

03072

12

2y



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

INGENIERIA DE SOLVENTES EN LA
BIOCATALISIS CON CITOCROMO C.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A
EDUARDO TORRES RAMIREZ

CUERNAVACA, MORELOS.

257660

1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el **Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la UNAM**, bajo la asesoría del **Dr. Rafael Vázquez Duhalt**.

La realización de los estudios de maestría, así como el desarrollo del presente trabajo fue posible gracias al apoyo económico otorgado por **DGAPA (IN214594/UNAM)**.

Indice General

	Página
Nomenclatura	
Resumen	1
1 Introducción	2
2 Antecedentes	
2.1 Las enzimas como catalizadores industriales	4
2.2 Oxidación biocatalítica de poliaromáticos por hemoproteínas	5
2.3 El citocromo c	20
2.4 Enzimología en medios no convencionales	23
2.5 Ingeniería de solventes	27
2.6 Modificación química e ingeniería genética de proteínas en medios no convencionales	34
3 Objetivos	
3.1 Objetivo general	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 Materiales y métodos	
4.1 Reactivos	39
4.2 Actividad específica	40
4.3 Diferencia de espectros	41
4.4 Determinación de la hidrofobicidad de los sustratos	41
4.5 Determinación de proteína	41
4.6 Determinación de actividad termodinámica	42
4.7 Estabilidad en fluidos supercríticos	43

4.8 Hidratación del citocromo c adsorbido	44
4.9 Actividad catalítica en microemulsiones	45
5 Resultados y discusión	
5.1 Estabilidad en condiciones supercríticas	47
5.2 Actividad en CO ₂ supercrítico	49
5.3 Actividad catalítica en microemulsiones	53
5.4 Sistemas monofásicos bicomponentes	59
6 Conclusiones	74
7 Referencias	75
8 Anexo I	
9 Anexo II	

NOMENCLATURA

ACN	Acetonitrilo
a_s	actividad de solvente
a_w	actividad de agua
C_{50}	Concentración de solvente a la cual la actividad catalítica disminuye a la mitad.
Cit-PEG-MET	citocromo c modificado con polietilenglicol en los aminos libres y metilado en los carboxilos libres.
Cit-PEG-TMS	Citocromo c modificado en sus aminos libres con polietilenglicol y sililado en los aminos, hidroxilos y carboxilos
CO ₂ SC	CO ₂ en estado supercrítico
CPO	Cloroperoxidasa
ΔG_{mez}	Energía libre de Gibbs de mezclado
EOH	Etanol
$E_r(30)$	Coefficiente de Dimroth-Reichard
FSC	Fluidos supercríticos
H	Hidrofobicidad
H ₅₀	Hidrofobicidad a la C ₅₀
HPA's	Hidrocarburos poliaromáticos
HRP	Horseradish peroxidasa (peroxidasa de rábano blanco)
ISO	Isopropanol

Log P	Logaritmo del coeficiente de partición en un sistema agua-1-octanol.
LPO	Lignina peroxidasa
MnP	Manganeso peroxidasa
MOH	Metanol
P.I.	Potencial de ionización
R_h	Radio hidrodinámico
T_c, P_c	Temperatura y presión crítica
THF	Tetrahidrofurano
W_o	[agua]/[surfactante]

Resumen

Se realizó un estudio de ingeniería de solventes con el citocromo c en tres sistemas de reacción: fluidos supercríticos, microemulsiones y sistemas monofásicos bicomponentes. El citocromo c es estable por lo menos durante 60 minutos en condiciones supercríticas (40°C;105 bares y 65°C;205 bares), pero no fue catalíticamente activo en la oxidación de pireno en CO₂ supercrítico en las mismas condiciones. En sistemas de microemulsiones, el citocromo c fue capaz de catalizar la oxidación de cloruro de pinacianol con peróxido de hidrógeno en bajos contenidos de agua (5% v/v). En los sistemas monofásicos bicomponentes la modificación biocatalítica de sustratos hidrofóbicos (pireno, cloruro de pinacianol, difenilamina, azul de bromofenol y tiantreno) por citocromo c es dependiente de la partición del sustrato entre el sitio activo de la hemoproteína y el solvente orgánico. Se usaron diferentes hemoproteínas como la cloroperoxidasa y la hemoglobina, así como una modificación química y dos modificaciones genéticas del citocromo c (citocromo c-PEG-MET, Phe82Gly y Lys79Ala, respectivamente), con el objetivo de mejorar la partición hacia el sitio activo. Al parecer, los cambios en hidrofobicidad de la cavidad cercana al sitio activo son insignificantes comparadas con los cambios en la hidrofobicidad del medio de reacción. Se propuso un nuevo parámetro de hidrofobicidad que predice la conducta catalítica del citocromo c y de la ligninasa con todos los sustratos y solventes utilizados. Este parámetro basado en la actividad termodinámica y en la polaridad del solvente, medido por el coeficiente de Dimroth-Reichard, es adecuado en la predicción de la conducta catalítica de otras hemoproteínas con actividad peroxidasa como la cloroperoxidasa, lactoperoxidasa y peroxidasa de rábano blanco.

1 Introducción

La enzimología en medios no convencionales es un nuevo campo de la biotecnología que ha abierto una gran variedad de posibilidades en la aplicación de las enzimas. Dentro de estos intereses se encuentra la posibilidad de modificar enzimáticamente sustratos hidrofóbicos e insolubles en medios acuosos.

Los hidrocarburos poliaromáticos son compuestos hidrofóbicos y tóxicos debido a su potencial como agentes mutagénicos y carcinógenos. Estos compuestos se encuentran en el petróleo y además se generan por la combustión incompleta de combustibles fósiles. Debido a su alta hidrofobicidad su biodegradación es difícil, siendo uno de los retos a superar el encontrar un medio de reacción adecuado que disminuya los problemas de transferencia de masa.

La biocatálisis en solventes orgánicos se presenta como una opción para la modificación de sustratos hidrofóbicos, ya que reduce las limitaciones de transferencia de masa. Sin embargo, la presencia de un solvente orgánico en el medio de reacción tiene repercusiones sobre el comportamiento de los biocatalizadores utilizados.

Por lo anteriormente expuesto, se planteó como una necesidad el realizar estudios de ingeniería de solventes para este tipo de reacciones, con el propósito de determinar el efecto de las propiedades termodinámicas del solvente sobre la biocatálisis. De esta manera se pretende encontrar un medio de reacción adecuado que permita tanto la

modificación de los hidrocarburos poliaromáticos como la permanencia activa del biocatalizador por largos periodos.

2 Antecedentes

2.1 Las enzimas como biocatalizadores industriales

La biocatálisis aplicada puede ser definida como la utilización de una molécula biológica para lograr una conversión deseada de un sustrato a un producto bajo condiciones controladas en un biorreactor. La biocatálisis aplicada tiene sus raíces en la China antigua y en Japón, en donde eran un arte más que una tecnología. Actualmente, las aplicaciones de las enzimas abarcan varios campos incluyendo la industria de detergentes, farmacéutica, analítica, textil, papel y pulpa, azucarera, café, alcohol, cervecera, ambiental, etc. en donde se les ha utilizado como biocatalizadores, como productos finales, como auxiliares de procesos, además de otros usos. En la tabla 1 se enlistan algunos ejemplos de enzimas utilizadas a nivel industrial.

El desarrollo en ventas de enzimas a nivel mundial ha tenido un crecimiento exponencial desde 1966, con ventas de cerca de un millón de dólares, hasta aproximadamente un billón de dólares americanos en 1990 (76).

El aumento considerable en las aplicaciones de las enzimas como biocatalizadores se ha debido, principalmente, a las ventajas que presentan sobre los catalizadores químicos convencionales, como son: alto poder catalítico, trabajan a condiciones suaves de presión, temperatura y pH, y ofrecen alta especificidad para los sustratos utilizados (dependiendo del medio de reacción). El principal requisito para que las enzimas se usen como biocatalizadores industriales es su estabilidad debido a su

contribución en los costos de producción. También son factores a considerarse los criterios de seguridad y aspectos legales.

Tabla I. Algunas enzimas actualmente utilizadas a nivel industrial

Enzima	Aplicaciones
α, β, Amilasas	cervecería, licores, detergentes
Celulasa	farmacéutica, textil, detergentes
Invertasa	edulcorantes
Papaína	cervecería, farmacéutica
Renina	quesería
Pancreatina	farmacéutica
Proteasa	detergentes
Lipasas	láctea, panificación
Glucosa oxidasa	alimentos, bebidas
Xilanasas	papelera
Pectinasas	cafetera
Raffinosa	azucarera

Tomada de la referencia 76

2.2 Oxidación biocatalítica de poliaromáticos por hemoproteínas

Los hidrocarburos poliaromáticos (HPA's) son constituyentes del petróleo crudo y de materiales derivados del carbón como la creosota o el alquitrán de hulla. Su dispersión en la atmósfera, suelos, superficies de agua y sedimentos, se debe principalmente a los derrames y a la combustión incompleta de combustibles fósiles. Los HPA's son compuestos contaminantes de importancia debido a sus potenciales efectos tóxicos y carcinogénicos (12,47,63,71). Numerosos son los estudios de los efectos de los HPA's en los diferentes organismos. Por ejemplo, se ha reportado

que el fenantreno, es tóxico para diatomeas marinas (43), gastrópodos (63), crustáceos (71) y peces (12).

Varios microorganismos han sido reportados como capaces de llevar a cabo la degradación de estos compuestos (11, 14,31). Griffoll et al. (31) reportaron que la bacteria *Pseudomonas cepacia* fue capaz de degradar HPA's en muestras de creosota conteniendo antraceno, naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno, acenafteno, pireno y carbazol, entre otros. Bogan et al. (14) reportaron la degradación de algunos HPA's por el hongo *Phanerocheate leavis* ; los autores determinaron que la velocidad de degradación era más alta que la reportada para el hongo *P. chrysosporium* utilizando los mismos sustratos. Bezalel et al. (11) reportaron que el hongo *Pleurotus ostreatus* puede degradar varios HPA's (como el fenantreno) produciendo varios metabolitos y CO₂. Otros sistemas de microorganismos reportados para degradar HPA's son *Pseudomonas stutzeri* (32) y *Mycobacterium sp.* (16).

La principal dificultad en la degradación de HPA's es su biodisponibilidad. Se sabe que mientras más alto sea el número de anillos bencénicos en un compuesto, disminuye la capacidad de los microorganismos de llevar a cabo su degradación. De esta manera, los HPA's de más de cinco anillos son considerados como recalcitrantes al ataque microbiano. Debido a su alta hidrofobicidad, los HPA's se encuentran en el ambiente adheridos a partículas y/o disueltos en bajas concentraciones por lo que su velocidad de degradación depende a su vez de la velocidad a la cual son desorbidos y disueltos en el medio (85).

Una manera efectiva de resolver el problema de la biodisponibilidad es usando un surfactante para disminuir la tensión superficial (aumentando el área de contacto) y facilitar con esto la solvatación de compuestos hidrofóbicos. La naturaleza del agente tensoactivo puede ser química o biológica, conocidos estos últimos como biosurfactantes. Grimberg et al. (32) reportaron la degradación de fenantreno por *P. stutzeri* logrando un aumento en la velocidad de disolución así como en la velocidad de degradación, utilizando un surfactante no iónico. Por otro lado, Volkering et al. (84) reportaron que la presencia de surfactantes no iónicos aumenta la microdispersión y disponibilidad a la degradación del fenantreno y del naftaleno por cepas bacterianas de *Pseudomonas*. Una forma adicional de disminuir los problemas de transferencia de masa en la degradación de HPA's es utilizando solventes orgánicos miscibles en agua (12). Sin embargo, estos sistemas son inadecuados para los microorganismos. El mayor campo de aplicación de sistemas con solventes orgánicos en la modificación de los HPA's radica en el uso de enzimas, principalmente peroxidasas y algunas hemoproteínas (7,61,75,81).

Las peroxidasas son enzimas que comparten la característica de poseer a la protoporfirina IX como grupo prostético. La principal función de estas enzimas es la oxidación de sustratos ligado a la conversión de H_2O_2 en H_2O . El intermediario enzimático de las peroxidasas, como la peroxidasa de rábano blanco (HRP), lactoperoxidasa y cloroperoxidasa formado durante la reacción con peróxido de hidrógeno ha sido descrito como **compuesto I**, que es una oxo(Fe^{IV})porfirina con un spin de electrones desapareado

asociado a cada anillo pirrónico o a algún residuo aminoácido de la periferia de la proteína. Para el caso de la HRP, en exceso de H_2O_2 y en presencia de un sustrato reductor, Arnao et al. (5) reportaron que el compuesto I puede llevar a dos posibles caminos, dependiendo de la reducción que tome este compuesto: si la reducción es por un electrón se produce el **compuesto II** y si es por dos electrones se obtiene la enzima en estado basal (figura 1).

En el figura 1 se muestra la ruta que sigue el compuesto II pasando al compuesto III (peroxiferroporfirina) al adicionarle H_2O_2 y la posterior liberación de O_2^- para dar nuevamente a la enzima en estado basal al reaccionar con el donador de electrones.

Como se muestra también en el figura 1 el compuesto I juega un papel central. Como se mencionó anteriormente, la reducción por uno o dos electrones permite oxidar algún sustrato, y además el H_2O_2 (que actúa como sustrato suicida de las peroxidasa) puede llevarlo hasta la inactivación de la enzima.

Al parecer, el camino propuesto en la figura 1 podría aplicarse a otras hemoenzimas como la manganeso peroxidasa, o la ligninasa que también son inactivadas por la presencia de H_2O_2 (3,81). Dos hemoproteínas con actividad peroxidasa, como la hemoglobina y el citocromo c, posiblemente sigan también el mismo mecanismo de reacción que la HRP (61,75).

El citocromo P_{450} es una familia de hemoproteínas presentes en todos los tipos de microorganismos. Sus funciones abarcan desde la síntesis de esteroides hasta la participación en procesos de desintoxicación. El citocromo P_{450} ha sido reportado como capaz de

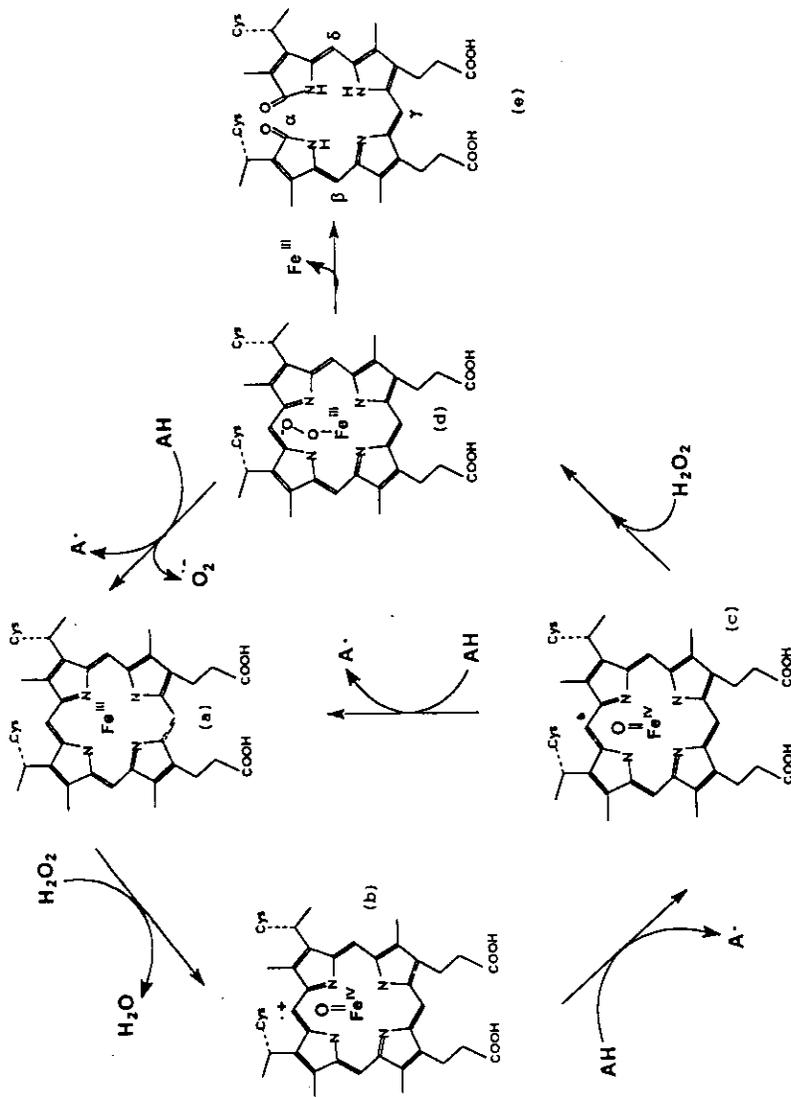


Figura 1. Ciclo catalítico de la protoporfirina IX al reaccionar con peróxido de hidrógeno en presencia de un sustrato reductor. (a) Grupo hemo nativo, (b) compuesto I (c) compuesto II, (d) compuesto III, (e) hemo inactivo.

modificar HPA's (6,45). King et al. (45) fueron los primeros en reportar la capacidad del citocromo P₄₅₀ purificado para formar un complejo con el benzo[a]pireno para llevarlo a una posterior hidroxilación. Además encontraron que era posible inducir una enzima más eficiente en su actividad benzo[a]pireno hidroxilasa de acuerdo con la presencia del sustrato poliaromático. En otras palabras, las constantes catalíticas (K_m y V_{max}) podían ser manejadas de acuerdo a la concentración de benzo[a]pireno en el medio de crecimiento.

