñido, consiguiendo disminuir su efecto perjudicial en el medio ambiente. En este trabajo hemos evaluado un soporte como es el PHB (polihidroxibutirato), polímero biodegradable y amistoso con el medio ambiente. Sobre el PHB se ha inmovilizado la enzima CueO, de *Escherichia coli*, mediante un tag de afinidad denominado BioF, que permite su unión al soporte. La enzima BioF-CueO inmovilizada es capaz de degradar colorantes de forma óptima en varias condiciones de pH y temperatura. Con el fin de asegurar que la enzima degrada de manera óptima se ensaya, en el presente trabajo, el efecto sobre la actividad de varios componentes ( $\text{CuSO}_4$ , ácido acético, etc.), además de qué rango de temperaturas se puede trabajar con la enzima inmovilizada y si se puede utilizar un extracto bacteriano que sobreexpresa BioF-CueO en lugar de la enzima purificada, para de esta forma, conseguir disminuir costes a la industria. Además, se prueba si la actividad de la enzima inmovilizada se ve disminuida tras varios usos.

**Palabras clave:** PHB (polihidroxibutirato), proteína BioF-CueO, inmovilización, degradación, colorantes textiles.

## Abstract

Bioactive building supports, capable of degrading dyes used in the textile industry, is a promising strategy for the elimination of these compounds in the wastewater produced after the dyeing process, achieving the reduction of its detrimental effect on the environment. In this work we have tested as a support a biodegradable polymer called PHB (polyhydroxybutyrate), on which the CueO enzyme, *Escherichia coli*, was immobilized through an affinity tag called BioF, allowing its attachment to the support. The BioF-CueO immobilized enzyme is able to degrade dyes in a variety of pH and temperature conditions. In order to ensure that the enzyme degrades optimally this work tests, the effect of several components ( $\text{CuSO}_4$ , acetic acid, etc.) on the enzyme activity, as well as, at what temperature range the immobilized enzyme can work and if a bacterial extract overexpressing BioF-CueO could be used instead of the purified enzyme, to achieve, in this way, lower costs to industry. Furthermore, it was tested whether the activity of the immobilized enzyme could be decreased after several uses.

**Keywords:** PHB (polyhydroxybutyrate), protein BioF-CueO, immobilization, degradation, textile dyes.

# 1. Introducción

## 1.1 Problemática de la industria textil.

Las industrias textiles utilizan una amplia variedad de productos químicos tóxicos, con baja capacidad de autodegradación. Grandes volúmenes de efluentes son vertidos como residuos contaminando las aguas. Los efluentes industriales contienen diferentes tipos de colorantes. La presencia de colorantes y otros compuestos tóxicos en las aguas residuales implica un grave problema medioambiental y de salud pública (Cortazar y cols., 2012; Verma y cols., 2012; Honorio y cols. 2016).

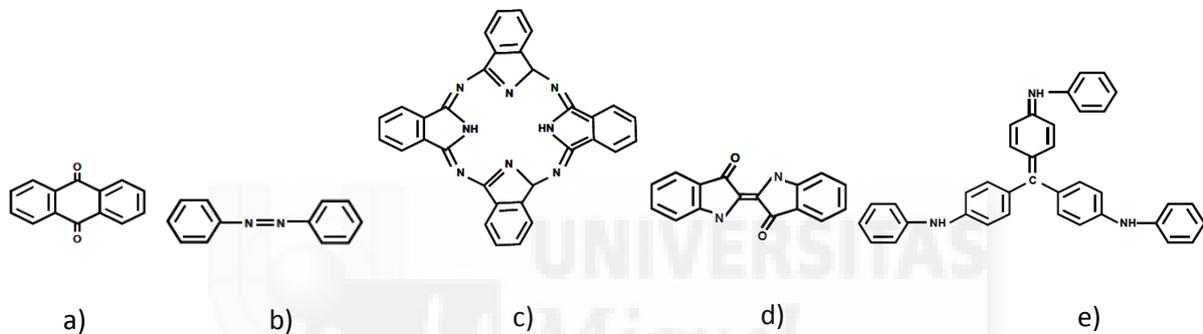
La liberación de efluentes, que contienen colorantes, al medio ambiente causa problemas en lagos, aguas subterráneas y ríos, perturbando el ecosistema de las aguas receptoras, debido no sólo al color y turbidez que deja en las aguas sino también a los efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos, producidos principalmente por los colorantes del tipo azo (Foo y cols., 2010). Por tanto, estos compuestos han demostrado ser tóxicos para los organismos acuáticos (plantas, microorganismos, peces y mamíferos), debido a la disminución del oxígeno disuelto y reducción del paso de luz que impide que realicen la fotosíntesis (Ustun y cols., 2007; Verma y cols., 2012; Zaharia y cols., 2012).

Debido a la complejidad de la composición de estas aguas, es necesaria la utilización de distintas estrategias para lograr la eliminación del contaminante. En la industria textil se consumen grandes volúmenes de agua en sus procesos, por lo que es importante la búsqueda de tecnologías que permitan el reciclaje del agua o bien que pueda ser vertida sin causar ningún efecto ambiental. Este tipo de colorantes no pueden eliminarse fácilmente con los métodos físico-químicos convencionales (absorción, filtración y coagulación) ya que son costosos y requieren gran cantidad de energía,- llegando incluso a generar subproductos nocivos (Cortazar y cols., 2012). Para la biorremediación de aguas contaminadas con colorantes se han utilizado organismos aislados, consorcios microbianos o enzimas aisladas de estos sistemas biológicos (Kandelbauer y cols., 2005) capaces de degradar compuestos recalcitrantes como son los colorantes, los cuales son estables a la luz, la temperatura, a la acción microbiana y a los detergentes.

En definitiva, las enzimas son consideradas muy adecuadas para el tratamiento de aguas residuales provenientes de las industrias textiles debido a su biocompatibilidad, el sencillo control de los procesos y la eficacia para decolorar (Alcalde y cols., 2008; Majeau y cols., 2010).

## 1.2 Colorantes empleados en la industria textil.

Los colorantes están formados por un grupo de átomos responsables del color (cromóforos), además de presentar grupos ionizables capaces de modificar la intensidad del color denominados auxocromos. Los cromóforos más habituales son los grupos vinilo (-C=C-), nitro (-NO<sub>2</sub>), carbonilo (-C=O-), azo (-N=N-) y estructuras del tipo quinona. Mientras que los auxocromos más importantes son los radicales amina (-NH<sub>2</sub>), carboxilo (-COOH), sulfonato (-SO<sub>3</sub>H) e hidroxilo (-OH) (Dos Santos y cols, 2007). Los colorantes textiles pueden ser clasificados en función de su origen, propiedades químicas o físicas, estructura química, etc. Si atendemos exclusivamente la estructura química cabe mencionar como más importantes los de tipo antraquinona, azobenceno, ftalocianina, índigo y arilmetano (Figura 1) (Hao y cols, 2000; Dos Santos y cols, 2007).



**Figura 1.** Estructura química a) antraquinona b) azobenceno c) ftalocianina d) índigo e) triarilmetano

En el proceso de teñido, en la industria textil, los compuestos se unen fuertemente a la fibra textil mediante enlaces covalentes e interacciones electrostáticas. En determinadas condiciones, los colorantes forman grupos reactivos como el vinil sulfónico capaz de establecer enlaces con fibras. Sin embargo, en presencia de agua estos grupos reactivos sufren hidrólisis, perdiendo la afinidad por las fibras y siendo liberados a los efluentes industriales. De esta forma, entre el 10 o el 15% de los colorantes se pierden con el efluente durante el proceso de teñido y son vertidos a los ecosistemas acuáticos, con el consiguiente impacto ambiental (Soares y cols, 2001). La diversidad estructural de los colorantes textiles hace que el tratamiento de las industrias sea incompleto y a menudo ineficaz, por lo que se requiere una alternativa. (Kunamneni y cols., 2007)

### 1.3 Lacasas

Estas enzimas son de gran importancia debido a su capacidad para oxidar compuestos fenólicos gracias a los iones de cobre que forman parte de su centro activo. En los últimos tiempos han sido estudiadas por sectores industriales. Se trata de oxidorreductasas, EC 1.10.3.2, que pertenecen al grupo de oxidasas azules y representan un subgrupo de multicobre oxidasa (Alcalde y cols., 2008). Catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos aromáticos mediante un proceso de reducción del oxígeno molecular a agua, debido a la captación de electrones (Giardina y cols., 2010; Fernández-Fernández y cols., 2013).