El citocromo P₄₅₀ requiere, en forma natural, de un cofactor (NADPH) para su actividad; este requerimiento puede ser reemplazado si se utiliza un hidroperóxido como agente oxidante. En la tabla I se muestran los resultados de los cambios en las constantes catalíticas al reemplazar al cofactor por hidroperóxido de cumeno y peróxido de hidrógeno (45)

Tabla I. Actividad benzo[a]pireno hidroxilasa del citocromo P₄₅₀ de levadura en sistemas reconstituidos y artificiales

	K _m (μM)	V _{max} (min ⁻¹)
NADPH	33	0.0167
Hidroperóxido de cumeno	125	0.0219
H ₂ O ₂ <i>in situ</i>	200	0.0337

King et al. (45)

Tanto el peróxido de hidrógeno como el hidroperóxido de cumeno generaron velocidades de reacción más altas que el sistema soportado por el NADPH. Sin embargo, la afinidad por el sustrato

disminuye para ambos sistemas reflejada por un incremento en la constante de Michaelis-Menten. En los sistemas artificiales con hidroperóxidos hay una generación mayor de quinonas, fenoles y dioles (45).

Masaphy et al. (55) determinaron las constantes catalíticas de la actividad benzo[a]pireno hidroxilasa del citocromo P₄₅₀ en fracciones microsomales y citosólicas, utilizando NADPH como cofactor. Los valores de las constantes de Michaelis-Menten (K_M) fueron 200 μM y 667 μM para las fracciones microsomales y citosólicas, respectivamente. Estos valores fueron mucho más grandes que los reportados por King et al. (45) para el citocromo P₄₅₀ purificado en el mismo sistema. Seguramente las limitaciones difusionales presentes en las fracciones microsomales y citosólicas disminuyen la afinidad por el sustrato. Sin embargo, la V_{max} de los sistemas de Masaphy et al. (55) fueron considerablemente mayores (0.125 y 0.570 min^{-1} comparada con 0.0167 del citocromo P₄₅₀ purificado).

El citocromo P₄₅₀ ha sido sometido a modificaciones genéticas con el propósito de diseñar un biocatalizador con menor especificidad en la hidroxilación. Fowler et al. (27) reportaron que la sustitución de un sólo aminoácido del sitio activo del citocromo P₄₅₀ (Tyr96Ala) permite la oxidación de un nuevo sustrato, difenil metano, produciendo un compuesto p-hidroxilado. Modi et al. (57) reportaron que el citocromo P₄₅₀ era susceptible de ser modificado químicamente a través del reemplazo de su grupo hemo por otras ferroporfirinas. La reconstitución del citocromo P₄₅₀ con el grupo hemo esterificado generó un biocatalizador más

eficiente (50 veces más eficiente medido por el cociente k_{cat}/K_M) comparado con el citocromo P_{450} con su dominio del hemo sin modificar. Así mismo, esta modificación presentó una afinidad 4 veces mayor al sustrato utilizado, reflejada en la disminución de la constante de disociación.

La lignina peroxidasa es otra hemoproteína presente principalmente en los hongos lignolíticos y juega un papel importante en la degradación de la lignina. En presencia de H_2O_2 , la lignina peroxidasa (ligninasa) es capaz de catalizar la oxidación por un electrón de una variedad amplia de compuestos aromáticos para producir, como productos iniciales, radicales catiónicos que rápidamente son oxidados. Por ejemplo, Sanglard et al. (69) reportaron que la ligninasa es capaz de oxidar benzo[a]pireno *in vitro* en presencia de H_2O_2 , para dar lugar a tres productos de oxidación. La degradación *in vivo* del benzo[a]pireno lleva hasta la producción de CO_2 y otros metabolitos solubles en agua y en solvente orgánico. Hammel et al. (35) reportaron la oxidación de pireno por ligninasa en *N,N*-dimetilformamida produciendo principalmente 1,8 y 1,6 pirenodionas tanto *in vivo* como *in vitro*. También reportaron la capacidad de esta enzima para degradar 2-clorodibenzo[p]dioxinas y dibenzo[p]dioxinas.

Vázquez-Duhalt et al. (81) reportaron la oxidación *in vitro* de nueve compuestos poliaromáticos por ligninasa en sistemas que contenían solventes orgánicos miscibles en agua, para disminuir los problemas de transferencia de masa. En la tabla II se muestran los resultados de la actividad específica de la ligninasa junto con los potenciales de ionización de los HPA's. Como se muestra

en la tabla II, la ligninasa fue capaz de oxidar aquellos compuestos que tienen un potencial de ionización (P.I) menor a 8 eV produciendo los compuestos hidroxilados o cetónicos.

Tabla II. Actividad específica y potenciales de ionización de los HPA's en la oxidación con lignino peroxidasa.

Sustrato	Actividad específica	Potencial de ionización (eV)	
	(seg ⁻¹)	Transferencia de carga	Impacto electrónico
Pentaceno	N.O.E.	6.55	8.69
9-Metilantraceno	3.01	7.23	7.26
Carbazol	1.69	7.20	7.92
1-metilantraceno	1.62	N.D.	7.36
Pireno	0.33	7.72	7.45
Acenafteno	0.28	7.70	7.70
2-metilantraceno	0.25	7.40	7.35
Fluoranteno	0.15	7.76	8.15
Dibenzotiofeno	0.06	7.93	8.14
Criseno	N.R.	8.01	8.12
Fenantreno	N.R.	8.03	8.18
Trifenileno	N.R.	8.19	8.10
Naftaleno	N.R.	8.25	8.19
1-Metilnaftaleno	N.R.	8.50	7.97
Fluoreno	N.R.	8.52	8.03
1,3-Difenilpropano	N.R.	8.60	8.53
Dibenzofurano	N.R.	7.77	8.42
Bifenilo	N.R.	8.80	8.46
Difenilmetano	N.R.	9.00	8.60

Vázquez-Duhalt et al. (81)

N.O.E. No fue oxidación enzimática

N.R. no reaccionó

N.D. no disponible

Las constantes cinéticas para la oxidación de pireno fueron afectadas por la concentración de solvente orgánico en el medio, es decir, que el solvente orgánico permite que la interacción

sustrato-enzima se lleve a cabo pero tiene un efecto sobre el comportamiento de la enzima (81).

De estos resultados, los autores decidieron modificar a la ligninasa con el objetivo de construir un biocatalizador más activo y estable al solvente orgánico. Para este propósito hicieron reaccionar los grupos aminos libres de la enzima con polietilenglicol o por alquilación reductiva utilizando benzaldehído. El resultado fue una enzima con mayor hidrofobicidad superficial pero con una menor constante catalítica en la oxidación de pireno en ambos casos y su estabilidad ante el solvente orgánico no fue mejorada (81).

Otra hemoproteína que participa en la degradación de la lignina es la manganeso peroxidasa, la cual produce iones Mn^{+3} que son altamente reactivos. La habilidad del acetato mangánico de producir oxidaciones por un electrón de benzo[a]pireno y dibenzo[a]pireno y la habilidad de algunos sistemas $Mn(III)-H_2SO_4$ para oxidar algunos HPA's se ha tomado como base para sugerir que compuestos de esta naturaleza pueden ser sustratos también para la manganeso peroxidasa vía la acción de Mn^{+3} (13,15).

Bogan et al. (15) reportaron la oxidación *in vitro* de fluoreno por un sistema de peroxidación de lípidos dependientes de manganeso peroxidasa (MnP) de *P. chrysosporium*, dando lugar al mismo producto que se obtiene al utilizar el hongo completo en cultivo líquido. Bogan et al. (13) reportaron que en el sistema de peroxidación de lípidos dependientes de MnP se podía llevar a cabo la oxidación de diferentes HPA's de la creosota. El porcentaje de degradación presentó una buena correlación con el

potencial de ionización. En este sistema fue posible oxidar HPA's con altos potenciales de ionización (como fenantreno, trifenileno, y criseno), los cuales no son sustratos para la lignina peroxidasa; estos resultados sugieren que el posible mecanismo *in vivo* para estos sustratos sea similar al de peroxidación de lípidos mediados por manganeso peroxidasa (13).

El citocromo c es una hemoproteína con actividad peroxidasa capaz de catalizar la oxidación de algunos sustratos tóxicos como benceno, o-metoxifenol, compuestos heterocíclicos azufrados y compuestos poliaromáticos, en presencia de un agente oxidante como H₂O₂ (4,28,75,80). El citocromo c presenta varias ventajas como biocatalizador: es activo en un amplio rango de pH (de 2 a 11), tiene su grupo hemo covalentemente unido a la proteína (lo cual permite su permanencia en la proteína en presencia de solvente orgánico), es activo a altas concentraciones de solvente orgánico y es relativamente barato (75). El citocromo c fue capaz de oxidar compuestos organoazufrados como tiantreno, dibenzotiofeno y sulfuro de difenilo, entre otros, en un sistema que contenía 10% de dimetilformamida. Los productos formados fueron los respectivos sulfóxidos, compuestos más solubles y más fáciles de degradar (82). Torres et al. (75) determinaron la actividad catalítica del citocromo c en la oxidación de algunos hidrocarburos poliaromáticos. En la tabla III se reproducen los resultados reportados. El citocromo c fue capaz de catalizar la oxidación de cinco HPA's. La oxidación de HPA's por citocromo c no presentó una correlación con el potencial de ionización, como en el caso de la ligninasa. Por ejemplo, el citocromo c oxidó el

dibenzotiofeno (P.I. 7.93 ev) y no catalizó la oxidación de acenafteno, ni de fluoranteno (P.I. de 7.7 y 7.76 respectivamente).

Tabla III. Actividad específica del citocromo c de levadura en la oxidación de sustratos aromáticos.

Sustrato	Actividad específica (min ⁻¹)
Dibenzotiofeno	3.18 (± 0.11)
Antraceno	2.08 (± 0.13)
Pireno	1.28 (± 0.32)
Benzotiofeno	0.99 (± 0.23)
Carbazol	0.87 (± 0.11)
Fenantreno	N.R.
Criseno	N.R.
Fluoranteno	N.R.
Fluoreno	N.R.
Acenafteno	N.R.
Trifenileno	N.R.

Torres et al. (75)
N.R. no reaccionó

Con el objetivo de disminuir la especificidad del citocromo c, para aumentar el número de sustratos oxidados, así como el de aumentar la actividad catalítica, se le realizaron diferentes modificaciones químicas y genéticas. Akasaka et al. (4) inmovilizaron al citocromo c en poli-g-metil-L-glutamato dándole la capacidad de oxidar benceno en un sistema con bajo contenido de agua. La constante catalítica del citocromo c inmovilizado fue similar a la del citocromo P₄₅₀ y, al parecer, el mecanismo de reacción podría ser el mismo para ambas proteínas. Un ejemplo de la modificación de la actividad catalítica del citocromo c fue reportada por Fujita et al. (28); el citocromo c al ser unido a una bicapa de fosfolípidos aumentó considerablemente su actividad

para oxidar o-metoxifenol (10 veces más activo respecto al citocromo en forma libre) (28).

A través de modificaciones genéticas el citocromo c aumentó su eficiencia catalítica 10 veces, en un sistema con 10% de acetonitrilo, cuando el aminoácido Phe 82 fue sustituido por glicina (75). Al parecer, el aumento en la actividad catalítica se debe a un mayor acceso del sustrato al sitio activo del citocromo c (75).

La hemoglobina es otra hemoproteína que contiene cuatro grupos ferroporfirinas por molécula y es capaz de oxidar algunos sustratos poliaromáticos (61). En la tabla IV se muestran los resultados reportados por Ortiz-León et al. (61). La hemoglobina fue capaz de oxidar fluoreno (P.I. 8.52 eV), el cual no fue oxidado por ligninasa, ni por el citocromo c. La naturaleza de los productos indica que probablemente el mecanismo de reacción sea el mismo para las tres proteínas (61,75,81). La comparación de las constantes catalíticas en la oxidación del pireno por ligninasa, citocromo c y hemoglobina colocan a la primera como el mejor biocatalizador de HPA's (2.6 s^{-1} , 0.13 s^{-1} y 0.15 s^{-1} , respectivamente) (61,81).

Varias investigaciones se han realizado con ferroporfirinas que simulen el papel de las hemoproteínas. Estos sistemas son llamados biomiméticos y se han realizado con el propósito principal de esclarecer los mecanismos de reacción de las peroxidases (7,33,72).

Tabla IV. Oxidación biocatalítica de HPA's por hemoglobina y H₂O₂

Sustrato	Potencial de ionización (eV)	Reactivo reaccionado (%)
9-Hexilantraceno	ND	100.0
Antraceno	7.55	91.2 (± 4.4)
Carbazol	7.20	83.9 (±27.8)
Pireno	7.72	73.9 (± 0.9)
Dibenzotiofeno	7.93	48.9 (±30.7)
Fluoreno	8.52	N.R.
Acenafteno	7.70	N.R.
Criseno	8.01	N.R.
Dibenzofurano	8.77	N.R.
Fluoranteno	7.76	N.R.
Fenantreno	8.03	N.R.

Ortiz-León et al (61)

N.D. no disponible

N.R. no reaccionó

Azenbacher et al. (7) reportaron que el sistema tetrafenilferroporfirina/iodosil-benceno oxidaba 9-alkuil antracenos de una manera similar al sistema con citocromo P₄₅₀/iodosilbenceno y al sistema HRP/H₂O₂, dando lugar a los mismos productos de reacción. Habe et al. (33) encontraron que la hemina en presencia de peróxido de hidrógeno o hidroperóxido de terbutilo catalizaba el rompimiento del enlace C_α-C_β del propano 1,3 diol de la misma manera que lo hacía la ligninasa, produciendo p-anisaldehido. Estas reacciones fueron realizadas en dimetilsulfóxido o en 80% del mismo solvente en agua, y mostraban el mismo pH óptimo que para la ligninasa (pH 3). Shimada et al. (72) demostraron que el cloruro de tetrafenilferro(III)porfirina, en combinación con el hidroperóxido de terbutilo o iodosilbenceno,

rompía los enlaces $C_{\alpha}-C_{\beta}$ en las cadenas laterales de compuestos modelos de lignina de la misma manera que lo hace la ligninasa.

Torres et al. (75) reportaron que para que un grupo hemo pueda catalizar la oxidación del pireno necesita estar rodeado de un ambiente protéico adecuado, ya que ni la hemina, ni la microperoxidasa, ni la peroxidasa de rábano blanco fueron capaces de catalizar la oxidación de pireno en presencia de H_2O_2 .

Uno de los aspectos más importante a considerar al utilizar las hemoproteínas como biocatalizadores es su estabilidad ante peróxido de hidrógeno (3,5). Se sabe que las hemoproteínas o hemoenzimas se inactivan por la presencia de peróxido de hidrógeno (figura 1); es decir, el peróxido tiene un papel dual, es necesario para llevar a cabo la oxidación del sustrato, y su interacción con el grupo hemo puede llevar a la inactivación completa. Hasta el momento, la estabilidad ante H_2O_2 es el principal problema a resolver en la biocatálisis de poliaromáticos por hemoproteínas y aunque el problema ya se ha abordado haciendo uso de técnicas de modificación química y genética (75,79), la estabilidad de las hemoproteínas o hemoenzimas es aun muy baja.

Por lo anteriormente expuesto, podemos decir que la modificación biocatalítica de hidrocarburos polinuclearomáticos por hemoproteínas se presenta como una alternativa interesante para la disminución de la toxicidad de estos compuestos. La naturaleza de los productos es de una mayor facilidad a la degradación posterior por bacterias u otros microorganismos y su

toxicidad es cientos de veces inferior siendo muchos de ellos no mutagénicos (24) (tabla V).

Tabla V. Concentración mínima mutagénica de hidrocarburos poliaromáticos y sus respectivas quinonas.