#### 1.3.1 Origen y función

La primera lacasa descubierta fue en el látex del árbol *Toxicodendron vernicifluum*. Desde entonces se descubrió su presencia en diversas plantas, insectos, bacterias y hongos. Son numerosas sus implicaciones en procesos biológicos, aunque en determinados casos es complicado conocer la función que realizan.

- Las lacasas fúngicas son de gran importancia por su baja especificidad de sustrato y la capacidad de transformar diversos compuestos fenólicos. Estas lacasas se producen en los agentes causantes de la podredumbre blanca, como en saprófitos del suelo y patógenos de plantas, también se encuentran en hongos cultivados comestibles (Morozova y cols, 2007). Pero sobre todo, los productores de lacasa más comunes son casi todos los hongos que pudren la madera. Las lacasas fúngicas más conocidas son proteínas extracelulares, pero también se han descrito lacasas intracelulares. Las principales funciones de las lacasas fúngicas, son: formación de pigmento, degradación de lignina y detoxificación (Loera y cols., 2006; Giardina y cols., 2010).
- En las plantas, las lacasas se han encontrado en las paredes de la madera y participan en la síntesis de lignina. En su mayoría se tratan de proteínas extracelulares (Sato y cols., 2001).
- En los insectos, la función principal es la esclerotización de la cutícula de la epidermis (Dittmer y cols., 2004).
- Las lacasas bacterianas presentan múltiples funciones, como la de intervenir en la biosíntesis de pigmentos y en la homeostasis de cobre; esta última función es esencial en el caso de la lacasa CueO de *Escherichia coli*, ya que el cobre es tóxico incluso a bajas concentraciones, por lo que es imprescindible su regulación (Roberts y cols., 2002).

### 1.3.2 Composición

Las lacasas contienen como mínimo un átomo de cobre, pero con frecuencia suelen llegar a unir hasta cuatro átomos. La presencia de estos átomos confiere a la enzima la capacidad de oxidar determinados sustratos. Los átomos de cobre suelen ser de tres tipos, clasificados en función de las características obtenidas por resonancia paramagnética de electrones (EPR) visible y espectroscopía: (1) T1, átomo de cobre responsable del color azul de la enzima, absorbe a los 600 nm y es detectable por EPR, (2) T2, átomo de cobre incoloro, detectable por EPR, y por último (3) T3, consiste en un par de átomos de cobre que dan una absorbancia débil cerca del espectro UV y no hay señal de EPR, observándose un máximo de absorción a 330 nm. Los átomos T2 y T3 de cobre forman un grupo trinuclear (Durán y cols., 2002, Madhavi y Lele, 2009).

### 1.3.3 Mecanismo de catálisis

En las lacasas los sitios T1, T2 y T3 actúan conduciendo electrones. Los sustratos son oxidados en el sitio T1, el cual media la transferencia de electrones hasta el centro T2/T3, donde tiene lugar la reducción del oxígeno molecular a agua. El centro trinuclear (T2 y T3) reducido completamente (Figura 2A) reacciona con el oxígeno obteniéndose un intermediario tipo peróxido, generándose la unión de los dos átomos de cobre T2 y el átomo de cobre T3 mediante un grupo peróxido (Figura 2B). La reducción del intermediario peróxido genera la formación de un intermediario nativo, en el cual los átomos de cobre T2 y T3 estaría unidos por un producto tipo oxo o hidroxilo, e implica la ruptura O-O (Figura 2C). Por último, el intermediario nativo puede pasar rápidamente a la enzima completamente reducida en presencia del sustrato (Figura 2A), o bien, en el caso de ausencia, la enzima pasa a un estado de reposo (Figura 2D). Se consiguen finalmente la reducción del oxígeno a agua mediante la transferencia de 4 electrones producidos durante el ciclo de oxidoreducción. (Solomon y cols., 2008; Molla, 2011).

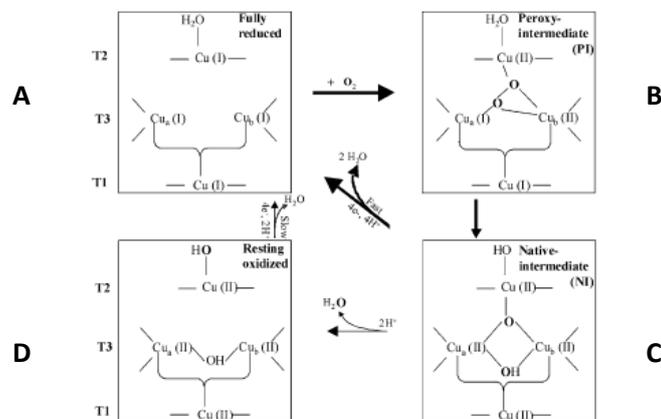
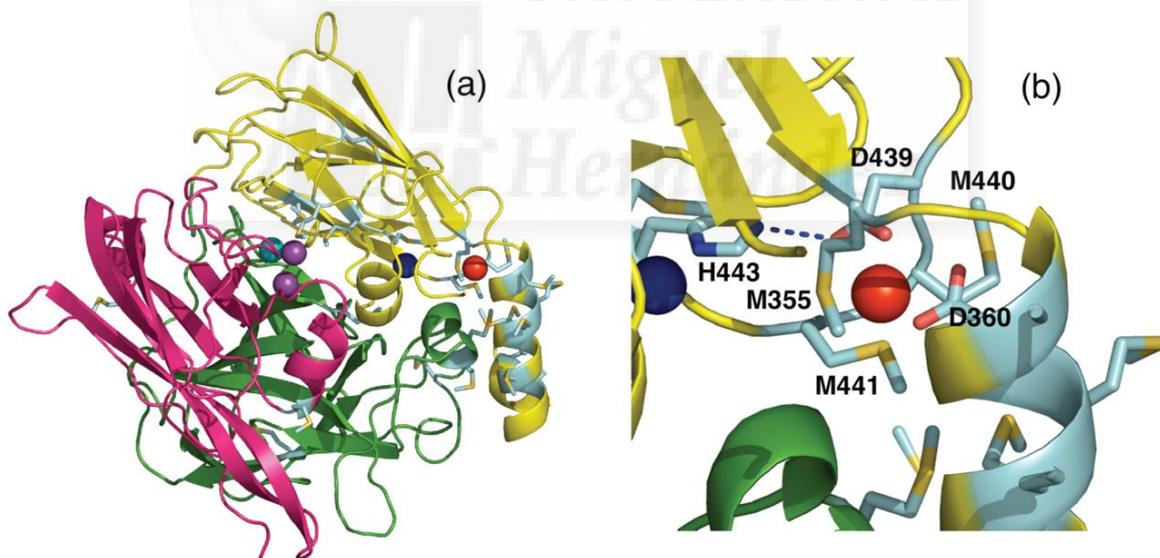


Figura 2. Ciclo catalítico de oxidoreducción llevado a cabo por las lacasas. (Giardina y cols. 2010)

### 1.3.4 Lacasa CueO de *Escherichia coli*

La utilización de lacasa CueO de *E. coli* ha permitido desarrollar excelentes biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas y ambientales debido a su alta actividad, selectividad y especificidad, que les permiten realizar procesos químicos complejos bajo diversas condiciones experimentales y naturales (Fernández-Fernández y cols., 2013). La realización de estudios *in vitro* ha demostrado la amplia especificidad de sustrato, permitiendo oxidar catecoles, iones ferrosos y sideróforos. Esta enzima puede clonarse y sobreexpresarse fácilmente en *E. coli* además de presentar mayor termoestabilidad, halotolerancia y un rango de pH óptimo más amplio que las lacasas fúngicas. (Santhanam y cols., 2011)

La lacasa CueO de *E. coli* contienen tres dominios conectados por péptidos enlazados y tres sitios de unión de cobre (T1, T2, T3) (Figura 3). La diferencia principal de CueO con respecto al resto de lacasas es la presencia de una región helicoidal rica en metioninas, que cubre la región de unión al sustrato y proporciona un posible lugar de unión para un cobre exógeno (Roberts y cols., 2002). La región rica en metioninas bloquea el acceso al centro T1, generándose un lugar para un cobre lábil adicional que presenta una función esencial para la actividad fenoloxidasas (Djoko y cols., 2010).



**Figura 3.** Estructura de la molécula CueO. a) Se observan tres dominios (en amarillo, verde y rosa) que conforman la proteína, cuatro sitios de unión de cobre (T1 en azul, T2 en cian, T3 binuclear en púrpura y T4 cobre lábil en rojo) y ubicación de las metioninas, en color amarillo y azul. b) Sitio de unión del cobre exógeno (en rojo). (Djoko y cols., 2010).