Compuesto	CMC* (ng/ml)
Ciclopenta(cd)pireno	1.8
Ciclopenta(cd)pireno-3-diona	2600
Fenantreno	N.M.
Fenantrenodiona	N.M.
Benzo[a]antraceno	570
Benzo[a]antracenodiona	N.M.
Criseno	750
Criseno quinona	N.M.
Benzo[a]pireno	14
1,6-Benzo[a]pirenodiona	N.M.
3,6-Benzo[a]pirenodiona	N.M.
4,5-Benzo[a]pirenodiona	N.M.

Durant et al. (24)

* Concentración mínima carcinógena

N.M. No mutagénica

2.3 El citocromo c

El citocromo c es una proteína mitocondrial cuya función es transferir electrones en la cadena respiratoria del complejo citocromo c reductasa al complejo citocromo c oxidasa. El citocromo c consta de alrededor de 105 aminoácidos, de los cuales el 39% se encuentra formando α -hélices, y tiene un peso molecular aproximado de 12500 Da.

Los citocromo c contienen un grupo hemo como sitio activo (protoporfirina IX, figura 2) covalentemente unido a la proteína y

que está rodeado de los aminoácidos hidrofóbicos. Un número considerable de secuencias primarias de citocromo c de muchas especies, así como algunas estructuras tridimensionales son conocidas (17,52,56). También existen en la literatura estudios realizados para conocer la función de algunos de sus aminoácidos en la transferencia de electrones (20,50,51,64). El grupo hemo del citocromo c está unido covalentemente a la proteína a través de enlaces tioeter a los grupos sulfhidrilo de las cisteínas 14 y 17. Además está unido por enlaces de coordinación a la histidina 18 y metionina 80. Los citocromos c son capaces de transferir electrones por un cambio reversible en el estado redox del hierro del grupo hemo entre las valencias Fe II y Fe III (62).

El citocromo c ha sido utilizado como biocatalizador en la modificación de sustratos hidrofóbicos como son los compuestos organoazufrados, dando como productos al respectivo sulfóxido (80); los hidrocarburos poliaromáticos (75) para producir cetonas o quinonas; benceno, dando lugar al fenol (4) y guaiacol, produciendo polímeros del sustrato (28). El citocromo c presenta actividad de peroxidasa mostrando una buena actividad catalítica al compararla con otras hemoproteínas como la hemoglobina y el citocromo P₄₅₀ (61); sin embargo, al compararla con verdaderas peroxidasas (como la ligninasa y la de rábano blanco) su eficiencia catalítica es considerablemente menor; por lo que al citocromo c se le ha modificado tanto química (79) como genéticamente (75) con el propósito de aumentar su actividad y estabilidad así como mejorar su capacidad como biocatalizador de otras reacciones en sistemas conteniendo solventes orgánicos.

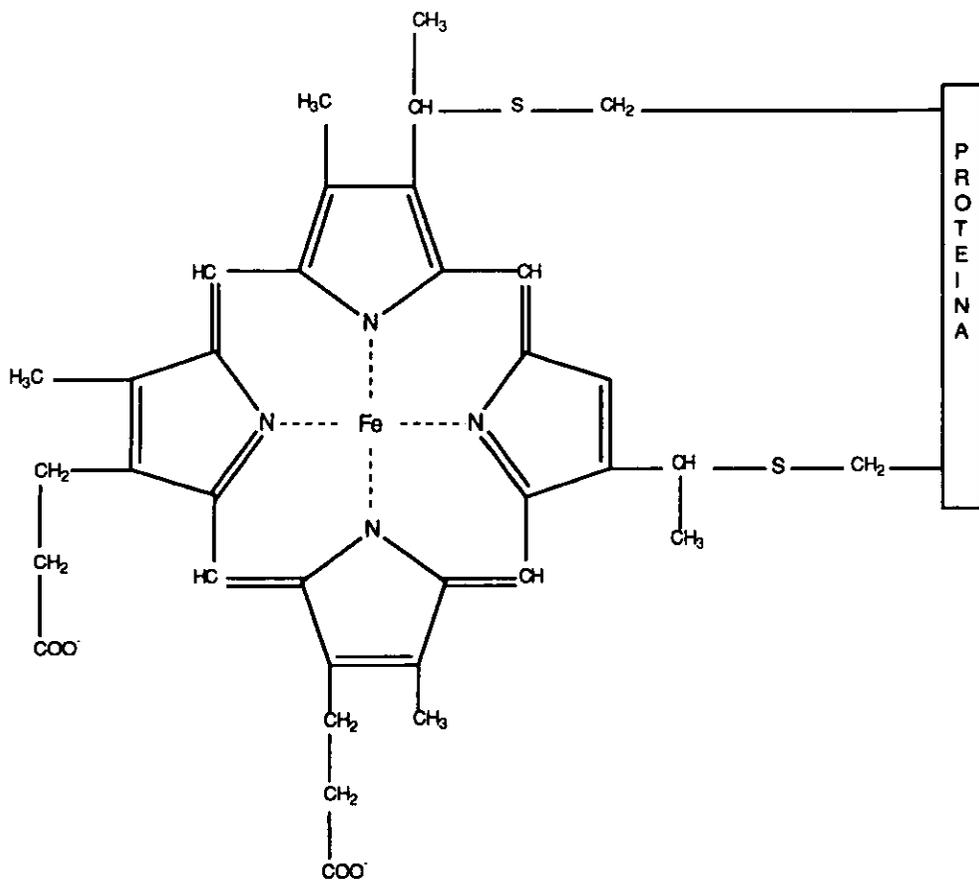


Figura 2. Protoporfirina IX . Sitio activo del citocromo c

Dentro de sus desventajas, la principal de ellas es su inestabilidad ante peróxido de hidrógeno (75,80), como se muestra en la figura 5, lo cual obliga a realizar investigaciones

dirigidas a mejorar su estabilidad si es que se pretende aplicarlo a gran escala.

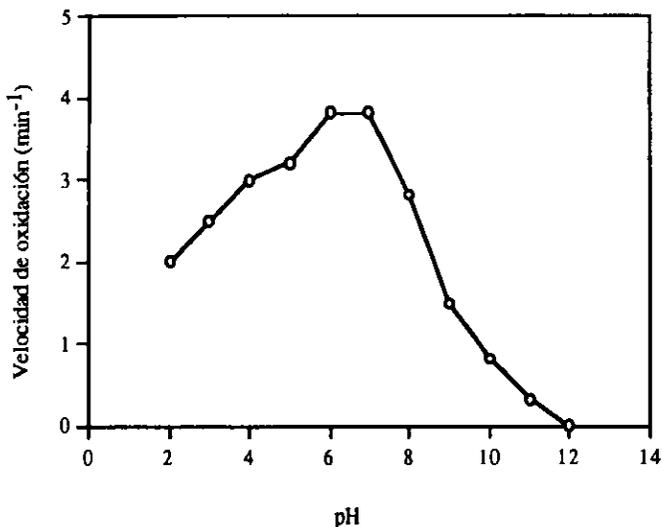


Figura 3. Efecto del pH sobre la velocidad de oxidación de dibenzotiofeno por citocromo c y peróxido de hidrógeno. Obtenido de la referencia 80.

2.4 Enzimología en medios no convencionales

Un gran número de enzimas han sido capaces de llevar a cabo reacciones en sistemas con solventes orgánicos (22). Se le ha llamado recientemente enzimología en medios no convencionales a la aplicación de enzimas en sistemas que contienen un solvente orgánico o que se realizan en sistemas no completamente acuosos.

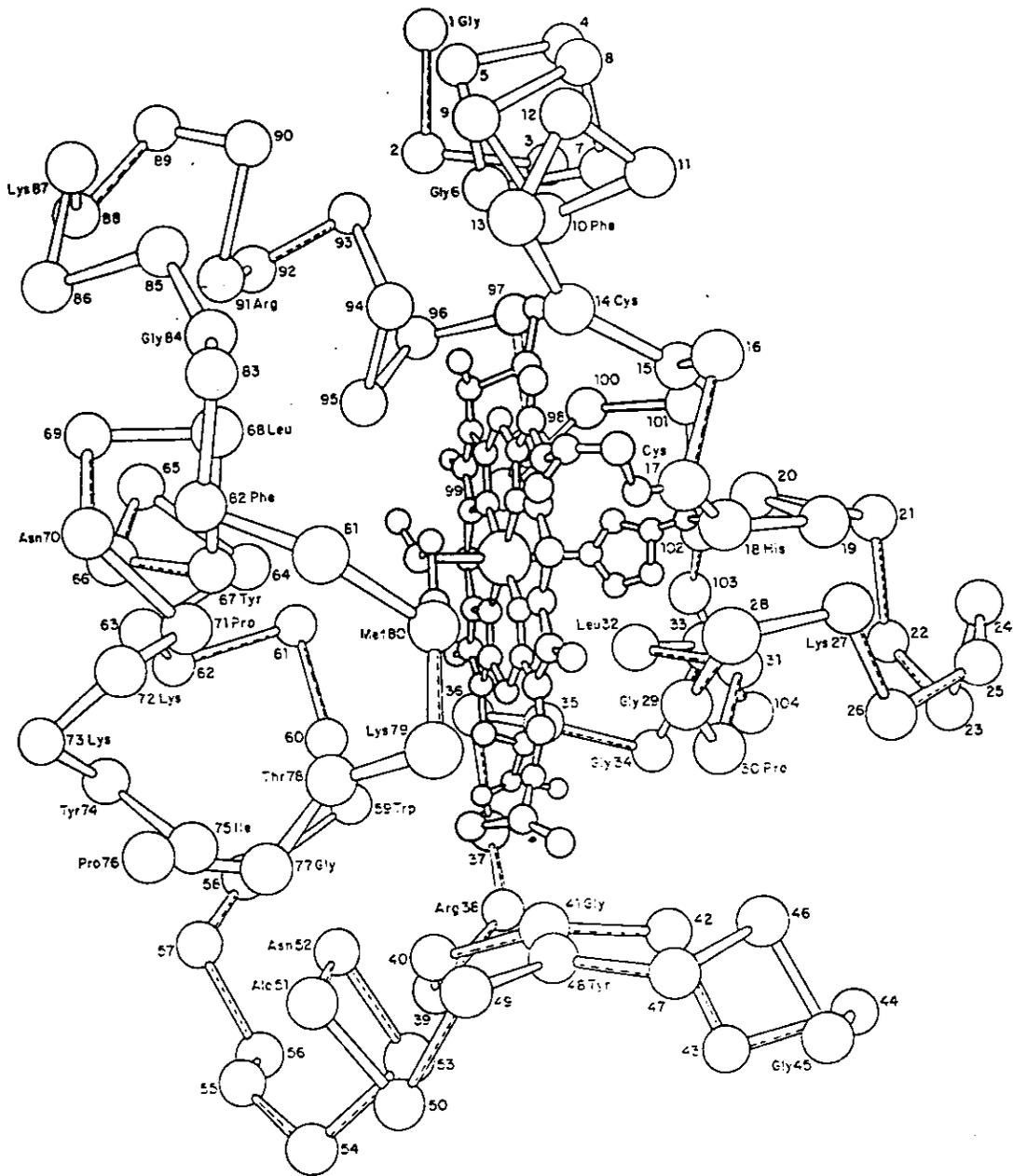


Figura 4. Representación de la molécula de citocromo c

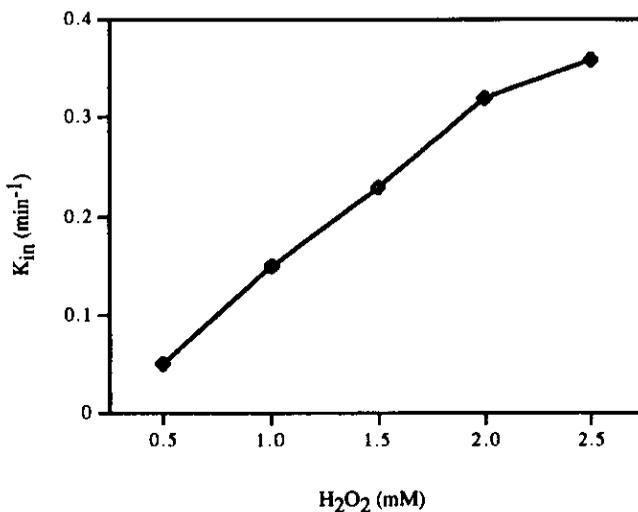


Figura 5. Efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno sobre la estabilidad del citocromo c. Obtenido de la referencia 79.

En la tabla VI se muestran ejemplos de enzimas y reacciones en este tipo de medios. Desde un punto de vista biotecnológico, existen numerosas ventajas al utilizar enzimas en medios no acuosos, entre ellas están: aumento de la solubilidad de sustratos no polares, como en la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos (61); ajuste del equilibrio termodinámico en favor de la síntesis sobre la hidrólisis, como en la síntesis de péptidos por lipasas (46); aumento en la termoestabilidad de la enzima, como el caso de lipasas que se mantienen estables por largo tiempo a 100 °C (90); la inmovilización de las enzimas muchas veces es innecesaria, por ejemplo la oxidación de alcohol por alcohol deshidrogenasa (88); la recuperación del producto es relativamente más fácil al

utilizar solventes de bajo punto de ebullición, como en la síntesis de acrilatos por lipasas en fluidos supercríticos (41); y puede existir un cambio significativo en la selectividad, regioselectividad y enantioselectividad de la enzima, como en la transesterificación de fenilfenol por subtilisina (26), etc.

Para que exista actividad biocatalítica se requiere de una cantidad mínima de agua. La cantidad indispensable requerida depende de cada enzima y el medio en que se encuentre (89). Las evidencias recientes sugieren que se necesita que los residuos aminoácidos cargados sean solvatados por el agua para que la enzima sea catalíticamente activa (89).

Por ejemplo, la α -quimotripsina se mantiene activa (en un sistema con butano) con tan solo 50 moléculas de agua por molécula de enzima, mientras que otras enzimas hidrolíticas como subtilisina y varias lipasas a menudo requieren concentraciones mucho menores (23). Esta concentración de agua es desde luego dependiente del tipo de solvente utilizado, como más adelante se explica.

La naturaleza del solvente puede afectar a la catálisis enzimática en tres formas diferentes: primero, el solvente puede causar inhibición o inactivación por interacción directa con la enzima, al destruir los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, o simplemente cambiando la constante dieléctrica del ambiente. Segundo, el solvente puede afectar la interacción del sustrato y del producto con el sitio activo de la enzima. Finalmente, el solvente puede interactuar directamente con las moléculas de agua esenciales para la enzima (37, 48,53,58).

Tabla VI. Reacciones enzimáticas en sistemas con solventes orgánicos

Reacción	Enzima	Medio
Oxidación de colesterol	colesterol oxidasa	tolueno
Oxidación de alcoholes	alcohol deshidrogenasa	éter
Oxidación de fenoles	peroxidasa de rábano	dioxano
Hidrólisis de sacarosa	levansacarasa	acetoni- trilo
Síntesis de péptidos	quimotripsina	dimetil- formamida
Resolución de mezclas racémicas	lipasas	heptano
Condensación de glucosa	glucoamilasa	etilen- glicol
Síntesis de sacarosa	invertasa	butanol
Síntesis de poliésteres	lipasas	éter

Tomada de la referencia 22

Todo esto nos lleva a la necesidad de estudiar en forma profunda el efecto de la naturaleza del solvente, que principalmente se ha hecho a través de parámetros termodinámicos, sobre el comportamiento biocatalítico de la enzima.

2.5 Ingeniería de solventes

La selección del mejor solvente para una reacción dada depende de varios factores como la compatibilidad del solvente con la reacción de interés, se deberá tomar en cuenta que la partición de los sustratos y productos no causen inhibición de la enzima al

ser retenidos cerca del sitio activo (70,86). Otros factores a considerar son: que el solvente sea inerte, lo menos tóxico posible, disponible, de bajo costo y principalmente que afecte lo menos posible a la estructura de la enzima. Sin embargo, la selección del solvente a utilizar es, hasta la fecha, realizada en forma más bien empírica.

Numerosos estudios se han realizado con el propósito de encontrar las características fisicoquímicas de los medios de reacción, o de algunas de las partes que los constituyen, que ayuden a explicar el comportamiento biocatalítico de las enzimas en medios no convencionales y que ayuden a predecir el comportamiento en medios aun no ensayados (18,41,44,48,73).

El trabajo pionero sobre el efecto de los solventes orgánicos en la biocatálisis fue realizado por Laane et al. (48). Ellos concluyeron que los solventes más apropiados para la actividad catalítica son aquellos con un $\log P > 4$ (donde P es el coeficiente de partición entre 1-octanol y agua), los solventes con un $\log P$ entre 2 y 4 son de comportamiento impredecible y aquellos con un $\log P < 2$ no son adecuados para la biocatálisis debido a que estos pueden competir por el agua necesaria para la conformación de la enzima.