## **1.4 Inmovilización enzimática**

La inmovilización permite localizar a la enzima en una región definida del espacio para dar lugar a formas capaces de retener su actividad catalítica y puedan ser reutilizadas. La generación de catalizadores con enzimas inmovilizadas tiene como fundamento mejorar el rendimiento técnico de los procesos industriales y su economía, puesto que garantiza la recuperación y reutilización de la enzima (Khan y cols., 2010; Gasser y cols., 2014).

Es imprescindible seleccionar una buena estrategia de inmovilización que nos permita obtener un soporte con la mayor disponibilidad de superficie capaz de unirse a la enzima de interés y a un bajo coste; consiguiendo que la actividad biológica de la enzima no se vea alterada. La selección de una correcta estrategia de inmovilización depende de las propiedades físico-químicas del soporte y la enzima a inmovilizar. (Khan y cols., 2010)

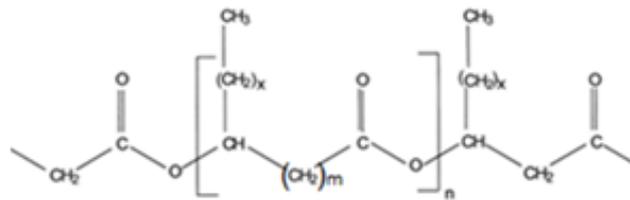
Los catalizadores convencionales no biológicos están quedando atrás dando paso a este tipo de sistemas. Además, la utilización de enzimas libres, en lugar de formas inmovilizadas, presenta una serie de inconvenientes como la generación de una alta inestabilidad térmica, susceptibilidad al ataque de proteasas, dificultad de reutilizar el catalizador, etc. Por tanto, la inmovilización de enzimas es una estrategia muy valiosa actualmente puesto que permite la reutilización del soporte con la enzima inmovilizada, aumenta la estabilidad enzimática, además de aumentar el tiempo de vida media del catalizador y previene la presencia de contaminantes en el medio. (Khan y cols., 2010; Gasser y cols., 2014).

### **1.4.1 Bioplásticos. Soportes naturales para la inmovilización proteica.**

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son polímeros biodegradables acumulados en el citoplasma de ciertas bacterias formando gránulos de reserva, constituyendo una fuente de carbono y energía. Los gránulos de PHA se encuentran recubiertos de fosfolípidos y proteínas asociadas a gránulos de PHA, como: (1) PHA sintasa, que interviene en la polimerización de PHAs, (2) despolimerasa PHA, que participa en la degradación del bioplástico, (3) las fasinas, que presentan una función estructural y reguladora, y también, (4) otras proteínas. (Madison y cols., 1999; Moldes y cols., 2004; Keshavarz y cols., 2010).

Hay una amplia variedad de polihidroxicanoatos, pudiéndose clasificar en función de la longitud de la cadena que conforma los monómeros (Tabla 1): (1) de cadena corta, en la cual la unidad monomérica contiene entre 4 y 5 carbonos como es el caso del PHB (polihidroxibutirato), (2) de cadena media, formada la unidad monomérica entre 6 y 17 carbonos, y (3) de cadena larga, aquellos que la unidad monomérica está formada por más de 17 átomos de carbono. (Zinn y cols., 2001; Jendrossek, 2009)

### Generalmente $m=1$ (poli-3-hidroxicanoatos)



**$x=0-1$ : PHA de cadena corta (scIPHA) - Cristalinos**

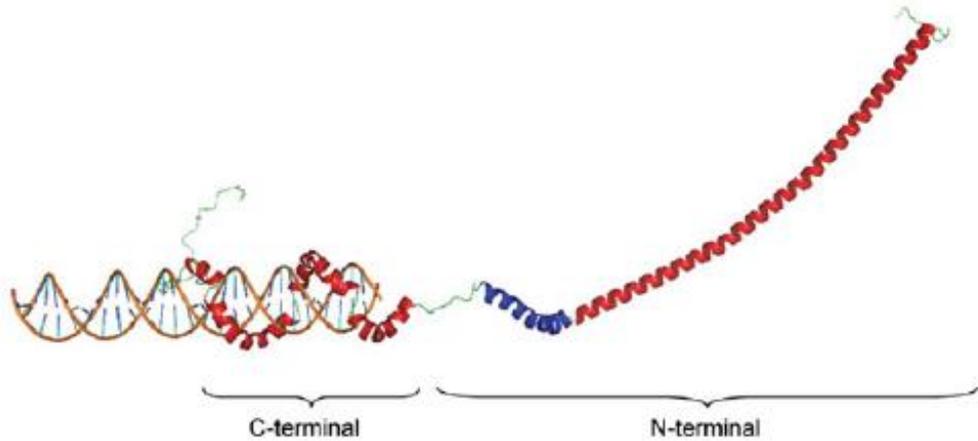
**$x=2-13$ : PHA de cadena media (mcIPHA)**

**$x > 13$ : PHA de cadena larga (lcIPHA)**

Figura 4. Fórmula y estructura de los distintos tipos de PHA.

Son considerados una alternativa muy prometedora en comparación a los plásticos convencionales, ya que proceden de fuentes renovables y son biocompatibles (Smit y cols., 2012). Debido a estas propiedades los PHAs han alcanzado un gran interés científico y actualmente son empleados en biotecnología y biomedicina (Somleva y cols., 2013)

Los granulos de PHA contienen fasinas, proteínas de bajo peso molecular, que generan una interfase entre el citoplasma y el núcleo hidrofóbico de los granulos (Jendrossek, 2009). Las fasinas intervienen en la estabilización y el metabolismo de los granulos de PHAs. Una de las principales fasinas es PhaF de *Pseudomonas putida*, la cual está organizada en dos dominios: (1) Un dominio C-terminal con carga positiva y con repetición de aminoácidos para permitir la unión al ADN como hacen las histonas y (2) un dominio N-terminal que se une a los granulos de PHA (Moldes y cols., 2004; Maestro y cols., 2013)



**Figura 5.** Modelo estructural de la fasina PhaF de *Pseudomonas putida* KT2440 unida al ADN, formando un complejo.

La capacidad de unión que presentan las fasinas ha permitido utilizar las secuencias enteras como etiquetas de afinidad para la inmovilización y purificación de proteínas recombinantes en gránulos de PHAs. Para conseguir la inmovilización de proteínas de fusión *in vivo* en los gránulos se ha desarrollado el dominio N-terminal de la fasina de PhaF como etiqueta de afinidad denominada BioF (Moldes y cols., 2004; Atwood y cols., 2009).

UNIVERSITAT  
Miguel  
Hernández

## 2. Antecedentes y objetivos

### 2.1 Antecedentes

En el presente laboratorio se construyó con anterioridad una proteína de fusión formada por CueO y el “tag” de afinidad BioF (proteína BioF-CueO), a partir de la cual se pudo obtener partículas bioactivas mediante su inmovilización en PHB (polihidroxibutirato) capaces de degradar colorantes presentes en las aguas residuales de las industrias textiles. Hasta la fecha se había probado este sistema a determinadas condiciones de pH, tiempos de incubación, temperatura y a distintas concentraciones de proteína (Bello Gil, 2013). También, se realizaron ensayos para evaluar: (1) la capacidad máxima de absorción de BioF-CueO sobre el soporte de PHB siendo ésta de 30 µg de proteína por cada mg de PHB, (2) el pH al cual la actividad de BioF-CueO es máxima siendo éste de 6.5 y (3) se demostró que la inmovilización de la enzima en PHB no afecta a sus características cinéticas.

### 2.2 Objetivos

En el presente trabajo se abordan diferentes estudios con el fin de probar los sistemas de degradación de colorantes en condiciones más acordes con efluentes reales de la industria textil.

1. Efecto de distintas temperaturas sobre la actividad de BioF-CueO inmovilizada en PHB.
2. Reciclaje del soporte con la enzima inmovilizada, a distintas temperaturas para los colorantes negro reactivo 5 (RB5) e índigo carmín (IC).
3. Efecto de distintos compuestos utilizados en las industrias textiles sobre la actividad degradativa de BioF-CueO.
4. Uso de un extracto de *E. coli* que sobreexpresa BioF-CueO (sin purificar) para la degradación de los colorantes negro reactivos 5 (RB5) e índigo carmín (IC).

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Cepas bacterianas y plásmidos

En el presente trabajo se ha usado la cepa BL21 con y sin plásmido pDB2.