Yang et al. (86) encontraron que la polaridad del sustrato y producto tienen que tomarse en cuenta en la correlación propuesta por Laane et al. (48). Los autores propusieron que para sustratos polares los solventes más adecuados son los que tienen un $\log P$ menor a 2 y para solutos apolares los mejores solventes son aquellos con un $\log P$ mayor a 4.

Otros muchos estudios se han llevado a cabo con el fin de explicar mediante parámetros fisicoquímicos (constante dieléctrica, coeficientes de solubilidad, parámetros de solvatación, etc.) y estructurales (fluorescencia de proteínas) el comportamiento de las enzimas (cambios en la especificidad, actividad, selectividad, etc.) (26,44,67).

Por ejemplo, Fitzpatrick et al. (26) observaron que la enantioselectividad, medida como un coeficiente que relaciona las constantes cinéticas $(k_{cat}/K_M)_S / (k_{cat}/K_M)_R$, donde el subíndice S y R denotan a los enantiómeros S y R, de la subtilisina disminuyó cuando la constante dieléctrica del solvente aumentó en la resolución del (\pm)1-fenil-etanol por la transesterificación con butirato de vinilo. Ellos argumentaron que la disminución en la flexibilidad de la enzima, al colocarla en solventes de baja constante dieléctrica, fue la causa del cambio en la selectividad.

La actividad específica del citocromo c mostró una correlación con el coeficiente de Dimroth-Reichard para varios solventes miscibles en agua, dando como resultado que los mejores solventes para esa reacción son aquellos con coeficientes cercanos al del agua (79). El coeficiente de Dimroth-Reichard es un parámetro de solvatación basado en la energía de banda de la transferencia de carga de un compuesto en diferentes solventes (66).

Rossell et al. (67) reportaron que la tendencia a la desnaturalización de proteínas por mezclas acuosas de solventes orgánicos podía ser predecible con base en los cambios de solubilidad de un sustrato hidrofóbico. Ellos utilizaron al

naftaleno como sustrato y midieron sus cambios en la solubilidad al incrementar la concentración del solvente, así como al cambiar el tipo de solvente utilizado. Al correlacionar estos resultados con la C_{50} (concentración de solvente a la cual se obtiene la mitad de la actividad máxima) de varios biocatalizadores como mioglobina, tripsina, quimotripsina, citocromo c y lacasa encontraron buenas correlaciones, apoyando la tesis que la desnaturalización por solventes orgánicos tiene que ver con la disminución del efecto hidrofóbico.

Kijima et al. (44) utilizaron los cambios estructurales de la α -quimotripsina, medidos como los cambios en la longitud de onda de emisión máxima, provocados por la presencia de solventes miscibles en agua, para correlacionarlos con la actividad catalítica en la hidrólisis de ésteres. Los resultados arrojados (para solventes como tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, dimetilformamida, etanol y acetonitrilo) mostraron buenas correlaciones, concluyendo con esto que los cambios estructurales de la enzima eran los principales responsables de los cambios en la actividad catalítica

Como se mencionó anteriormente un aspecto que se debe considerar en la biocatálisis con solventes orgánicos es el contenido de agua. Se sabe que la enzima necesita cierta cantidad de agua para mantener su conformación activa. En estos tipos de sistemas existe una cierta competencia por agua entre la enzima, el solvente, el sustrato, el producto y el soporte. Por lo anterior, es recomendable utilizar como parámetro de contenido de agua a la actividad termodinámica, que nos indica la

disponibilidad real del agua para la enzima y es un valor igual en todas las fases del sistema. Valivety et al. (77) correlacionaron la actividad del agua con la velocidad de reacción de transesterificación por una lipasa, en diferentes solventes orgánicos, y concluyeron que existe una actividad de agua óptima para la velocidad de síntesis y que es independiente del solvente orgánico utilizado.

Se ha adoptado el término de **INGENIERÍA DE SOLVENTES** (23,34) para definir el estudio de las características termodinámicas de los sistemas de reacción que influyen el comportamiento de las enzimas en medios no convencionales. La ingeniería de solventes extiende su campo, no solo a los sistemas monofásicos y bifásicos, sino también a los sistemas de microemulsiones y fluidos supercríticos.

Los fluidos supercríticos (FSC) son materiales condicionados arriba de sus condiciones críticas (T_c, P_c) que han demostrado ser medios de reacción apropiados para la biocatálisis y sus propiedades termodinámicas los asemejan a los solventes orgánicos convencionales, con características adicionales de gran interés para la investigación (39,59).

Este tipo de sistemas, como ha sido reportado por Sanjay et al. (41), son muy atractivos para hacer ingeniería de solventes, es decir, para el estudio de la relación ambiente-estructura-función, ya que es posible manipular las características termodinámicas de estos medios con cambios en la presión y/o temperatura.

Aparte de esta propiedad importante, los fluidos supercríticos presentan características adicionales a los solventes orgánicos que aumentan su atractivo como medios de reacción para la biocatálisis. Entre ellas están la de tener coeficientes de difusión similares a los de los gases, su tensión superficial es de casi cero, viscosidad del orden de magnitud de los gases y una densidad similar a la de los líquidos. Por todo lo anterior, la biocatálisis en fluidos supercríticos es muy atractiva para el estudio de la enzimas en medios no acuosos.

En la tabla VII se muestra un pequeño listado de reacciones enzimáticas en condiciones supercríticas. Como se muestra en la tabla, el CO₂ ha sido el medio más utilizado para reacciones en condiciones supercríticas. Varios son los motivos: el CO₂ tiene condiciones críticas relativamente bajas ($T_c = 31\text{ }^\circ\text{C}$ y $P_c = 0.38\text{ Mpa}$), es un material no tóxico, relativamente barato e inerte a los productos y sustratos. Sin embargo, Sanjay et al. (40) reportaron que el CO₂ es capaz de inhibir la actividad de las enzimas al formar carbamatos cuando este reacciona con los grupos aminos libres de los residuos aminoácidos. Los autores concluyeron que lo más adecuado para seguir trabajando con el CO₂ es utilizar temperaturas arriba de los 60 °C para evitar la formación de carbamatos y así aprovechar las ventajas de este fluido.

Otros materiales han sido probados en condiciones supercríticas como medios de reacción con el fin de mejorar la actividad y estabilidad de algunas enzimas. El uso de etano, propano, fluoruro de azufre y hexafluoruro de azufre en condiciones supercríticas como medio de reacción para síntesis de acrilatos

por la lipasa de *Candida cylindracea* ha sido reportado (41). Por los resultados obtenidos, el fluoroforno aparece como un buen material para estudios de ingeniería de solventes debido a que presenta los cambios mas evidentes en sus propiedades termodinámicas al alterar la presión del sistema. Sin embargo estos materiales reportados presentan la desventaja de ser tóxicos, explosivos o de empleo muy delicado por lo que sus estudios a nivel tanto investigación como industrial son limitados.

Tabla VII. Reacciones enzimáticas en fluidos supercríticos

Reacción	Enzima	Medio de reacción y condiciones
Acidólisis de treolina	lipasa	CO ₂ , 50°C, 100 atm
Oxidación de colesterol	colesterol oxidasa	CO ₂ , 35°C, 100 atm
Transesterificación de ácido palmítico	lipasa	CO ₂ , 40°C, 28 MPa
Alcoholólisis de acetato de etilo	mirosinasa	CO ₂ , 60°C, 100 b
Esterificación de ácido oléico	lipasa	CO ₂ , 40°C, 13 MPa

Tomada de las referencias 39 y 59.

Otro sistema que se ha empleado con éxito en la biocatálisis en medios no convencionales son las microemulsiones sin detergente (42). Este tipo de microemulsiones son dispersiones de gotas de agua en un solvente apolar, los cuales son termodinámicamente estables y ópticamente transparentes. La gotas están estabilizadas

por moléculas de alcohol adsorbidas en su superficie y poseen simetría esférica. Los diámetros de las gotas están en el rango de 50 a 300 Å dependiendo de la composición del sistema (relación agua/alcohol), lo que provee un microambiente en el cual las enzimas se pueden solubilizar reteniendo su actividad catalítica. Este sistema es similar al de micelas invertidas, pero presenta la ventaja de eliminar el problema de la presencia de surfactantes lo que facilita la recuperación de la enzima y la purificación de los productos .

Khmelnitsky et al. (42) reportaron que la colesterol oxidasa es capaz de oxidar a su sustrato natural, el colesterol, en un sistema agua/hexano/isopropanol. Fedorak et al. (25) reportaron la modificación de petroporfirinas y asfaltenos catalizada por cloroperoxidasa en un sistema agua-isopropanol-tolueno, manejando bajos contenidos de agua de hasta el 5%.

Los sistemas de microemulsiones han sido muy estudiados tanto termodinámica como estructuralmente, así como el efecto de estos en la cinética y estabilidad de las enzimas. Es oportuno mencionar que son los sistemas más complejos de la biocatálisis en medios no convencionales (19,29,60).

2.6 Modificación química e ingeniería genética de proteínas en medios no convencionales

Los métodos de modificación química e ingeniería genética de proteínas han sido propuestos para la biocatálisis en medios no acuosos como una opción más para mejorar la actividad y estabilidad enzimática (37,53)

Yoshimoto et al. (74) modificaron a la peroxidasa de rábano blanco al unir covalentemente polietilenglicol derivatizado de peso molecular 5000 Da a sus grupos aminos libres. La enzima modificada fue soluble en solventes orgánicos polares y apolares, y retuvo su capacidad catalítica. Dada la naturaleza anfipática del polietilenglicol, la cantidad de agua requerida por esta enzima es menor que la requerida por la forma nativa.

La inmovilización de una proteína puede cambiar su comportamiento catalítico en solventes orgánicos y acuosos (2,4). La naturaleza del soporte en el cual las enzimas son inmovilizadas puede afectar tanto sus constantes cinéticas como su estabilidad, dependiendo también este efecto del tipo de solvente utilizado. Por ejemplo, los soportes hidrofílicos impiden que los sustratos hidrofóbicos lleguen con facilidad al sitio activo para su posterior transformación a productos y, por tanto, la K_m de sustrato aumenta, ocasionando la disminución de la eficiencia catalítica; además, el soporte hidrofílico puede competir por el agua necesaria para que la enzima sea activa (2).

Adlercreutz (2) inmovilizó a la α -quimotripsina en varios soportes de diferente aquafilicidad (relación contenido de agua del soporte/contenido de agua del medio) para estudiar el efecto de la naturaleza del soporte sobre la actividad de esta enzima en la esterificación del N-acetil fenilalanina con etanol. El resultado logrado indicó que los soportes con baja aquafilicidad eran mejores para la esterificación con α -quimotripsina. Este resultado sugiere que el soporte y la enzima compiten por el agua disponible en el medio, por lo cual, los soportes con baja

aquafilicidad permiten que la enzima se hidrate suficientemente mostrando así buena actividad catalítica.

Las enzimas pueden ser rediseñadas para permitir la catálisis en medios no acuosos a través de la ingeniería de proteínas, alterando con esto sus propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas, adaptándose mejor al nuevo sistema de reacción (37).

Los solventes polares representan un medio de reacción adecuado para muchas aplicaciones industriales y de síntesis. Desafortunadamente, existe una relación directa entre la actividad enzimática y la polaridad del solvente que indica que los solventes polares no son muy adecuados para la biocatálisis (23,48). Este efecto nocivo de los solventes polares sobre las proteínas no es de sorprenderse, debido a que las enzimas no fueron diseñadas naturalmente para trabajar en esos medios. Las interacciones no covalentes que determinan la estabilidad de la enzima alcanzarán un nuevo equilibrio en un sistema orgánico que puede resultar en la pérdida de actividad catalítica y en algunos casos en el plegamiento (37,53). Sin embargo, el empleo de la modificación en la secuencia de aminoácidos de la proteína, que se presenta como una herramienta de fácil acceso hoy en día, puede resultar en una redistribución de las interacciones críticas y por lo tanto compensar los efectos desfavorables por el cambio de ambiente de la enzima. El resultado final podría ser una variante de enzima que exhiba una mayor estabilidad y/o actividad en el medio nuevo (37).

La modificación en la secuencia de aminoácidos deberá, si es que se pretende obtener una variante catalíticamente mejor, bajar la energía libre de la forma activa o aumentar la de la forma inactiva, en presencia del solvente. Para lograrlo pueden emplearse algunas reglas de diseño reportadas en la literatura (53), entre las que destacan las siguientes: remoción de cargas superficiales, introducir nuevos puentes disulfuro, introducir o mejorar los puentes de hidrógeno existentes y otras interacciones electrostáticas, incrementar las interacciones de van der Waals, etc.

Por ejemplo, Martinez et al. (53) mejoraron la estabilidad de la α -lícoproteasa en la síntesis de péptidos en dimetilformamida, al sustituir aminoácidos superficiales cargados por aminoácidos hidrofóbicos, disminuyendo con esto la necesidad de agua por la enzima y aumentando la compatibilidad de la misma con el solvente orgánico. Los autores aclararon que los efectos de las mutaciones sobre la estabilidad no podrían ser explicados unicamente por estos argumentos, sino que otras interacciones pueden estar presentes.

Por lo anteriormente expuesto, es evidente que existe la necesidad de estudios de ingeniería de solventes que ayuden a conocer y establecer los principios de la enzimología en medios no convencionales. Para lo cual nos hemos propuesto los siguientes objetivos para el presente trabajo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Estudiar el efecto de tres sistemas de reacción (sistema monofásico de bicomponentes, microemulsiones y fluidos supercríticos) sobre el comportamiento biocatalítico del citocromo c en la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos, principalmente, y correlacionar su comportamiento con parámetros termodinámicos que describen a cada sistema.

3.2 Objetivos específicos

1) Ensayar diferentes sustratos para determinar el efecto de la hidrofobicidad de los mismos en la biocatálisis con citocromo c en sistemas con solventes miscibles en agua de hidrofobicidad variable como acetonitrilo, tetrahidrofurano, isopropanol, metanol y etanol.

2) Determinar el efecto de la actividad de agua y la actividad del solvente en la biocatálisis en sistemas monofásicos bicomponentes con citocromo c

3) Determinar el efecto del contenido de agua en la actividad catalítica del citocromo c en microemulsiones agua/isopropanol/hexano, agua/isopropanol/gasolina blanca y agua/isopropanol/tolueno.

4) Estudiar el efecto de las variaciones en presión y temperatura del CO₂ en estado supercrítico sobre la catálisis con citocromo c.

4 Materiales y métodos

4.1 Reactivos

El citocromo c de corazón de caballo, el iso-1-citocromo c de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, hemoglobina humana y la cloroperoxidasa del hongo *Caldaromyces fumago* fueron compradas a Sigma Chemical Co. La ligninasa fue comprada a Tienzyme Inc. El cloruro de pinacianol, pireno, tiantreno y la difenilamina se obtuvieron de Aldrich Chemical Co. El azul de bromofenol se compró a Bio-Rad. El peróxido de hidrógeno y las sales para la preparación de los amortiguadores se compraron a T.J. Baker. Los solventes orgánicos, todos grado HPLC, como el tolueno, isopropanol, acetonitrilo, hexano, tetrahidrofurano, metanol, etanol fueron marca Merck. El tetrahidrofurano (THF) fue destilado en presencia de sulfato ferroso antes de su uso para evitar la presencia de peróxidos.

El citocromo c fue modificado con polietilenglicol activado como ha sido reportado previamente (79). Como producto de las investigaciones hechas en nuestro laboratorio, contamos además dos modificaciones químicas del citocromo c que son catalizadores con una menor especificidad en la oxidación de HPA's, además de ser más estables en solventes orgánicos que la proteína nativa. Estas modificaciones químicas fueron llamadas citocromo-PEG-MET y citocromo-PEG-TMS, ya que fueron modificadas primero con polietilenglicol (en sus grupos aminos libres) y metiladas (en los carboxilos de los grupos propionatos del hemo y los carboxilos libre de la proteína), en el primer caso; y sililadas (en los grupos oxidrilos, aminos y carboxilos libres de la proteína), en

el segundo caso. Las variantes genéticas fueron obsequiadas por el Dr. A. Grant Mauk, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de British Columbia, Canadá.

4.2 Actividad específica

La determinación de las actividades específicas del citocromo c y las diferentes hemoproteínas, así como de las variantes genéticas y químicas del citocromo c fueron realizadas espectrofotométricamente, siguiendo la disminución en la absorbancia del sustrato, en la longitud de onda adecuada para cada uno de ellos. El volumen de reacción fue de 1 ml en una celda de cuarzo que contenía a los sustratos en una concentración 20 μM (excepto para el cloruro de pinacianol la cual fue de 13 μM) en diferentes proporciones de solvente orgánico en buffer. El buffer utilizado en cada caso fue para el citocromo c y la hemoglobina fosfatos 60 mM pH 6.1, citratos 60 mM pH 3 para la cloroperoxidasa y acetatos 60 mM pH 4 para la ligninasa. La reacción dió inicio con la adición de H_2O_2 a una concentración 1 mM, excepto para la ligninasa y la cloroperoxidasa a las que se les adicionó 30 μM y 250 μM respectivamente. El control consistió del mismo medio de reacción en ausencia de las hemoproteínas.