Especie	Cepa	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	BL21	F <sup>-</sup> ompT gal [dcm][lon] hsdS <sub>B</sub> con DE3	Studier y cols. (1986)

Plásmido	Parental	Características	Referencias
pDB2	pET-21d(+)	Ap <sup>r</sup> , BioF-CueO <sup>+</sup>	Bello-Gil (2013)

**Tabla 1.** Características de la cepa BL21 y el plásmido pDB2.

### 3.2 Medios, condiciones de cultivo y de conservación

Los cultivos líquidos de *Escherichia coli* se crecieron en medio Luria-Bertani (LB), triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L y suplementado con ampicilina 0.1 mg/mL (al cultivo BL21 sin el plásmido pDB1 no se le añadió ampicilina, puesto que no presenta resistencia). Se somete a agitación orbital a 200 rpm y 37 °C. El crecimiento se valoró por turbidimetría a 600 nm utilizando el espectrofotómetro “Evolution 201” (Thermo Scientific).

### 3.3 Expresión y purificación de la proteína recombinante BioF-CueO

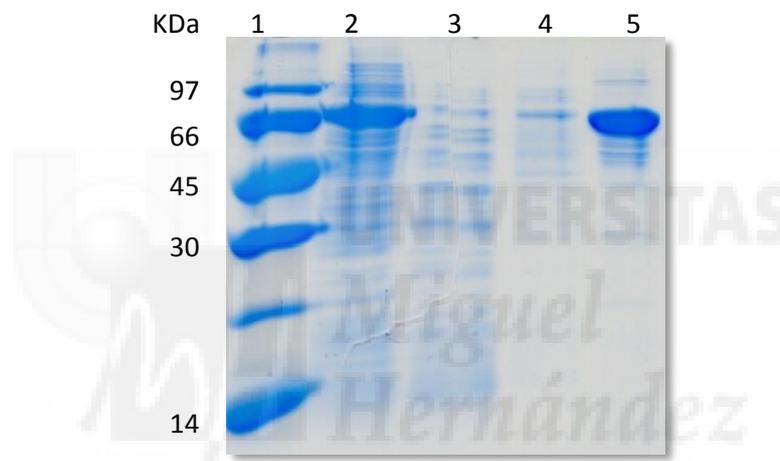
Una vez crecido un litro de cultivo de *E. coli* BL21 que contiene el plásmido pDB2 hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.6 (a 600nm) se añade IPTG 0.5 mM para inducir la expresión del gen BioF-CueO, manteniéndose durante 16 horas a 25 °C y una agitación de 200 rpm. Transcurrido ese tiempo las células se recogieron por centrifugación a 5000xg durante 10 minutos a 4 °C y se resuspendieron con 50 mL de tampón fosfato de sodio 20 mM más CuSO<sub>4</sub> 1mM a pH 7. A continuación, las células fueron lisadas por sonicación mediante 10 ciclos de 15 segundos a 4°C. El extracto resultante se centrifugó a 10000xg durante 10 min. a 4 °C, y a la fracción soluble se le añadió lentamente sulfato amónico hasta alcanzar una concentración 0.75 M, a la misma temperatura. La mezcla fue centrifugada nuevamente (10 min., 10000xg y a 4 C) y el sobrenadante resultante, con nuestra proteína de interés, fue purificado como se muestra a continuación.

Para la purificación de la proteína de interés fue requerida una columna de butil-sefarosa (GE, Healthcare) equilibrada en tampón fosfato de sodio 20 mM y sulfato amónico 0.75 M (pH 7.0). Una vez inmovilizada la proteína en la columna, ésta se lavó con tampón fosfato de sodio 20 mM más sulfato amónico 0.5 M (pH 7.0) hasta que no se detectó presencia de proteína en la fracción de

lavado. Por último, la proteína BioF-CueO se eluyó de la columna utilizando tampón fosfato de sodio 20 mM con sulfato de amonio 0.3 M (pH 7.0). Las fracciones recogidas de 1.5 mL se conservaron a 4°C.

### 3.4 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La pureza de las fracciones proteicas obtenidas de BioF-CueO fue verificado por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), utilizando el sistema Mini-Protean de Bio-Rad. El gel concentrador fue preparado a una concentración final de acrilamida del 4 % (p/v) y el separador a una concentración de 15 % (p/v). Los geles fueron teñidos con EZBlue™ (Sigma-Aldrich).



**Figura 6.** Análisis de SDS-PAGE. 1) Marcador de peso molecular. 2) Extracto. 3) Fracción no retenida. 4) Fracción de lavado. 5) Proteína BioF-CueO eluida.

### 3.5 Valoración de la concentración de proteína pura

La concentración de la proteína pura se valoró por espectroscopía de absorción a 280 nm (Evolution 201, Thermo Scientific), utilizando coeficientes de extinción teórico ( $E_{0.1\%} = 1.16$ ) calculado a partir de la secuencia primaria de la proteína (Programa *ProtParam* del servidor EXPASY, <http://web.expasy.org/protparam>).

### 3.6 Valoración de proteína total en el extracto.

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método colorimétrico de Bradford (1976) empleando como reactivo el “Protein Assay Dye Reagent Concentrate” de Bio-Rad. Para la curva patrón se utilizó la albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich).

### 3.7 Hidratación del soporte (PHB) e inmovilización de la proteína recombinante empleando etiquetas de afinidad BioF-CueO

Se equilibraron 50 mg de PHB (polihidroxibutirato) con 1 mL de tampón Tris 20 mM (pH=6.5). Tras la hidratación del soporte se centrifugó a 9000 rpm durante 3 minutos. Una vez desechado el sobrenadante se añadió cierta cantidad de proteína purificada o extracto (proteína sin purificar) al soporte con tampón Tris 20mM (pH=6.5) y se dejó en agitación en noria durante 30 minutos a temperatura ambiente, hasta conseguir la inmovilización de la proteína de interés sobre el PHB (polihidroxibutirato). Trascurrido el tiempo de inmovilización la fracción de proteína no unida al soporte fue separada por centrifugación (9000 rpm).

Finalmente, para conseguir la eliminación total de la proteína no retenida en el soporte, se realizaron: (1) 2 lavados con 1mL de Tris 20 mM (pH=6.5) en la inmovilización de la proteína purificada, mientras que, (2) para el extracto se realizaron 4 lavados con 1 mL de Tris 20 mM (pH=6.5).

### 3.8 Colorantes empleados en los ensayos de degradación

Se ensayó la capacidad de BioF-CueO para degradar la estructura de diferentes colorantes sintéticos (Sigma-Aldrich). Los colorantes empleados en el presente trabajo fueron Negro Reactivo e Índigo carmín (Tabla 2), estos se disolvieron en Tampón Tris 20 mM a pH 6.5.

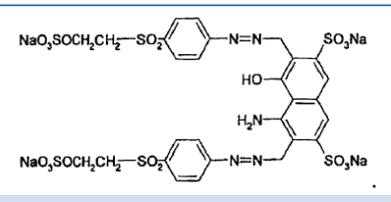
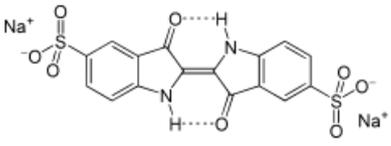
Colorantes	Estructura	Longitud de onda(nm)	Concentración (µg/mL) a DO=1
<b>Negro reactivo(RB5)</b>		597	40
<b>Índigo carmín (IC) o azul ácido</b> 74		608	24.8

Tabla 2. Estructura, longitud de onda y concentración de los colorantes RB5 e IC.

La degradación obtenida finalmente tras el tratamiento se cuantificó por espectrofotometría de absorción en el visible (Evolution 201, Thermo Scientific), valorando en el tiempo la disminución del pico máximo de absorción (en nm) descrito para cada colorante.

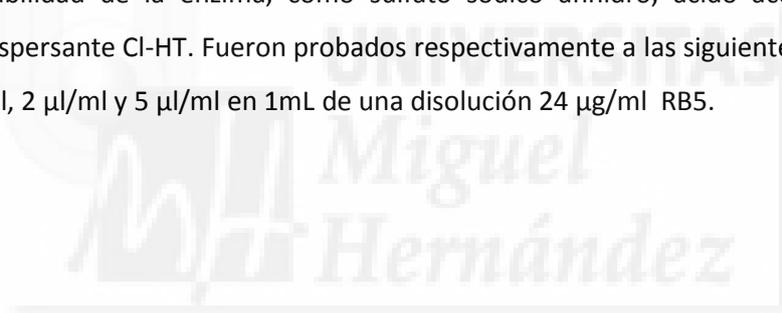
La decoloración o eliminación del color se expresó, como:

$$\% \text{ Decoloración o Degradación} = \frac{(A_i - A_f)}{A_i} \cdot 100$$

Siendo  $A_i$  la absorbancia inicial de la solución de colorante sin someterse al tratamiento y  $A_f$ , absorbancia final tras someterse al tratamiento de degradación con BioF-CueO.