El equipo utilizado fue un espectrofotómetro Beckman DU-650. Para el cálculo de la actividad específica se utilizaron los coeficientes de extinción de cada sustrato, los cuales son (en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 82350 a 603 nm para el cloruro de pinacianol; 32600 a 335 nm para el pireno; 35000 a 254 nm para el tiantreno; 77240 a 595

nm para el azul de bromofenol y 113600 a 279 nm para la difenilamina.

4.3 Diferencia de espectros

La detección de la interacción del citocromo c con dos sustratos, pireno y tiantreno, se hizo midiendo el cambio en el espectro del citocromo c, en ausencia y presencia del sustrato. La celda de cuarzo contenía al sustrato a una concentración 40 μM en diferentes proporciones de THF en buffer de fosfatos y 5 μM de proteína. El espectro control fue el del citocromo c en ausencia del sustrato. La diferencia de espectros fue detectada en un espectrofotómetro Beckman DU 650 en el rango de 350 a 450 nm.

4.4 Determinación de la hidrofobicidad de los sustratos

La hidrofobicidad de los sustratos se estimó como el tiempo de retención, o elución, en una columna C_{18} 5 micro (3.9 x 150 mm) fase reversa en un sistema HPLC de Waters con un detector UV-visible. La fase de elución fue de una mezcla acetonitrilo-agua (60:40 v/v) con un flujo de 1 ml/min.

4.5 Determinación de proteína

La concentración de proteína fue determinada por el método de Bio-Rad utilizando una curva estándar de proteína de suero de bovino (BSA). También se estimó la concentración de proteína espectrofotométricamente utilizando como coeficientes de extinción: 29000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 550 nm para el citocromo c de corazón de caballo, 28000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el citocromo c de levadura y 168000

M³cm⁻¹ a 409 nm para la lignino peroxidasa (75). Los citocromos fueron cuantificados en su forma reducida, la cual se obtuvo en presencia de metabisulfito de sodio y atmósfera de nitrógeno.

4.6 Determinación de la actividad termodinámica

La actividad termodinámica se determinó calculando el coeficiente de actividad en base a las ecuaciones NRTL para el solvente orgánico y el agua indicada a continuación:

$$\text{Ln}\gamma_s = x_a^2 \left[T_{21} \left(\frac{G_{21}}{x_s + x_a G_{21}} \right)^2 + \left(\frac{T_{12} G_{12}}{(x_a + x_s G_{12})^2} \right) \right]$$

$$\text{Ln}\gamma_a = x^2 \left[T_{12} \left(\frac{G_{12}}{x_a + x_s G_{12}} \right)^2 + \left(\frac{T_{21} G_{21}}{(x_s + x_a G_{21})^2} \right) \right]$$

donde $\text{Ln } \gamma_s$ y $\text{Ln } \gamma_a$ son los logaritmos de los coeficientes de actividad para el solvente y el agua, respectivamente. El cálculo de la actividad se realizó multiplicando el coeficiente de actividad por la fracción mol. Para las dos ecuaciones anteriores $T_{12} = A_{12}/RT$; $T_{21} = A_{21}/RT$; $G_{12} = \exp(-\alpha_{12}T_{12})$; $G_{21} = \exp(-\alpha_{12}T_{21})$. Los valores de A_{12} , A_{21} , α_{12} son constantes del equilibrio vapor-líquido a 25 °C y 1 atm de presión (tabla VIII) cuyas unidades están dadas en cal/mol con el valor de R de 1.98721 cal/mol^oK y las unidades de temperatura en ^oK.

Tabla VIII. Valores de las constantes del equilibrio vapor-líquido de los sistemas monofásicos bicomponentes utilizados.

Sistema	A_{12}	A_{21}	α_{12}
Agua/acetonitrilo	1133.6715	890.5739	0.5296
Agua/etanol	26.6043	869.7678	0.2945
Agua/metanol	-45.9344	373.8877	0.3022
Agua/isopropanol	89.1266	1177.3322	0.2884
Agua/tetrahidrofurano	1007.9396	1296.3189	0.4512
Agua/acetona	645.3153	765.8810	0.4304
Agua/etilenglicol	360.1873	-391.2880	0.2950

Tomados de la referencia 30

4.7 Estabilidad en fluidos supercríticos

El citocromo c se adsorbió en perlas de vidrio de diámetro 0.5 mm liofilizando una solución de la proteína en presencia de las perlas, quedando una concentración final de 0.5 mg de proteína/gr de perlas. Dos gramos de proteína inmovilizada se incubaron en CO₂ en condiciones supercríticas en una celda cilíndrica de acero inoxidable de 10 cm de altura por 2 cm de diámetro de base (figura 6). Después de la incubación a diferentes tiempos, el citocromo c se redisolvió en buffer de fosfatos 60 mM pH 6.1 y se determinó su actividad específica en la oxidación de cloruro de pinacianol con H₂O₂ como fue explicado anteriormente.

Para detectar la existencia de reacción catalítica en condiciones supercríticas dos gramos de proteína inmovilizada se colocaron en la celda de reacción junto con los sustratos en forma sólida, 20 nmoles de pireno y 1 μ mol de hidroperóxido de cumeno a

diferentes condiciones supercríticas (figura 6). Los tiempos de reacción fueron manejados en forma estática en un principio (sin remoción del sustrato, válvula B abierta y válvula C cerrada; figura 6) y después en forma dinámica (removiendo el sustrato hacia la trampa de anabolitos, válvula B cerrada y válvula C abierta; figura 6). En algunas ocasiones se inyectó acetonitrilo como cosolvente a la celda de reacción (unicamente en la forma dinámica) y la proteína se hidrató a diferentes actividades de agua. Después de llevar al sustrato a la trampa, se extrajo con tetrahidrofurano o dimetilformamida para colectarlo en viales (figura 6). Finalmente se midió el espectro de absorción del sustrato y se comparó con el espectro del sustrato puesto a las mismas condiciones pero en ausencia de la proteína.

El trabajo en fluidos supercríticos se realizó en el laboratorio del Dr. Eduardo Bárzana García de la Facultad de Química de la UNAM.

4.8 Hidratación del citocromo c adsorbido

El citocromo c adsorbido en perlas de vidrio se colocó en un desecador a 4 °C en presencia de diferentes soluciones de sales, con el propósito de hidratarlo a diferentes actividades de agua. Se obtuvo la isoterma de adsorción de agua por la proteína midiendo el incremento en peso de la proteína al cabo del tiempo, llegando a la saturación a los tres días. Una vez logrado el equilibrio, el citocromo c estuvo listo para el ensayo de catálisis. Las sales utilizadas fueron las siguientes: sulfato de potasio, para una actividad de 0.973; sulfato de amonio, para una

actividad de 0.8; cloruro de calcio, para una actividad de 0.635 y cloruro de magnesio, para una actividad de 0.343.

4.9 Actividad catalítica en microemulsiones

La reacción en los sistemas agua-isopropanol-tolueno, agua-isopropanol-hexano y agua-isopropanol-gasolina blanca se llevó a cabo en una celda espectrofotométrica de cuarzo de 1 ml que contenía 13 μM de cloruro de pinacianol, 1mM de H_2O_2 y diferentes concentraciones de solventes las cuales formaban una microemulsión estable y transparente. La fase agua consistió en una solución 6 mM de fosfatos pH 6.1. La actividad específica se cuantificó como fue descrito anteriormente.

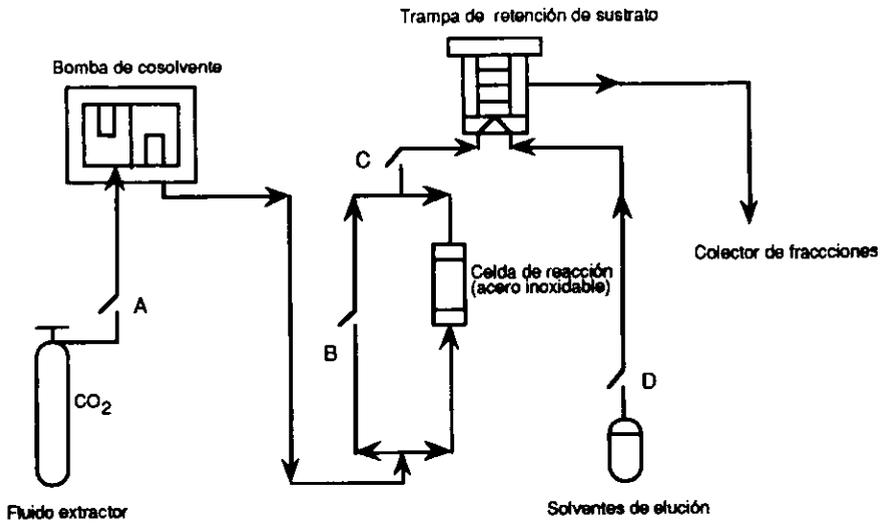


Figura 6. Equipo de extracción supercrítica utilizado en los experimentos de biocatálisis con citocromo c en CO₂ supercrítico.

5 Resultados y discusión

Actividad catalítica en fluidos supercríticos

5.1 Estabilidad en condiciones supercríticas.

El citocromo c es estable a las condiciones supercríticas ensayadas de 40°C; 105 bares y 65°C; 210 bares. En la figura 7 se muestran los resultados de la actividad residual en la oxidación de cloruro de pinacianol por citocromo c. La hidrofobicidad del CO₂ en estas condiciones es similar a la del hexano en condiciones normales (39), por lo que no es capaz de competir por el agua que la proteína retiene como parte de su estructura, es decir, el citocromo c aparentemente no es afectado a nivel estructural por la presencia de CO₂. Esto se refleja en la conservación del 100% de la actividad, al menos en los primeros 60 minutos de incubación.

En la figura 7 también se muestra la actividad residual del citocromo c después de ser incubado a 40 y 65 °C en agua a presión atmosférica. Después de 60 minutos de incubación a 40°C, el citocromo perdió el 10% de su actividad inicial y el 40% cuando fue incubado a 65°C. Como era de esperarse, la estabilidad a la temperatura en presencia de agua es menor que la del sistema de CO₂ SC (bióxido de carbono en estado supercrítico). Se ha reportado, en fluidos supercríticos, que el contenido de agua tiene un efecto importante sobre la estabilidad de la enzimas y que la presión sólo afecta a enzimas multiméricas (80,81).

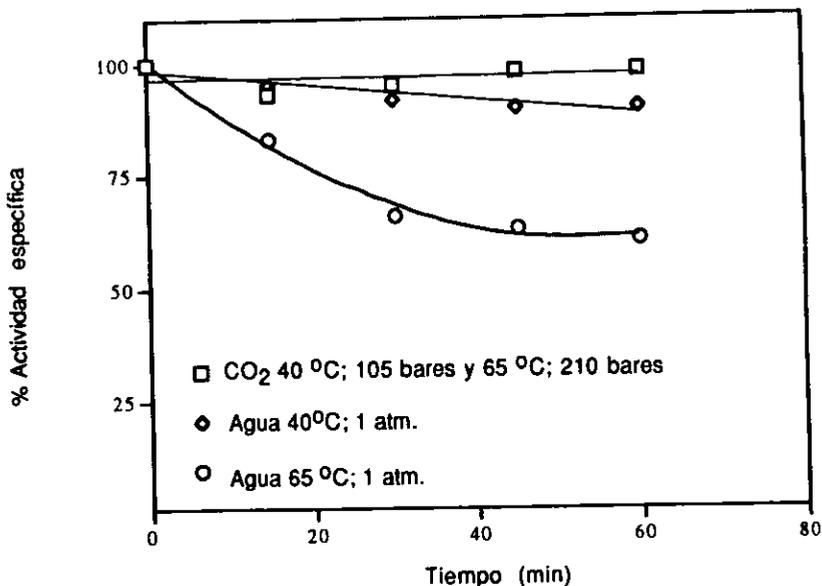


Figura 7. Estabilidad del citocromo c en condiciones supercríticas en la oxidación de cloruro de pinacianol.

El citocromo c es completamente estable en agua a temperatura y presión atmosférica y en CO₂ SC. Sin embargo, la presencia de un solvente orgánico miscible en agua tiene un marcado efecto sobre su estabilidad. Vázquez Duhalt et al. (78) reportaron que el citocromo c en un sistema con 90% de THF disminuía su actividad a menos del 60% de la actividad inicial, al ser incubado durante 20 minutos.

Los solventes miscibles en agua tienen la capacidad de competir por el agua con la enzima, aparte de que el sistema que resulta de mezclar agua y solvente modifica las interacciones eléctricas a la que esta sujeta la proteína para mantener su estructura nativa. Esto no sucede con el CO₂ SC, por un lado porque su solubilidad en agua es mínima y,

por otro, porque su momento dipolar es cero, no teniendo la habilidad de interactuar eléctricamente con alguna partícula cargada.

5.2 Actividad en CO₂ supercrítico

El primer ensayo para determinar si el citocromo c es activo en condiciones supercríticas se realizó a 40°C y 104 bares de presión durante 10 minutos en forma estática y 5 minutos en forma dinámica, colocando en la celda de reacción 20 nmoles de pireno, 1 μ mol de hidroperóxido de cumeno, como agente oxidante, y 1 gr de citocromo inmovilizado. Al comparar el espectro de absorción del pireno (antes y después del tratamiento) no encontramos diferencia alguna, por lo que a estas condiciones no existe reacción. La temperatura y presión utilizadas en este ensayo son las mínimas necesarias para disolver al sustrato (8) pero no fueron adecuadas para la reacción. Kamat et al. (40) reportaron que el CO₂ a 40°C es capaz de reaccionar con los grupos aminos libres de la enzima para formar carbamatos, lo cual puede provocar un mal desempeño de las enzimas en la biocatálisis. La formación de carbamatos se puede evitar trabajando a temperaturas superiores a 55°C (40).

Por lo anterior, decidimos aumentar la temperatura a 65°C y la presión a 204 bares (densidad = 0.7) para evitar una posible inhibición del citocromo c por los carbamatos. Todos los demás parámetros (como el tiempo de extracción dinámica y estática y concentración de sustratos) se mantuvieron

constantes. El espectro de absorción del pireno sometido a tratamiento nos indica que no hubo reacción bajo estas condiciones.

Una posible causa de que no exista reacción podría ser la ausencia de agua. Se sabe que para que una enzima sea activa en medio orgánico debe existir un mínimo de agua que es específico del medio de reacción y de la enzima (89). El citocromo c fue entonces hidratado a las diferentes actividades de agua de 0.23, 0.76, 0.97. La determinación de la actividad se hizo en las condiciones anteriores (40°C; 105 bares y 65°C; 204 bares) y los tiempos de reacción se mantuvieron constantes. La comparación de espectros de absorción nos indicó la ausencia de reacción en todos los ensayos con el citocromo c hidratado. El efecto del contenido de agua sobre la actividad y estabilidad de las enzimas en fluidos supercríticos ha sido estudiado con anterioridad por algunos autores (54,83) quienes han reportado que existe un contenido óptimo de agua para la biocatálisis en FSC (fluidos supercríticos) y que la disminución en la actividad se puede deber a dos razones. Primero, la presencia de agua alrededor de la enzima podría llevar a una solubilización del CO₂ y, en consecuencia, a un cambio de pH en el medio cercano a la enzima, lo que repercutiría en su estabilidad y actividad. Sin embargo, Kamat et al. (40) reportaron que el cambio de pH ocasionado por el CO₂ es despreciable sobre todo si la proteína ha sido liofilizada en presencia de un amortiguador. Segundo, el agua puede formar una capa de resistencia a la penetración de los sustratos e impedir la interacción con el

sitio activo de la enzima. Esta podría ser la razón de la ausencia de reacción en nuestro sistema, debido a que el equipo con el que trabajamos no nos permite asegurarnos de que estemos manejando una o dos fases.

Dentro de la biocatálisis en medios no convencionales una herramienta frecuentemente utilizada para mejorar la actividad y estabilidad catalítica, es la modificación química y genética de proteínas (2,28,37,53,79). Las modificaciones químicas del citocromo c (citocromo-PEG-TMS y citocromo-PEG-MET) fueron ensayadas en las condiciones anteriores, adicionando 100 μ lts de agua y también en ausencia de agua. Para ambas modificaciones no hubo un cambio en la absorbancia del pireno.