### **3.9 Reactivos utilizados en las industrias textiles**

Durante el proceso de tinción se emplean detergentes y disolventes orgánicos que pueden afectar a la estabilidad de la enzima, como sulfato sódico anhidro, ácido acético, auxigal PRD (tensoactivo) y dispersante CI-HT. Fueron probados respectivamente a las siguientes concentraciones 20 mg/ml, 2 µl/ml, 2 µl/ml y 5 µl/ml en 1mL de una disolución 24 µg/ml RB5.

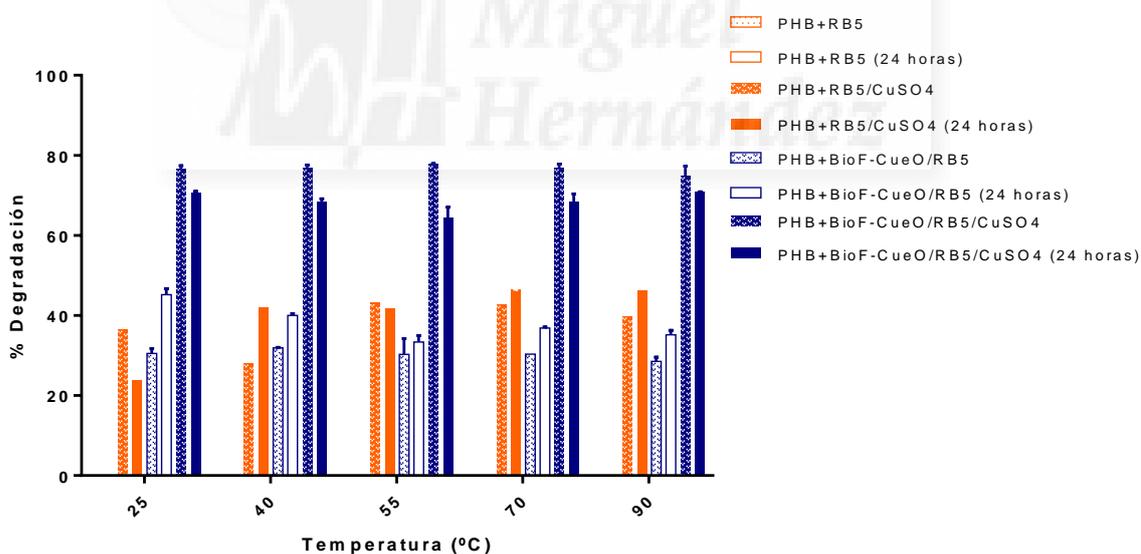


## 4. Resultados

### 4.1 Efecto de distintas temperatura sobre BioF-CueO inmovilizada en PHB

En las industrias textiles los efluentes provenientes del proceso de tinción se encuentran a una temperatura de 90°C. Ha de demostrarse si esa temperatura puede afectar a la actividad enzimática ocasionando una disminución de su capacidad degradante. En el caso de afectar significativamente a la actividad de BioF-CueO sería requerido el enfriamiento del efluente hasta conseguir la temperatura óptima, a la cual la actividad enzimática no se vea disminuida.

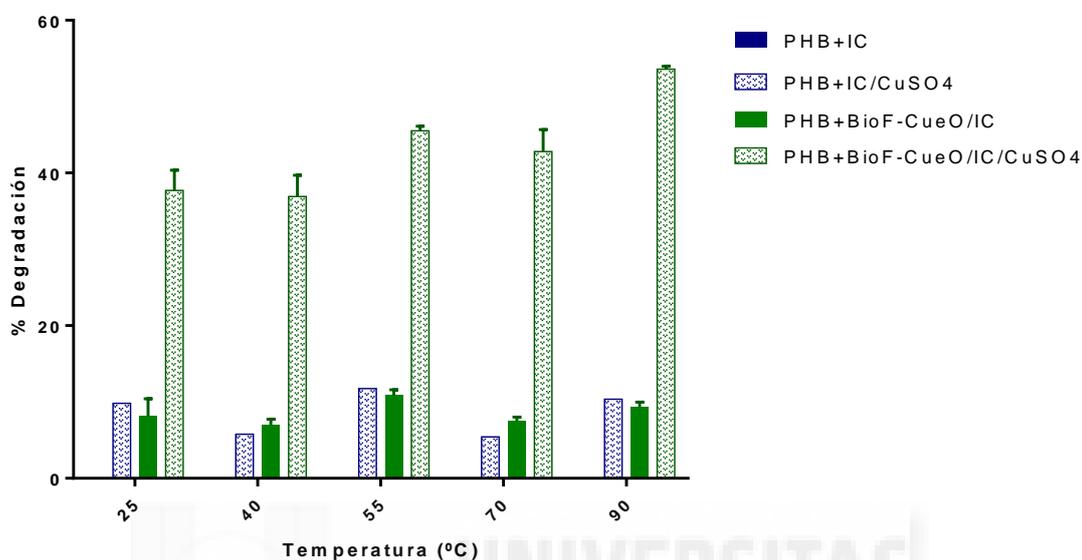
Con el fin de demostrar si las altas temperaturas afectan a la enzima BioF-CueO se ensaya la capacidad de degradación de dos colorantes (RB5 e IC) a una absorbancia de 0.6, a distintas temperaturas en un rango de 25 a 90°C. Para RB5 se mide la degradación tras la actuación de la enzima durante una hora y 24 horas, a temperatura ambiente y sometida a agitación (en noria). Además se prueba si la presencia de  $\text{CuSO}_4$  0.1 mM en los colorantes afecta a la actividad enzimática consiguiendo la decoloración de RB5 e IC por la enzima, o bien simplemente por la presencia del  $\text{CuSO}_4$  en el medio.



Gráfica 1. Degradación del colorante RB5 a distintas temperaturas y distintos tiempos.

En el caso de RB5 las altas temperaturas no afectan a la enzima disminuyendo su actividad, incluso con la presencia de  $\text{CuSO}_4$  su acción degradante no se ve alterada (Gráfica 1). La enzima es capaz de seguir degradando después de la primera hora, alcanzando aproximadamente un 10% más de degradación a las 24 horas, en el caso de no haber cobre en el medio. La presencia de  $\text{CuSO}_4$

permite decolorar un 35% de RB5, consiguiéndose casi la misma degradación producida por la enzima sin  $\text{CuSO}_4$ . Este efecto hace que en el caso de no presentar  $\text{CuSO}_4$  la degradación por la enzima no supere el 40% mientras que la presencia de cobre aumenta la degradación hasta un 80%.

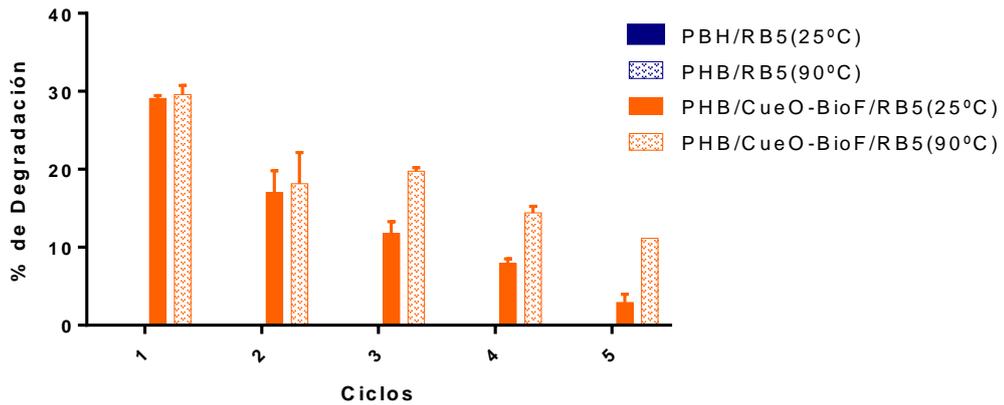


Gráfica 2. Degradación del colorante Índigo carmín (IC) a distintas temperaturas en presencia y ausencia de  $\text{CuSO}_4$ .

El empleo del colorante IC a temperaturas superiores a  $25^\circ\text{C}$  tampoco afecta a la actividad de BioF-CueO (Gráfica 2), al igual que ocurría para el colorante anterior. La degradación de IC por la enzima no es tan eficiente como para RB5. BioF-CueO solo es capaz de degradar el 50% de IC en presencia de  $\text{CuSO}_4$ , mientras que en el caso de no estar presente degradaría el 10% del colorante. Para IC el cobre afecta de forma mucho más significativa a la actividad enzimática, haciendo que aumente su capacidad degradante, mientras que este efecto no se aprecia tan fácilmente para RB5 (Gráfica 1).

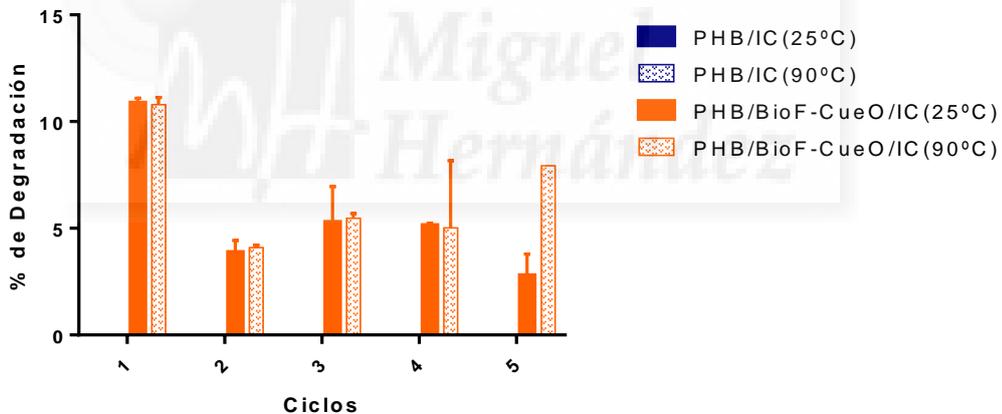
#### 4.2 Reciclaje del soporte con BioF-CueO inmovilizada a distintas temperaturas para los colorantes negro reactivos 5 (RB5) e índigo carmín (IC).

Se prueba la reutilización del soporte para dos colorantes RB5 e IC (sin  $\text{CuSO}_4$ ) con la enzima inmovilizada durante 5 ciclos. Los ciclos fueron de una hora de degradación y entre ellos se lavó el soporte con Tris (20 mM y pH 6.5) y se añadió nuevo colorante (con absorbancia 0.6) a dos temperaturas, a 25 y a  $90^\circ\text{C}$ .



**Gráfica 3.** Reciclaje del soporte, degradando RB5 a 25°C y a 90°C.

El colorante a distintas temperaturas no afecta a la enzima en los distintos ciclos del reciclado del soporte, pero sí se ve alterada considerablemente la capacidad de degradación de BioF-CueO a medida que se realizan los ciclos, posiblemente por la pérdida de cobre de la proteína. Tras el primer ciclo disminuye la actividad de la enzima un 10% aproximadamente, mientras que en el resto de ciclos se ve disminuida su capacidad de degradación un 5% (Gráfica 3).

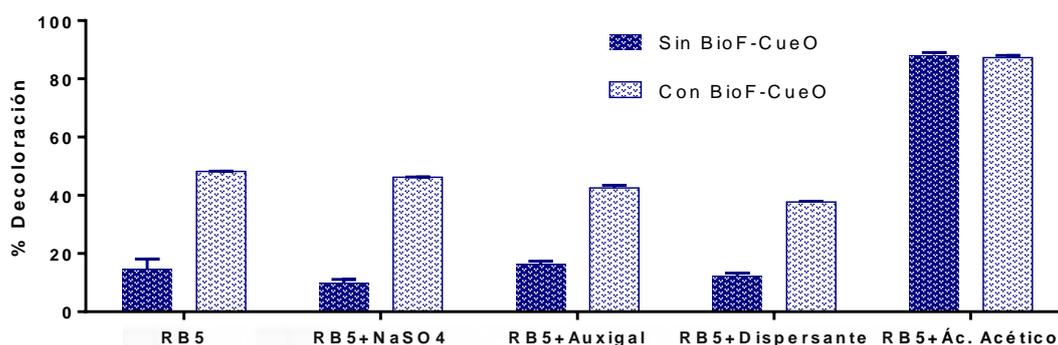


**Gráfica 4.** Reciclaje del soporte, degradado IC a distintas 25°C y a 90°C.

En el caso del reciclaje del soporte con IC (Gráfica 4), en el segundo ciclo disminuye casi a la mitad la actividad de la enzima siendo solo degradado un 5% del colorante, sin embargo en el resto de los ciclos sucesivos la actividad de BioF-CueO se mantiene.

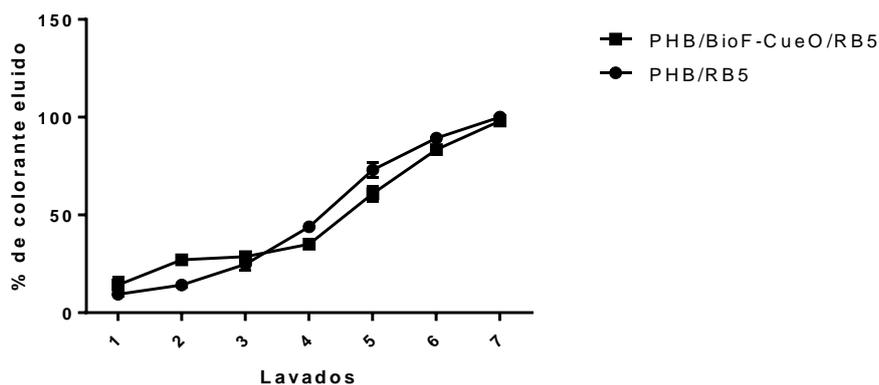
### 4.3 Efecto de distintos compuestos utilizados en las industrias textiles sobre la actividad degradativa de BioF-CueO.

Los colorantes utilizados en el proceso de tinción de tejidos presentan una serie de compuestos que pueden afectar a la actividad enzimática. Para simular las condiciones reales de trabajo es necesario demostrar que la enzima no se ve alterada, por ello se probaron los siguientes compuestos: **(1)** Sulfato sódico anhidro. **(2)** Auxigal PRD tensoactivo. **(3)** Dispersante CI-HT. **(4)** Ácido acético. Este ensayo fue realizado sin la presencia de  $\text{CuSO}_4$  en el medio a temperatura ambiente.



Gráfica 5. Degradación del colorante RB5 junto con otros compuestos.

En ausencia de proteína, se observa normalmente una pequeña absorción inespecífica del colorante al soporte (alrededor de un 15%). Por otro lado, BioF-CueO es capaz de degradar el 40% de RB5 (absorbancia de 0.6). Su capacidad degradante no se ve alterada, de forma significativa, al añadir al colorante los compuestos sulfato sódico anhidro, auxigal PRD y el dispersante CI-HT (Gráfica 5). Sin embargo, al añadir ácido acético el colorante fue retenido en el soporte (PHB) observándose una decoloración del sobrenadante del 90%. Este efecto fue debido al pH ácido del ácido acético, ya que al someter el soporte de PHB a 7 lavados con Tris (20mM pH=6.5) el colorante fue eluido observándose un pico de absorción una vez alcanzado pH 6. Tras realizar los lavados se cuantificó la concentración de colorante eluido del soporte, en el tubo problema (con la enzima inmovilizada) y el tubo control (sin enzima). La concentración obtenida de colorante fue la misma en ambos tubos, por tanto la enzima no actuó degradando el colorante (Gráfica 6).



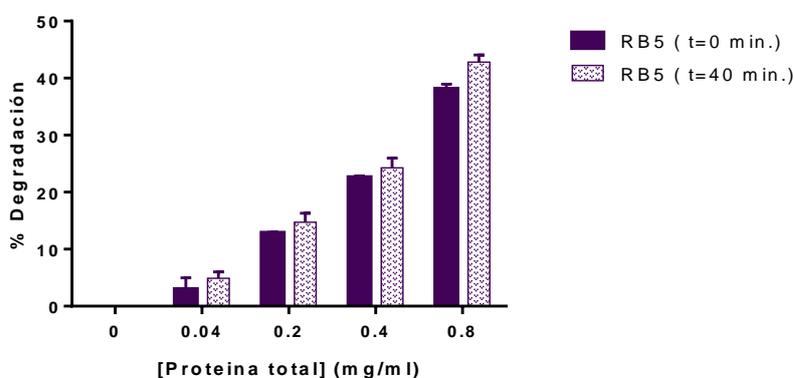
Gráfica 6. Elución del colorante RB5 con Ác. Acético, depositado en el soporte, tras 7 lavados.