Una alternativa más en la búsqueda de actividad fue el de cambiar el agente oxidante, el hidroperóxido de cumeno, por uno más reactivo, como el ácido-3-cloroperoxibenzoico. La reacción se ensayó en las condiciones supercríticas anteriores, adicionando 1 μ mol del ácido-3-cloroperoxibenzoico. Al comparar los espectros de absorción, detectamos que existe oxidación química en esas condiciones en ausencia del biocatalizador. La selección de este agente oxidante se debe a que en resultados previamente reportados (80), la eficiencia catalítica, en la oxidación de dibenzotiofeno por citocromo c (en un sistema acuoso al 10% de acetonitrilo, utilizando ácido-3-cloroperoxibenzoico) fue 230 veces mayor que al usar hidroperóxido de cumeno como oxidante.

Una de las opciones más reportadas en la literatura para modificar la actividad catalítica en fluidos supercríticos es la adición de un cosolvente (1,39). Con el propósito de estimular la actividad del citocromo c, adicionamos tetrahidrofurano al medio con un flujo de 0.4 ml/min (10%). El ensayo se hizo también para el citocromo modificado (citocromo-PEG-MET). Los tiempos de reacción se mantuvieron constantes en los primeros ensayos (25 minutos en total) y después se aumentaron hasta 90 minutos (estático y dinámico) para evitar problemas de mezclado. Estas condiciones se manejaron también al usar acetonitrilo como cosolvente en lugar del THF. En todos los ensayos realizados no se detectó reacción de oxidación de pireno.

En la literatura se recomienda utilizar un alcohol como cosolvente ya que su grupo hidroxilo podría sustituir el papel del agua en las interacciones no covalentes de la enzima (81). Nosotros utilizamos THF y ACN debido a que: el citocromo c es capaz de retener actividad en concentraciones tan altas de THF como del 95% y presenta una actividad máxima en soluciones acuosas de acetonitrilo (79). El uso de cosolventes no indujo la actividad del citocromo c en FSC.

El problema en la biocatálisis con citocromo c en CO₂ SC podría ser el contenido de agua, a pesar de haber sido hidratado a diferentes actividades de agua. Si es poca agua, el CO₂ en estado extraseco es capaz de disolver el agua y dejar a la proteína deshidratada, lo que lleva a la pérdida de estabilidad y actividad; si es demasiada agua se forman

dos fases y el sustrato no es capaz de penetrar hasta el sitio activo de la proteína, evitándose así su modificación.

5.3 Actividad catalítica en microemulsiones

La actividad catalítica del citocromo c en la oxidación de cloruro de piancianol en microemulsiones se muestra en las tablas IX y X. El perfil de actividad, en relación a la concentración de solventes, se mostró un poco irregular para los tres sistemas, sin observarse una clara dependencia con la concentración de alguno de los solventes utilizados, como se muestra en la figura 8, la cual se obtuvo interpolando los diferentes puntos de las tablas IX y X.

En la biocatálisis en micelas invertidas se ha reportado que existe una correlación entre la actividad catalítica y el parámetro W_o ($[agua]/[surfactante]$); la correlación tiene una forma de campana mostrando un W_o óptimo específico para cada enzima y que para muchos casos el valor esta alrededor de 10 (9,65,87). Abajo de este valor (W_o óptimo) se ha sugerido que el nivel de agua es insuficiente para hidratar a los residuos esenciales de la enzima y favorecer las interacciones surfactante-enzima (36); a valores más grandes del W_o óptimo la hidratación de la enzima es mayor que la requerida para la biocatálisis lo que puede llevar a posibles mecanismos de inactivación de la enzima. En el valor de W_o óptimo, se ha sugerido que el radio de la enzima corresponde al tamaño de la micela por lo que la enzima se estabiliza adoptando una conformación rígida (38).

Tabla IX. Actividad catalítica del citocromo c en agua-isopropanol-hexano (Sistema 1) y agua-isopropanol-tolueno (Sistema 2).

Tol/Hex ^a	2-Propanol ^a	Agua ^a	Act. específica (min ⁻¹)	
			Sistema 1	Sistema 2
(% v/v)	(% v/v)	(% v/v)		
20	75	5	1.1	2.6
25	70	5	1.2	2.8
30	65	5	2.7	3.1
35	60	5	2.9	2.3
5	85	10	0.6	1.8
10	80	10	0.9	N.R.
15	75	10	1.0	1.0
20	70	10	2.6	1.2
25	65	10	1.6	1.4
30	60	10	3.3	4.7
35	55	10	0.8	N.R. ^b
5	80	15	1.1	1.9
10	75	15	1.1	2.9
15	70	15	1.6	1.0
20	65	15	2.8	4.2
25	60	15	6.0	0.6
30	55	15	0.6	N.R.
5	75	20	0.6	0.7
10	70	20	1.3	1.7
15	65	20	4.6	1.8
20	60	20	0.7	2.8
5	70	25	1.1	0.7
10	65	25	N.M. ^c	1.3
15	60	25	N.M.	2.2
20	55	25	N.M.	N.R.
5	65	30	N.M.	1.0
10	60	30	N.M.	1.8

^a El volumen total de reacción fue de 1 ml.

^b N.R. No hubo reacción.

^c N.M. No se formó la microemulsión

El citocromo c presentó el perfil acampanado para el sistema agua-isopropanol-tolueno a las concentraciones constantes 7.5 mM y 6.9 mM del alcohol; la concentración de agua varía para dar valores de W_0 en el rango de 0.5-2.5 (figura 9). Un comportamiento similar se presentó para el sistema agua-isopropanol-hexano a una concentración de

alcohol de 6.9 mM en el rango de 0.5-1.6 de W (figura 9). Sin embargo, al variar la concentración de alcohol, la actividad catalítica no siguió el perfil acampanado con el W_0 para ninguno de los sistemas. El W_0 óptimo para el sistema con tolueno fue de 0.8, mientras que para el sistema con hexano fue de 1.2. Estos valores fueron pequeños comparados con los reportados en sistemas de micelas invertidas (65,87).

Tabla X. Actividad específica del citocromo c en la oxidación de cloruro de pinacianol por H_2O_2 en agua-isopropanol-gasolina blanca.

Gasolina (% v/v ^a)	2-Propanol (% v/v ^a)	Agua (% v/v ^a)	Act. Específica. (min ⁻¹)
5	90	5	1.7
10	85	5	2.2
15	80	5	1.6
20	75	5	1.5
25	70	5	1.2
30	65	5	2.1
35	60	5	1.8
40	55	5	1.9
45	50	5	2.8
50	45	5	5.2
5	80	15	N.R. ^b
10	75	15	0.6
15	70	15	1.0
20	65	15	1.9
5	70	25	0.7
5	85	10	1.2
10	80	10	1.5
15	75	10	1.7
20	70	10	1.6
25	65	10	1.8
30	60	10	2.8
35	55	10	4.2
5	75	20	0.5
10	70	20	0.8

^a El volumen total fue de 1 ml.

^b N.R. No hubo reacción

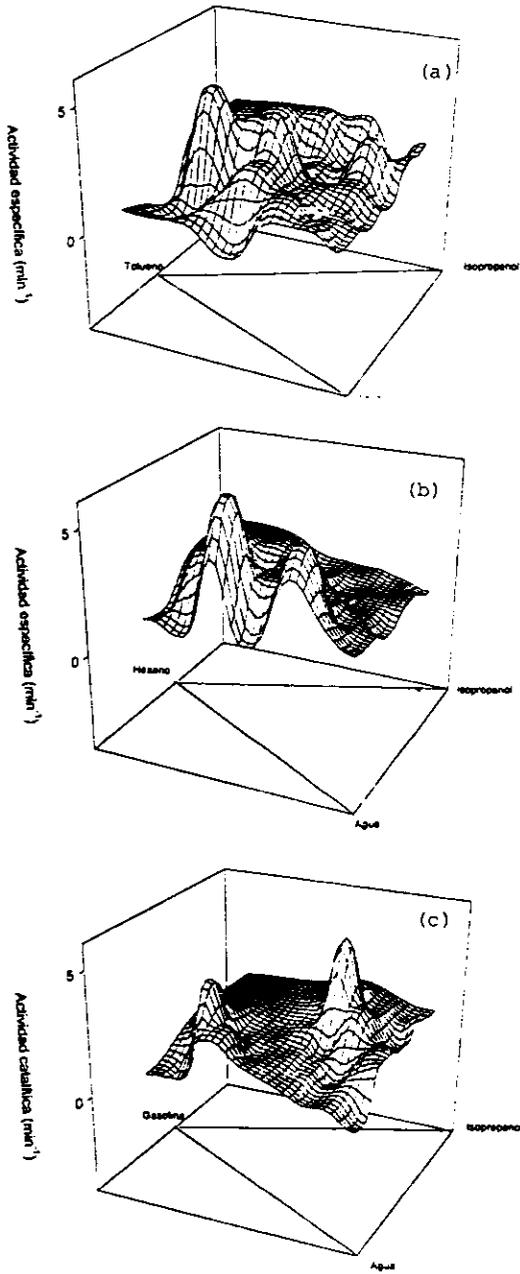


Figura 8. Perfil catalítico del citocromo c en (a) agua-isopropanol-tolueno, (b) agua-isopropanol- hexano y (c) agua-isopropanol-gasolina blanca.

En algunos casos de micelas invertidas, notablemente en el caso de AOT (dioctil sulfosuccinato de sodio) como surfactante, el parámetro W_0 está directamente relacionado con el tamaño del agregado micelar, medido por dispersión de luz y de neutrones (38). Con este parámetro podemos medir el radio hidrodinámico:

$$R_h = 1.75W_0 + 15 \text{ (nm)}$$

Para nuestros sistemas, el W_0 más pequeño fue de 0.32 lo que daría un R_h de 15.56 nm en el cual cabría el citocromo c sin ningún problema, ya que fue reportado que la estructura del citocromo c asemeja a un prolato con dimensiones 2.5 x 2.5 x 3.7 nm (21); es decir que, por cada microgota formada cabrían 33 moléculas de citocromo c y que, por los resultados obtenidos, los W_0 de 1.2 y 0.8 son los más adecuados para la biocatálisis con citocromo c.

En la figura 10 se muestran las gráficas de la actividad específica del citocromo c con algunos parámetros termodinámicos como la actividad de agua, actividad de solvente y la ΔG de mezclado (medida por la fórmula $\Delta G_{mez} = nRT \sum x_i \ln x_i$, donde x_i es la fracción mol del solvente) en el sistema agua-isopropanol-tolueno. No encontramos una correlación clara de la actividad catalítica con ninguno de los parámetros calculados.

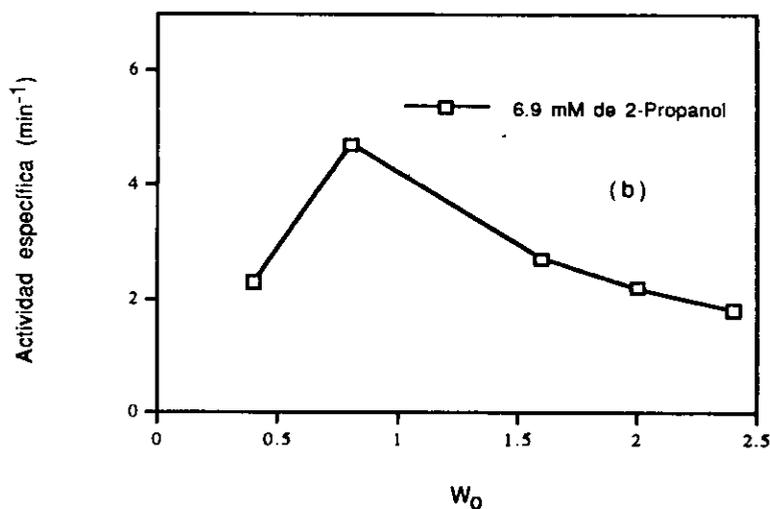
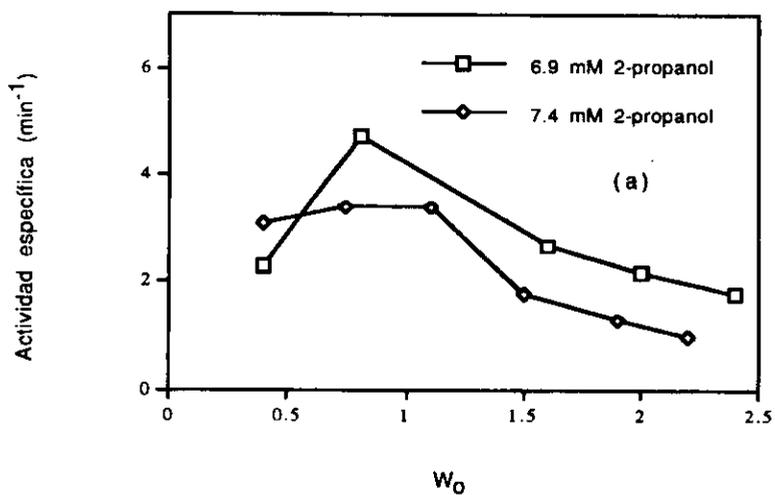


Figura 9. Efecto del parámetro W_0 en la actividad específica del citocromo c en (a) agua-isopropanol-tolueno, (b) agua-isopropanol- hexano.

La actividad termodinámica, que es una medida de la disponibilidad de agua, ha sido utilizada con éxito para correlacionarla con la actividad catalítica de la lipasa en

sistemas bifásicos (77). La correlación arrojó una actividad óptima para la reacción de esterificación similar para todos los solventes utilizados (77). La ΔG de mezclado puede ser considerada como la facilidad para que la microemulsión se forme. Como era de esperarse, todos los valores calculados son negativos y no encontramos una correlación con la actividad catalítica del citocromo c. La alta complejidad de los sistemas de microemulsiones no nos permitió correlacionar la conducta catalítica con parámetros termodinámicos individuales como la actividad del agua, actividad del solvente y la energía libre de mezclado.

5.4 Sistemas monofásicos bicomponentes

En la literatura sobre biocatálisis en medios no convencionales se han utilizado parámetros de hidrofobicidad de los solventes puros para los sistemas de mezclas de agua-solvente. Evidentemente, las propiedades de los solventes puros no son las mismas que las de las soluciones compuestas de agua y solvente orgánico.

El log P, el parámetro más usado hasta ahora, no puede ser aplicado a soluciones acuosas de solventes orgánicos miscibles en agua. Se detectó la necesidad de generar un parámetro termodinámico de hidrofobicidad de soluciones de solvente-agua para correlacionarlo con el comportamiento biocatalítico del citocromo c de corazón de caballo y la ligninasa de *Phanerocheate chrysosporium* (ver anexo I).

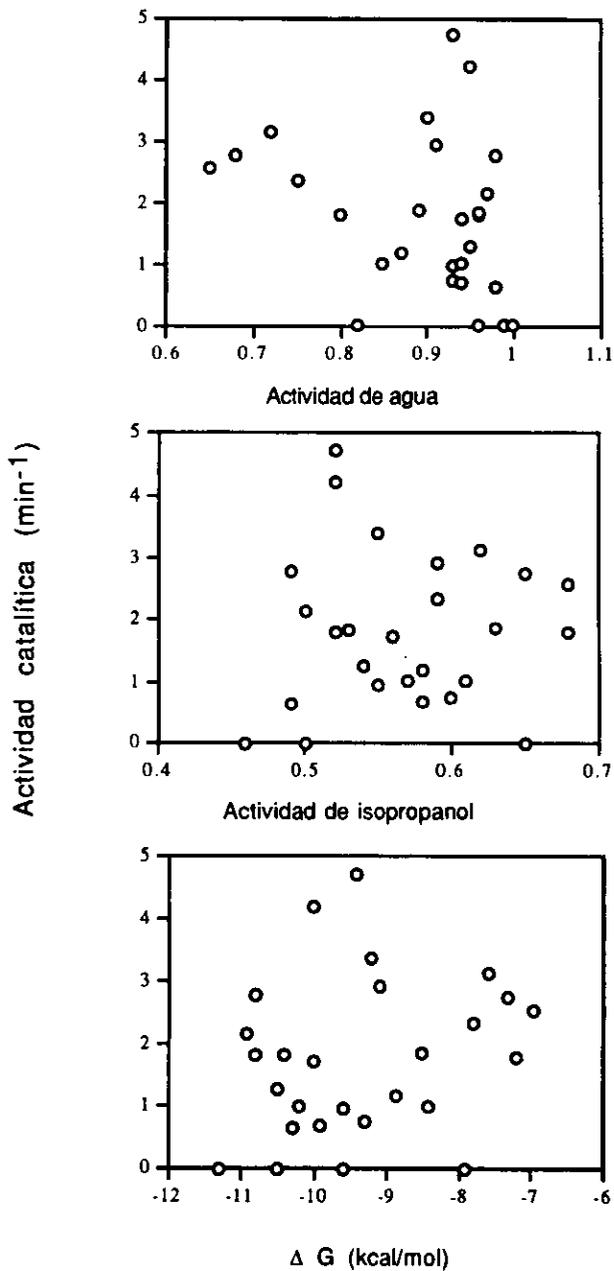


Figura 10. Actividad catalítica del citocromo c en la oxidación de pinacianol contra parámetros termodinámicos en el sistema agua- isopropanol- tolueno.

Para generar nuestro parámetro hemos asumido que la polaridad del solvente es inversamente proporcional a la hidrofobicidad del mismo y que, para mezclas de agua-solvente, la hidrofobicidad es directamente proporcional a la cantidad de solvente. Esta última puede ser expresada como la actividad de solvente, que -a diferencia de la concentración- representa la cantidad de solvente disponible para el proceso de solvatación. Expresado en fórmula, la hidrofobicidad sería:

$$H = \frac{a_s}{E_r(30)}$$

donde H es el parámetro de hidrofobicidad, a_s es la actividad termodinámica de solvente en la mezcla y el $E_r(30)$ es el parámetro Dimroth-Reichard. El parámetro de Dimroth-Reichard puede ser considerado como un parámetro de polaridad, medido como la energía asociada al cambio de banda de absorción de un pigmento susceptible a un cambio de carga (66), y se ha usado para correlacionar la actividad específica máxima del citocromo c (79) y como un parámetro de medición de los efectos de solventes en la biocatálisis (68).

En la figura 11 se muestran los resultados del cálculo de la hidrofobicidad a diferentes concentraciones de solvente orgánico utilizando la ecuación anterior.

De acuerdo con la figura 11 el parámetro de hidrofobicidad indica que la secuencia en hidrofobicidad es la siguiente: metanol < etanol < isopropanol < acetonitrilo <

tetrahidrofurano en mezclas acuosas. Este orden corresponde con la capacidad de estos mismos solventes para disolver sustratos hidrofóbicos (como los HPA's). Al comparar este resultado con otro parámetro de hidrofobicidad (como log P) se puede apreciar que el nuestro es más adecuado. Por ejemplo, basándose en log P el acetonitrilo es un solvente menos hidrofóbico que el isopropanol (log P = -0.33 y 0.38 respectivamente) y por lo tanto, su capacidad para disolver sustratos hidrofóbicos sería menor, lo cual, según los resultados de experimentos realizados, no es el caso.

Una vez establecido un parámetro de hidrofobicidad para mezclas de agua-solvente orgánico, se aplicó para determinar su utilidad en la predicción de la actividad catalítica en sistemas monofásicos bicomponentes.

Los ensayos de catálisis se realizaron con citocromo c de corazón de caballo y con ligninasa de *P. chrysosporium* en la oxidación de cinco sustratos hidrofóbicos, utilizando cinco solventes orgánicos miscibles en agua y peróxido de hidrógeno como agente oxidante. Tanto el citocromo c como la ligninasa han sido reportados como capaces de llevar a cabo reacciones en medios no convencionales (4,81).

Los experimentos consistieron en la determinación de la actividad específica del citocromo c y de la ligninasa, a diferentes concentraciones de solvente orgánico. Un parámetro que se obtiene como resultado de estos ensayos es la C_{50} , que es la concentración de solvente orgánico en la que la actividad específica máxima disminuye al 50% y que ha sido considerado como una medida del poder de

desnaturalización de los solventes para las enzimas (figura 12). En la figura 12 se muestra la conducta catalítica del citocromo c en la oxidación de tiantreno en concentraciones crecientes de tetrahidrofurano, con la cual ilustramos el cálculo de la C_{50} .

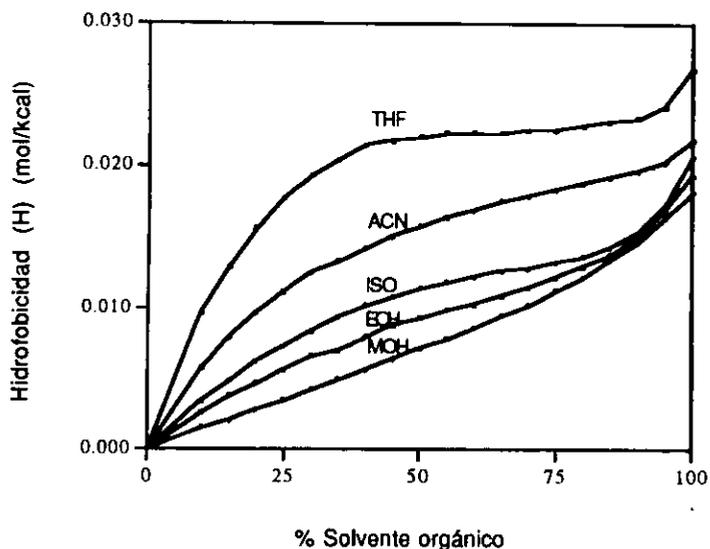


Figura 11. Parámetro de hidrofobicidad (H) para mezclas de solventes orgánicos en agua. THF, tetrahidrofurano; ACN, acetonitrilo; ISO, isopropanol; EOH, etanol; MOH, metanol.

El perfil de actividad catalítica del citocromo c en la oxidación de tiantreno (figura 12) muestra que, a bajas concentraciones de solvente (acetonitrilo), hay un aumento en la actividad catalítica, hasta un máximo en 35% de acetonitrilo. Esto es debido a una disminución en la limitación de la transferencia de masa del sustrato hidrofóbico. A concentraciones más altas de solvente (con

respecto a la que se logra la actividad máxima) hay una disminución en la actividad catalítica. Perfiles similares han sido encontrados para otras enzimas en sistemas de solventes miscibles en agua (10,43). En las tablas XI y XII resumimos los resultados de los experimentos en los cinco sistemas con los cinco sustratos, para el citocromo c y la ligninasa. En las tablas XI y XII además se muestran las actividades específicas máximas, las actividades de solvente y agua en la C_{50} y la H_{50} , que es el parámetro de hidrofobicidad en la C_{50} .

La disminución en la actividad catalítica por la presencia creciente de solvente orgánico ha sido explicada como una causa del cambio conformacional de la proteína hasta su posterior desnaturalización por el cambio en las propiedades fisicoquímicas del medio de reacción. Esto fue comprobado por Mozhaev et al. (58) al medir la fluorescencia de la α -quimotripsina en diferentes concentraciones de solvente orgánico. Sus resultados indicaban que el aumento de la fluorescencia se debía a un cambio conformacional de la enzima provocado por la presencia de solvente orgánico.

Sin embargo, los datos de las tablas XI y XII muestran que, tanto el citocromo c como la ligninasa, presentan diferentes valores de C_{50} para cada sustrato utilizado (con un solo solvente). Es decir, la pérdida de actividad no sólo se debe al cambio conformacional de la enzima, sino también hay que tomar en cuenta la naturaleza del sustrato, principalmente su hidrofobicidad. La

hidrofobicidad de los sustratos se determinó como el tiempo de elución del sustrato en una columna de HPLC C_{18} fase reversa y los valores obtenidos fueron (en minutos): pireno, 16.25; tiantreno, 12.57; difenilamina, 5.64; azul de bromofenol, 0.80 y cloruro de pinacianol, 0.76. En forma general, mientras menos hidrofóbico sea el sustrato, la actividad de la enzima se mantiene a mayores concentraciones de solvente y, por otra parte, mientras más hidrofóbico sea el solvente, la proteína se mantiene activa a menores concentraciones de solvente.

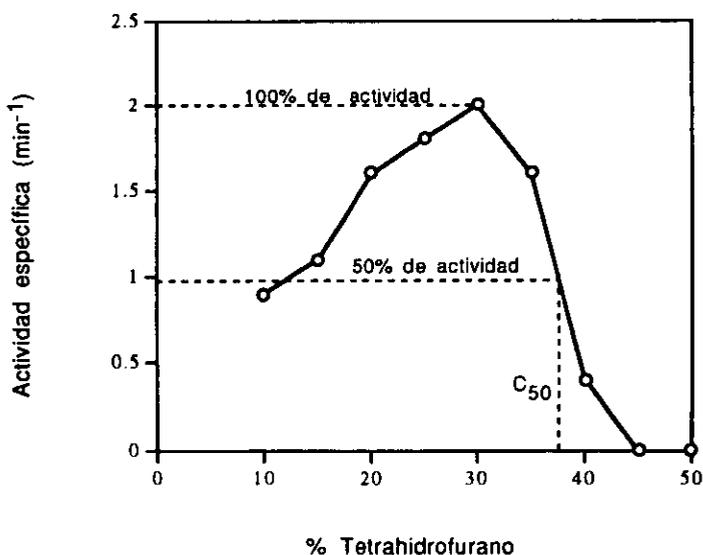


Figura 12. Conducta catalítica del citocromo c de corazón de caballo en la oxidación de tiantreno por peróxido de hidrógeno.

Tabla XI. Concentración C_{50} , actividad de agua y solvente e hidrofobicidad de la mezcla a la concentración C_{50} (H_{50}) en la oxidación de cinco diferentes sustratos por citocromo c y peróxido de hidrógeno.

Sustrato/ solvente	C_{50} (%)	a_s	a_w	H_{50} (mmol/kcal)
Pireno				
Tetrahidrofurano	19.1	0.57	0.96	15.1
Acetonitrilo	28.0	0.54	0.92	11.7
Isopropanol	27.6	0.41	0.94	8.4
Etanol	32.9	0.36	0.88	6.8
Metanol	27.8	0.21	0.86	3.8
Tiantreno				
Tetrahidrofurano	36.6	0.77	0.94	20.6
Acetonitrilo	52.2	0.73	0.86	15.9
Isopropanol	57.8	0.59	0.88	12.2
Etanol	60.0	0.53	0.81	10.3
Metanol	63.7	0.51	0.63	9.1
Difenilamina				
Tetrahidrofurano	65.4	0.83	0.93	22.3
Acetonitrilo	58.0	0.76	0.84	16.6
Isopropanol	61.5	0.60	0.88	12.4
Etanol	70.0	0.59	0.76	11.4
Metanol	67.5	0.54	0.59	9.8
Azul de bromofenol				
Tetrahidrofurano	62.0	0.83	0.93	22.3
Acetonitrilo	62.5	0.78	0.83	17.0
Isopropanol	61.0	0.60	0.88	12.4
Etanol	59.2	0.53	0.81	10.2
Metanol	64.9	0.52	0.61	9.3
Pinacianol				
Tetrahidrofurano	65.2	0.83	0.93	22.3
Acetonitrilo	73.6	0.84	0.79	18.2
Isopropanol	64.0	0.61	0.87	12.6
Etanol	60.7	0.54	0.81	10.3
Metanol	75.0	0.62	0.51	11.1

De estos resultados es sobresaliente mencionar que -al parecer- la hidrofobicidad del sustrato juega un papel

importante en la biocatálisis en medios no acuosos. El hecho de que el citocromo c pierda su actividad a 25% de THF

Tabla XII. Concentración C_{50} , actividad de agua y solvente e hidrofobicidad de la mezcla a la concentración C_{50} (H_{50}) en la oxidación de cuatro diferentes sustratos por ligninasa y peróxido de hidrógeno.

Sustrato/ solvente (mmol/kcal)	C_{50} (%)	a_s	a_w	H_{50}
Pireno				
Tetrahidrofurano	14.7	0.48	0.97	12.8
Acetonitrilo	19.1	0.43	0.94	9.2
Isopropanol	18.8	0.31	0.96	6.3
Etanol	27.9	0.31	0.91	6.0
Metanol	21.7	0.17	0.90	2.9
Tiantreno				
Tetrahidrofurano	18.0	0.55	0.96	14.6
Acetonitrilo	20.1	0.44	0.94	9.6
Isopropanol	19.6	0.32	0.96	6.5
Etanol	26.2	0.31	0.92	5.9
Metanol	28.1	0.22	0.87	2.9
Difenilamina				
Tetrahidrofurano	19.3	0.57	0.96	15.2
Acetonitrilo	24.7	0.50	0.92	6.6
Isopropanol	25.6	0.39	0.94	8.0
Etanol	27.1	0.31	0.99	5.9
Metanol	18.9	0.14	0.91	2.6
Pinacianol				
Tetrahidrofurano	23.0	0.63	0.95	16.9
Acetonitrilo	28.0	0.54	0.92	11.8
Isopropanol	30.0	0.43	0.93	8.9
Etanol	29.3	0.33	0.91	6.3
Metanol	15.0	0.11	0.93	2.0

utilizando pireno como sustrato y sea activo hasta 95% del mismo solvente con pinacianol (más hidrofílico), nos hace

pensar en que la partición del sustrato entre el sitio activo de la proteína y el solvente orgánico, es la que regula la catálisis. Para corroborar lo anterior, se determinó la diferencia de espectros del citocromo c en ausencia y presencia de sustratos. De reportes anteriores sabemos que algunos sustratos interactúan con el grupo hemo (sitio activo) del citocromo c (82).

En la figura 13 se muestra la diferencia de espectros del grupo hemo al interactuar con pireno o tiantreno. Al utilizar pireno (al 10% de THF) existe una interacción significativa con el grupo hemo, mientras que al aumentar la concentración del solvente (al 20%) la interacción con el sustrato disminuye, al igual que la actividad catalítica. Una situación similar sucede al utilizar tiantreno como sustrato, únicamente que para el tiantreno hay una interacción significativa hasta el 40% de THF y, al aumentar a 50% la concentración del solvente, la interacción desaparece.

Este comportamiento se correlaciona bien con la actividad catalítica del citocromo c en la oxidación de tiantreno. Estos resultados apoyan la hipótesis de que no solamente el cambio conformacional de las proteínas tiene que ver con la disminución de la actividad catalítica sino también la partición del sustrato entre la proteína y el solvente.

Apoyados en el reporte de Ryu et al. (68) quienes indican que la partición de sustrato por el sitio activo y el medio está controlada por interacciones hidrofóbicas,

probamos mejorar la partición hacia el sitio activo, incrementando la hidrofobicidad de la cavidad del sitio activo. Para lo anterior, se ensayaron dos modificaciones genéticas de citocromo c de levadura y una modificación química del citocromo c de corazón de caballo. También se evaluaron dos hemoproteínas más (cloroperoxidasa y hemoglobina) en la oxidación de pireno en tetrahidrofurano.

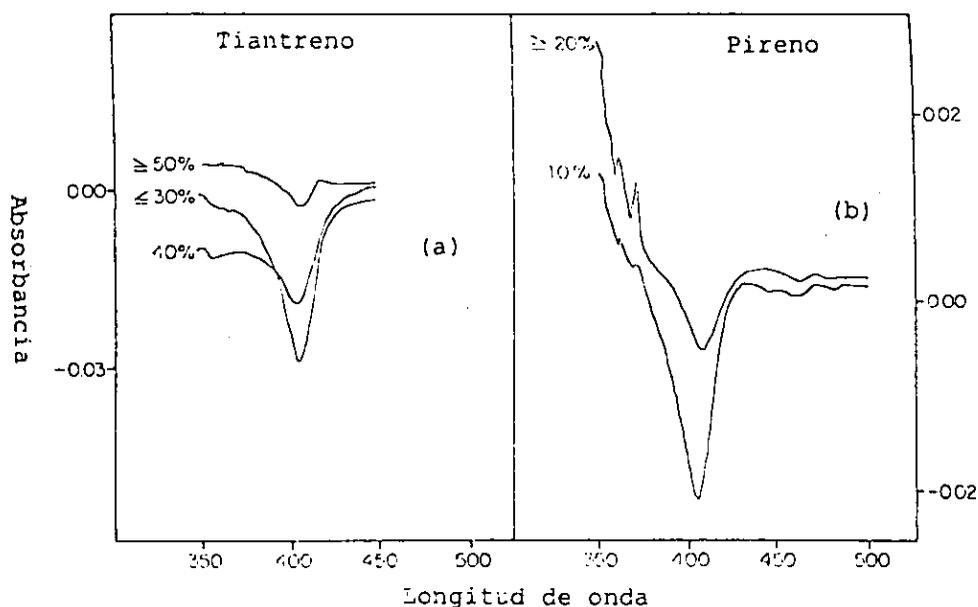


Figura 13. Espectro de diferencia del citocromo c con tiantreno (a) y pireno (b). Los porcentajes representan la concentración de THF en la mezcla de reacción.

En la tabla XIII se muestran los valores de la actividad específica máxima y los valores de la $C_{1/2}$ para las diferentes hemoproteínas ensayadas, así como de las modificaciones del citocromo c de levadura y de corazón de caballo. Los valores

de la C_{50} no varían significativamente. Al parecer la hidrofobicidad cercana al sitio activo no es muy diferente para los diferentes catalizadores considerando, los cambios de hidrofobicidad del medio de reacción.