#### 4.4 Uso de un extracto bacteriano de *E. coli* que sobreexpresa BioF-CueO (sin purificar) para la degradación de los colorante negro reactivo 5 (RB5) e índigo carmín (IC).

Hasta el momento, en el presente trabajo se había utilizado la enzima BioF-CueO purificada para degradar colorantes. Sin embargo a nivel industrial esto supone un gasto económico extra, además del tiempo requerido en la purificación. Por ello se plantea la utilización del extracto de BioF-CueO sin purificar para la degradación de colorantes utilizados en la industria textil.

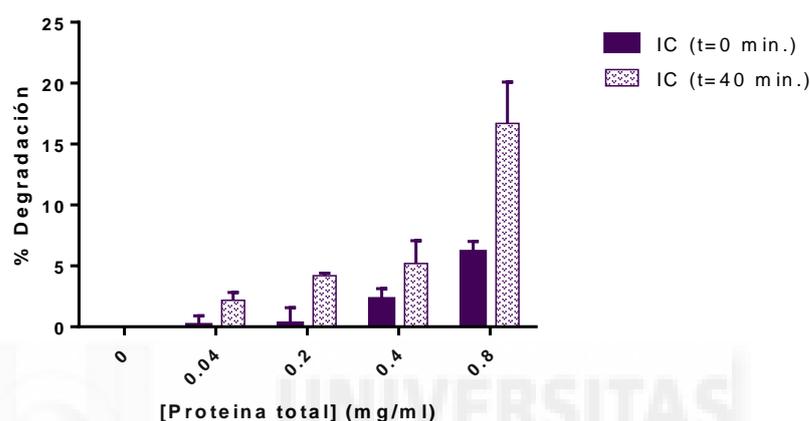
##### 4.4.1 Evaluación de la degradación de los colorantes RB5 e IC a distintas concentraciones de BioF-CueO sin purificar.

Con el fin de simular las condiciones reales se realizaron lavados del soporte con Tris (20mM pH=6.5 y CuSO<sub>4</sub>) y se probaron distintas concentraciones de extracto. Se midió la degradación de RB5 e IC a distintos tiempos a 0 y a 40 min (Gráfica 7).



Gráfica 7. Degradación de RB5 producida por distintas concentraciones de proteína total en el extracto.

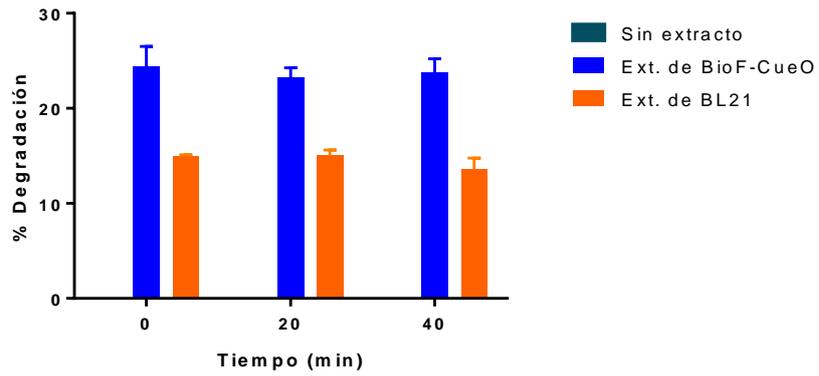
Trascurrido los 40 minutos de incubación no se observó una gran diferencia en comparación con la degradación obtenida a tiempo cero, lo cual nos indica que la actuación de la enzima es inmediata y el proceso degradativo, con el extracto inmovilizado en PHB, no requiere de mucho tiempo (Gráficas 7 y 8). Para ambos colorantes se obtuvo una máxima degradación para concentraciones de BioF-CueO de 0.8 mg/ml obteniéndose una degradación de RB5 del 45% (Gráfica 8), mientras que para IC fue del 20% (Gráfica 9). Este efecto nos indica de nuevo que la enzima es mucho más activa para RB5 que para IC.



**Gráfica 8.** Degradación de IC producida por distintas concentraciones de proteína total en el extracto.

#### 4.4.2 Degradación de RB5 mediante la utilización de diferentes extractos.

Se evalúa la degradación del colorante RB5 a distintas condiciones: **(1)** sin utilizar extracto, **(2)** extracto con la enzima BioF-CueO expresada (proteína total 0.4 mg/ml) y **(3)** extracto BL21, el cual no presenta la enzima BioF-CueO. Ninguna de las muestras presentó  $\text{CuSO}_4$ . Se evalúa la degradación a distintos tiempos a tiempo 0, a los 20 y a los 40 minutos (Gráfica 9).



**Gráfica 9.** Capacidad degradante de diferentes extractos.

El extracto de BioF-CueO inmovilizado en el soporte de PHB es capaz de degradar el 25% del colorante, mientras que el extracto BL21 sin la enzima BioF-CueO también es capaz de degradar aproximadamente un 15% de colorante. Se puede observar que el efecto de ambos extractos degradando es inmediato, y no son capaces de degradar mucho más al cabo de 40 minutos (Gráfica 9).



## 5. Discusión

### 5.1 Efecto del colorante a distintas temperaturas

En las industrias textiles no sería requerido un pre-tratamiento para la disminución de la temperatura de salida del colorante a los 90°C (Gráficas 1 y 2) ya que la enzima BioF-CueO inmovilizada en PHB no disminuye su actividad, por tanto no supone un gasto extra para la industria. Además la enzima es capaz de seguir degradando después de la primera hora de incubación lo cual permite conseguir aumentar, aún más si cabe, la degradación del colorante dejándolo más tiempo (Gráfica 1).

### 5.2 Efecto del cobre sobre la degradación de RB5 e IC con la utilización de la enzima BioF-CueO purificada.

En el presente trabajo hemos visto que la presencia de  $\text{CuSO}_4$  (0.1 mM), en el medio sin enzima, permite disminuir la cantidad de colorante (Gráficas 1 y 2). Además, el  $\text{CuSO}_4$  (en un medio con BioF-CueO inmovilizada) consigue aumentar la actividad de la enzima de forma significativa, produciéndose un aumento de la degradación de IC (Gráfica 2). Sin embargo, para la degradación de RB5 no se aprecia de forma tan clara que el  $\text{CuSO}_4$  esté aumentando la actividad de la enzima, sino que más bien parece que se esté produciendo un efecto aditivo de la degradación producida por el cobre más la producida por la enzima (Gráfica 1). Una posible explicación a este efecto, es que la degradación inespecífica de RB5 por cobre es tan elevada que apenas puede verse la contribución enzimática, mientras que IC5 es mucho menos susceptible a cobre y, en este caso, la actividad enzimática inducida por cobre es más evidente.

En definitiva, la utilización de  $\text{CuSO}_4$  puede afectar significativamente a la degradación del colorante, esto supone una ventaja ya que se consigue una mayor pérdida del colorante sin necesidad de utilizar gran cantidad de enzima, pero a nivel industrial es una desventaja ya que la utilización del  $\text{CuSO}_4$  supone un alto coste para la industria textil, por tanto prescindir de utilizarlo supone un gran beneficio aun a costa de disminuir la velocidad de degradación.

### 5.3 Reciclaje del soporte con la enzima BioF-CueO purificada

En las condiciones probadas, en ausencia de  $\text{CuSO}_4$  y a dos temperatura (25 y 90°C), la enzima disminuye su actividad, pudiendo deberse a la inactivación de ésta o bien por la desorción del soporte (Gráficas 3 y 4), aunque lo más probable es que se trate de una eliminación paulatina del cobre de la proteína.

#### **5.4 Efecto de distintos compuestos sobre BioF-CueO**

Los compuestos sulfato sódico anhidro, auxigal PRD tensoactivo, dispersante utilizados durante el proceso de tinción del tejido en la industria junto con los colorantes no experimentan ningún efecto sobre la enzima BioF-CueO, lo que facilitan su aplicación industrial. Sin embargo, la presencia de ácido acético hace que la enzima no sea capaz de degradar el colorante puesto que el pH que alcanza el medio es tan extremadamente ácido que la enzima se inactiva y el colorante se absorbe sobre el soporte (Gráficas 5 y 6).

Una posible alternativa es llevar a cabo un primer tratamiento en el cual el colorante pase por un soporte sin enzima inmovilizada. Tras varios lavados para equilibrar el soporte a un pH de alrededor de 6, se procedería entonces a la degradación con la enzima.

#### **5.5 Evaluación de la degradación del colorante RB5 e IC a distintas concentraciones de BioF-CueO sin purificar**

El proceso de purificación enzimática supone tiempo y dinero para la industria, por tanto evitar este proceso supone un gran beneficio. Por ello en el presente trabajo se prueban distintas concentraciones de extracto para ver si tienen el mismo efecto degradante o mayor. Se observó que, a concentraciones de 0.8 mg/ml de proteína total en el extracto (Gráficas 7 y 8), la capacidad degradante es prácticamente la misma que con la proteína purificada (sin presencia de  $\text{CuSO}_4$  en el medio) (Gráficas 1 y 2). Por ello es considerado la utilización del extracto como un buen método de degradación del colorante.

Sin embargo, hay que resaltar que el mismo extracto bacteriano sin expresar BioF-CueO presente además otra serie de oxidoreductasas capaces de degradar el colorante, de manera que aproximadamente la mitad de la degradación observada puede considerarse inespecífica (Gráfica 9).

## 6. Conclusión y perspectiva futura

### 6.1 Conclusiones

La generación de soportes bioactivos capaces de degradar colorantes es una alternativa muy prometedora en comparación a los métodos convencionales de eliminación de colorantes utilizados en la industria textil. La inmovilización de BioF-CueO en un soporte de PHB permite la degradación de gran parte del colorante expulsado, incluso a los 90°C, durante los procesos de tinción por la industria textil. Por otra parte, la presencia de componentes habituales en los procesos de tinción apenas tiene efecto sobre la enzima, a excepción del ácido acético que provoca una absorción inespecífica del colorante sobre el PHB y hace que la enzima se inactive debido al pH extremadamente ácido, por ello sería requerida una neutralización previa de la muestra. Por último, la utilización del extracto bacteriano en lugar de BioF-CueO purificada permite degradar prácticamente la misma cantidad de colorante, por tanto la utilización del extracto en lugar de la enzima purificada supondría un gran beneficio para la industria no solo por el ahorro de tiempo sino también de costes.

### 6.2 Perspectivas futuras

Futuras investigaciones podrán basarse en:

1. El empleo de otros tipos de soportes del tipo de los PHA que presenten mejores propiedades de transferencia de masa con el efluente.
2. Puesto que en el presente trabajo se está trabajando a escala de laboratorio sería necesario llevar a cabo un escalado del sistema.
3. Probar otros colorantes utilizados en la industria textil permitiría establecer la eficacia de nuestro sistema.
4. La utilización de mutantes más eficientes capaces de degradar en menos tiempo y más cantidad de colorante.
5. Para mejorar el reciclado de la enzima unida al soporte se podría reequilibrar el mismo con cobre fresco entre ciclo y ciclo de degradación.

## 7. Bibliografía

- Alcalde, M y cols. (2008).** Laccases and their applications: a patent review. *Recent Pat Biotechnol.* Vol. 2, pp. 10-24.
- Atwood, J.A. y cols. (2009).** Protein engineering towards biotechnological production of bifunctional polyester beads. *Biotechnol Lett.* Vol. 31, pp. 131-137.
- Bello Gil, D. (2013)** Desarrollo de sistema para la inmovilización de proteínas y sus aplicaciones biotecnológicas. (Tesis doctoral) Universidad Miguel Hernández. Instituto de Biología Molecular y Celular.
- Cortazar-Martinez, A y cols. (2012).** Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Universidad y ciencia.* Vol. 28, pp.187-199
- Dittmer, NT y cols. (2004)** Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* . Vol. 34, pp. 29-41.
- Djoko, K.Y. y cols. (2010).** Reaction Mechanisms of the Multicopper Oxidase CueO from *Escherichia coli* support its functional role as a cuprous oxidase. *J Am Chem Soc.* Vol. 132, pp. 2005-2015.
- Dos Santos, A.B. y cols. (2007).** Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour. Technol.* Vol. 98, pp 269-2385.
- Durán, N. y cols. (2002).** Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb Technol.* Vol. 31, pp. 907-931.
- Fernández-Fernández, M. y cols. (2013).** Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv.* Vol.31, pp. 1808-1825.
- Foo, K.Y. y cols. (2010).** Decontamination of textile wastewater via TiO<sub>2</sub>/ activated carbon composite materials. *Adv Colloid Interface Sci.* Vol. 159, pp. 130-143.
- Gasser, C. y cols. (2014).** Laccases to take on the challenge of emerging organic contaminants in wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 98, pp. 9931-9952.
- Giardina, P y cols. (2010).** Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci.* Vol. 63, pp. 369-385.

- Hao, O. y cols. (2000).** Decolorization of wastewater. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* Vol. 30, pp. 449-505.
- Honorio, JF y cols. (2016).** Adsorption of reactive blue BF-5G dyes by soybean hulls: kinetics, equilibrium and influencing factors. *Water Sci Technol.* Vol.73, pp.1166-1174.
- Jendrossek, D. (2009).** Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J Bacteriol.* Vol. 191, pp. 3195-3202.
- Kandelbauer, A. y cols. (2005).** Bioremediation for the decolorization of textile dyes - a review. *Environmental Chemistry.* Pp. 269-288, Lichtfouse, Eric, Schwarzbauer, Jan, Robert, Didier (Eds.). Springer.
- Keshavarz, T. y cols (2010).** Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Curr Opin Microbiol.* Vol. 13, pp. 321-326.
- Khan, A.A. y cols. (2010).** Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. *Res J Biol Sci.* Vol. 5, pp. 565-575.
- Kunamneni, A y cols. (2007).** Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochem.* Vol. 43, Pp.169-178.
- Loera, O y cols. (2006).** Laccases. *Adv Agric Food Biotechnol.* Pp. 323-340. Research Signpost (India).
- Madhavi, V. y cols. (2009).** Laccase: properties and applications. *BioResour.* Vol. 4, pp. 1694-1717.
- Madison, L. L. y cols. (1999).** Metabolic engineering of poly (3- hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 63, pp. 21-53.
- Maestro, B. y cols. (2013).** A new family of intrinsically disordered proteins: Structural characterization of the major phasin PhaF from *Pseudomonas putida* KT2440. *PLoS ONE* 8: e56904. doi:10.1371/journal.pone.0056904.
- Majeau, JA y cols. (2010).** Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour Technol.* Vol.101, pp. 2331-2350.
- Moldes, C. y cols. (2004).** In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 70, pp. 3205-3212.

- Molla, R. (2011).** Caracterización de la lacasa de *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 y aproximación al estudio de su potencial oxidativo y función biológica. (Tesis doctoral) Universidad de Alcalá. Departamento de Microbiología y Parasitología.
- Morozova, O y cols. (2007).** Laccase-mediator systems and their applications: a review. *Appl Biochem Microbiol.* Vol. 43, pp 523-535.
- Roberts, SA y cols. (2002).** Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci.* Vol. 99, pp.2766-2771
- Santhanam, N y cols. (2011).** Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends Biotechnol.* Vol. 29, pp. 480-489.
- Sato, Y. y cols. (2001).** Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J Plant Res.* Vol.114, pp. 147-155.
- Smit, A.M., y cols. (2012).** Proteomic phenotyping of *Novosphingobium nitrogenifigens* reveals a robust capacity for simultaneous nitrogen fixation, polyhydroxyalcanoate production, and resistance to reactive oxygen species. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 78, pp. 4802-4815.
- Soares, G.M. y cols. (2001).** Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *J Biotechnol.* Vol. 89, pp. 123-129.
- Solomon, E.I. y cols. (2008).** Spectroscopic studies of perturbed T1 Cu sites in the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and *Rhus vernicifera* laccase: allosteric coupling between the T1 and trinuclear Cu sites. *Biochem.* Vol. 47, pp. 2036-2045.
- Somleva, M.N. y cols. (2013).** PHA bioplastics, biochemicals, and energy from crops. *Plant Biotechnol J.* Vol. 11, pp. 233-252
- Studier, F.W y cols (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* Vol. 189, pp. 113-130
- Ustun, G. y cols. (2007).** Regeneration of industrial district wastewater using a combination of Fenton process and ion exchange-A case study. *Resour, Conserv Recycling.* Vol. 52, pp. 425-440.
- Verma, A. y cols. (2012).** A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. *J. Environ Manage.* Vol. 93, pp. 154-168.

**Zaharia, C y cols. (2012).** Textile Organic Dyes – Characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents – A critical overview, in: Organic pollutants ten years after the Stockholm convention - *Environ Sci.* (Tomasz Puzyn and Aleksandra Mostrag-Szlichtyng, editores). InTech open (Croatia)

**Zinn, M. y cols. (2001).** Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliv Rev.* Vol. 53, pp. 5-21.