Con el propósito de encontrar un modelo matemático, para predecir el efecto de los solventes en la biocatálisis con citocromo c y ligninasa, el valor de la H_{50} fue correlacionado con la polaridad del solvente [$E_T(30)$] (figura 14). Se encontró una correlación lineal para el citocromo c y la ligninasa, como se muestra en la figura 14. Esta correlación puede predecir el valor de la H_{50} para todos los solventes y todos los sustratos utilizados, según las siguientes ecuaciones:

$$H_{50} = 46.7 - 0.69 E_T(30) \text{ para el citocromo c}$$

$$H_{50} = 39.9 - 0.66 E_T(30) \text{ para la ligninasa}$$

Tabla XIII. Actividad específica máxima y concentración C_{50} en la oxidación de pireno en tetrahidrofurano por diferentes hemoproteínas.

Hemoproteína	Actividad máxima (min^{-1})	C_{50} (% v/v)
Cloroperoxidasa	2291	19.9
Hemoglobina	1.13	22.1
Citocromo c-PEG ^a	15.24	17.9
Phe82Gly ^b	5.09	16.8
Lys79Ala ^b	2.62	19.4

^a Modificación química del citocromo c de corazón de caballo

^b Modificaciones genéticas del iso-1-citocromo c de levadura.

La proyección de la línea de correlación de la figura 14 hasta una hidrofobicidad de cero ($H=0$), el cual corresponde al de 100% de agua en el sistema ($a_s=0$), se ajusta al valor del $E_T(30)$ del agua (61.3 kcal/mol) (66). En conclusión, el valor de la hidrofobicidad (dado por H), parece ser un buen parámetro para predecir la actividad en mezclas acuosas de solventes miscibles en agua.

Con el propósito de determinar la utilidad del parámetro H en otros sistemas biocatalíticos, obtuvimos la C_{50} de otras hemoproteínas como la cloroperoxidasa, la peroxidasa de rábano blanco y además usamos los valores de la literatura para la peroxidasa de rábano blanco y la lactoperoxidasa (70). Calculamos el valor de H_{50} para estas enzimas y los correlacionamos con los valores de $E_T(30)$ de cada solvente (ver anexo II). Como se muestra en la figura 15, las líneas de tendencia son muy similares a la del citocromo c y ligninasa, mostrando excelentes coeficientes de correlación. Por lo tanto, el parámetro H de hidrofobicidad parece ser muy útil en la determinación del efecto de los solventes en la biocatálisis de hemoproteínas o hemoenzimas con actividad peroxidasa.

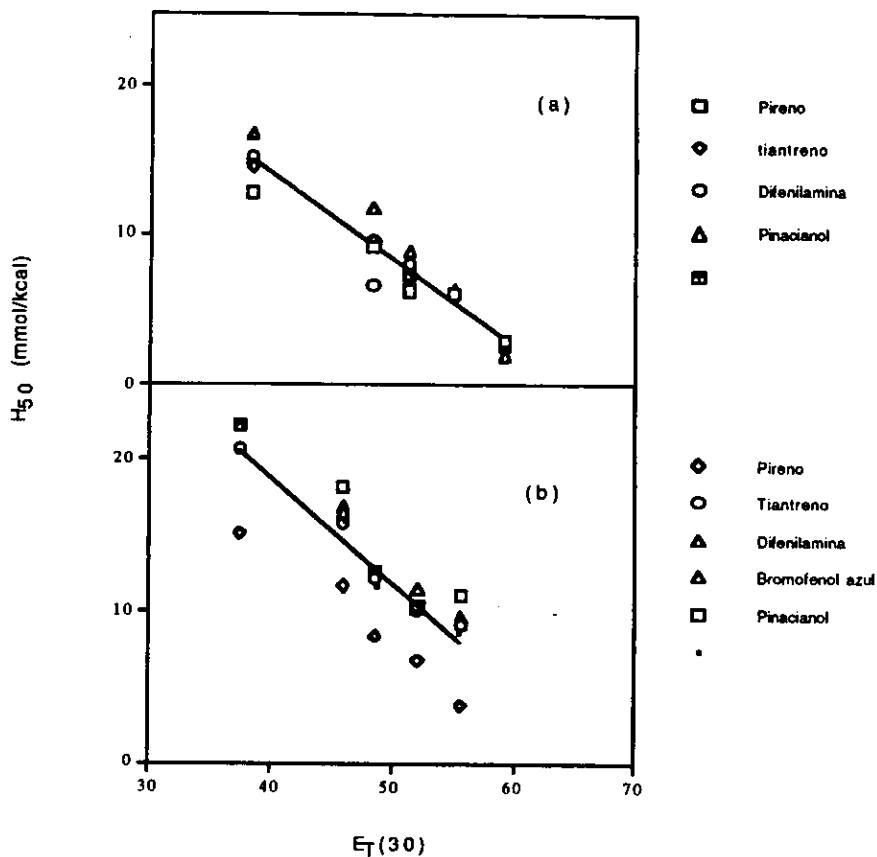


Figura 14. Correlación lineal entre la polaridad del solvente dado por el parámetro $E_T(30)$ y la hidrofobicidad de la mezcla en la concentración C_{50} para (a) la ligninasa y (b) el citocromo c

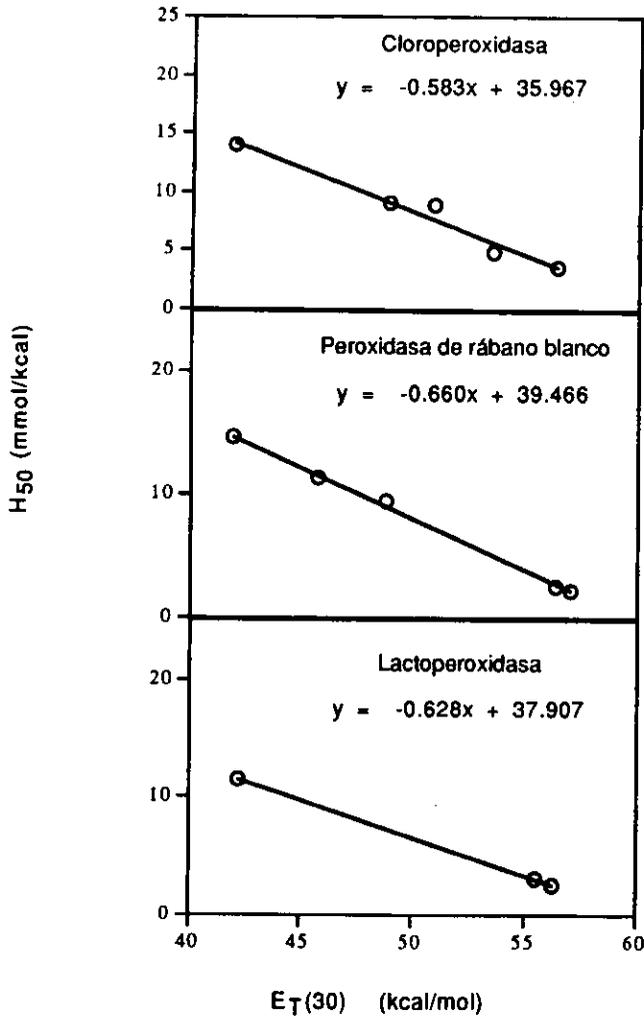


Figura 15. Correlación entre el parámetro de hidrofobicidad de cuatro hemoproteínas con actividad peroxidasa y la polaridad del solvente.

6 Conclusiones

- El citocromo c es capaz oxidar diferentes sustratos en sistemas conteniendo solventes orgánicos.
- El citocromo c es estable a la incubación a diferentes condiciones de presión y temperatura en CO₂ supercrítico.
- No se detectó actividad catalítica del citocromo c en la oxidación de pireno en CO₂ supercrítico.
- En los sistemas de microemulsiones, el citocromo c es activo en concentraciones de agua de hasta el 5%.
- En microemulsiones no se encontró correlación entre la actividad de agua, actividad de solvente o energía libre de mezclado y la actividad catalítica del citocromo c.
- Se desarrolló un nuevo parámetro para la estimación de la hidrofobicidad de mezclas acuosas de solventes orgánicos.
- El nuevo concepto de hidrofobicidad puede ser usado para predecir la actividad catalítica del citocromo c, cloroperoxidasa, ligninasa, peroxidasa de rábano blanco y lactoperoxidasa

7 Referencias

1. Aaltonen, O., Rantakyla, M. (1991). Biocatalysis in supercritical CO₂. CHEMTECH, 240-248.
2. Adlercreutz, P. (1992). On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. In Biocatalysis in non conventional media. Eds por J. Tramper, M.H. Vermúe and H.H. Beeftink, 55-61.
3. Aitken, M.D., Irvine, R.L. (1989). Stability testing of ligninase and Mn peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. Bioeng. 34:1251-1260.
4. Akasaka, R., Mashino, T., Hirobe, M. (1994). Hydroxylation of benzene by immobilized cytochrome c in an organic solvent. J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1:1817-1821.
5. Arnao, M.B., Acosta, M., del Rio, J.A., Varon, R., Garcia-Canovas, F. (1990). A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. Biochem. Biophys. Acta, 1041:43-47.
6. Azari, M.R., Wiseman, A. (1982). Purification characterization of cytochrome P-448 component of benzo[a]pyrene hydroxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Anal. Biochem. 122:129-138.
7. Azenbacher, P., Niwa, T., Tolbert, L.M., Sirimanno, S.R., Guengerich, F.P. (1996). Oxidation of 9-alkylanthracenes by cytochrome P450 2B1, horseradish peroxidase and iron tetraphenylporphine/iodosylbenzene systems: Anaerobic and aerobic mechanisms. Biochem. 35:2512-2520.
8. Bartle, K.D., Clifford, A.A., Jafar, S.A., Shilstone, G.F., (1991). Solubilities of solids and liquids of low volatility in supercritical carbon dioxide. J. Phys. Chem. Ref. Data, 20,4:713-756.
9. Bartscherer, K.A., Minier, M., Renon, H. (1995). Microemulsions in compressible fluids- A review. Fluid Phase Equilibria, 107:93-150.

10. Batra, R., Gupta, M.N., (1994). Enhancement of enzyme activity in aqueous-organic solvent mixture. *Biotechnol. Lett.* 16:1059-1064.
11. Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E. (1996). Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 7:2547-2553.
12. Black, J.A., Birge, W.J., Westerman, A.G., Francis, P.C. (1983). Comparative aquatic toxicology of aromatic hydrocarbons. *Fundam. Appl. Toxicol.* 3:353-358.
13. Bogan, B.W., Lamar, R.T. (1995). One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61,7:2631-2635.
14. Bogan, B.W., Lamar, R.T. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-625 and its extracellular lignolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 5:1597-1603.
15. Bogan, B.W., Lamar, R.T., Hammer, K.E. (1996). Fluorene oxidation *in vivo* by *Phanerochaete chrysosporium* and *in vitro* during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62,5:1788-1792.
16. Boldrin, B., Tiehm, A., Fritzsche, C. (1993). Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by *Mycobacterium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 66:1927-1930.
17. Bushell, G.W., Louie, G.V., Brayer, G.D. (1990). High resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *J. Mol. Biol.* 214:585-595.
18. Carrea, G., Oftolina, G., Riva, S. (1995). Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *TIBTECH*, 131:63-70.
19. Chopineau, J., Thomas, D., Legoy, M. (1989). Dynamic interaction between enzyme activity and the microstructured environment. *Eur. J. Biochem.* 183:459-463.

20. Cutker, R.L., Pielak, A.G., Mauk, A.G., Smith, M. (1987). Replacement of cysteine 107 of *Saccharomyces cerevisiae* iso-1-cytochrome c with threonine: improved stability of the mutant protein. *Prot. Engin.* 1(2):95-99.
21. Dickerson, R.E., Takano, T., Eisenberg, D., Kallai, O.B., Samson, L., Cooper, A., Margoliash, E., (1971). *J. Biol. Chem.* 246:1511-1523.
22. Dordick, J. (1991). **Applied biocatalysis.** In *Applied Biocatalysis.* Eds by Harvey W. Blanch and Douglas S. Clark, Cap. 1:1-52.
23. Dordick, J.S. (1989). Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 11:194-221
24. Durant, J.L., Busby Jr., W.F., Lafleur, A.L., Penman, B.W., Crespi, C.L. (1996). Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutation Res.* 371:123-157.
25. Fedorak, P.M., Semple, K.M., Vázquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S. (1993). Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb. Technol.* 15:420-437.
26. Fitzpatrick, P., Klivanov, A.M. (1991). How can the solvent affect enzyme enantioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 113:3166-3171.
27. Fowler, S.M., England, P.A., Westlake, A.C.G., Rouch, D.R., Nickerson, D.P. (1994). Cytochrome P450_{cam} monooxygenase can be redesigned to catalyse the regioselective aromatic hydroxylation of diphenylmethane. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 2761-2762
28. Fujita, A., Senzu, H., Kunitake, T., Hamachi, I. (1994). Enhanced peroxidase activity of cytochrome c by phosphate bilayer membrane. *Chem. Lett.* 1219-1222.
29. Garcia-Rio, L., Leis, J.L. (1995). Influence of water structure on solvolysis in water in oil microemulsions. *J. Phys. Chem.* 99:12318-12326.

30. Gmehline, J., Onken, U., Arh, W. (1981). Vapor-liquid equilibrium data collection. Aqueous-organic systems (supplement 1). Universität Dortmund, Federal Republic of Germany.
31. Griffoll, M., Selifonov, S.A., Gatlin, C. V., Chapman, P.J. (1995). Actions of a versatile fluorene-degrading bacteria isolate on polycyclic aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61,10:3711-3723.
32. Grimberg, S.J., Stringfellow, W.T., Aitken, M.D. (1996). Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of nonionic surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* 62,7:2387-2392.
33. Habe, T., Shimada, M., Higuchi, T. (1985). Biomimetic approach to lignin degradation. H₂O₂ dependent C-C bond cleavage of lignin model compounds with natural iron porphyrin and imidazole complex. *Mokuzai Gakkaishi*, 31:54-55
34. Halling, P.J. (1990). Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems. Predictions of effects on equilibrium position. (1990). *Biotechnol. Bioeng.* 35:691-701.
35. Hammel, K.E., Kayanamaran, B., Kirk, T.K. (1986). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 36:16948-16952.
36. Hilhorst, R., Laane, C., Veeger, C. (1993). Enzymatic conversion of apolar compounds in organic media using NADH-regenerating system and dihydrogen as reductant. *FEBS-Lett.* 159:225-228.
37. Hwang, J.Y., Arnold, F.H. (1991). Enzyme design for nonaqueous solvents. In *Applied Biocatalysis*, eds. Blanch and Douglas S. Clark. Volumen 1, pp 53-86.
38. Kabanov, A.V., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Namyotkin, S.N., Pshezhetsky, A.V., Martinek, K. (1988). Enzymes entrapped in reversed micellas of surfactants in organic

- solvents: A theoretical treatment of catalytic activity regulation. *J. Theor. Biol.* 133:327-347.
39. Kamat, S.V., Beckman, E.J., Russell, A.J. (1995). Enzyme activity in supercritical fluids. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15(1):41-71.
40. Kamat, S.V., Critchley, G., Beckman, E.J., Russell, A.J. (1995). Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids: III. Does carbon dioxide covalently modify enzymes?. *Biotechnol. Bioeng.* 46,6:610-620.
41. Kamat, S.V., Iwaskeyez, B., Beckman, E.J., Russell, A.J. (1993). Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids: Tuning enzyme activity by changing pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2940-2944.
42. Khmelnitsky, Y., Hilhorst, R., Veeger, C. (1991). Detergentless microemulsions as media for enzymatic reactions cholesterol oxidation catalyzed for cholesterol oxidase. *Eur. J. Biochem.* 198:31-41.
43. Khmelnitsky, Y.L., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Martinek, K. (1988). Engineering biocatalytic system in organic media with low water content. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 710-724.
44. Kijima, T., Yamamoto, S., Kise, H., (1996). Study of fluorescence and catalytic activity of α -chymotrypsin in aqueous-organic media. *Enzyme Microb. Technol.* 18:2-6.
45. King, D.J., Azari, M.R., Wiseman, A. (1984). Studies on the properties of highly purified cytochrome P₄₄₈ and its dependent activity benzo[a]pyrene hydroxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Xenobiotica*, 14, 1/2:187-206
46. Kise, H., Hayakawa, A. (1991). Immobilization of proteases on porous chitosan beads and their catalysis for ester and peptides synthesis in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, 13:584-588.
47. Kusk, K.O. (1981). Comparison of the effects of aromatic hydrocarbons on a laboratory alga and natural phytoplankton. *Bot. Mar.* 24:611-613

48. Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 30:81-87.
49. Larsson, K.M., Oldfield, C., Freedman, R. (1989). Analysis of the inactivation of liver alcohol dehydrogenase during the storage in Aerosol-OT/isooctane microemulsions. *Eur. J. Biochem.* 183:459-463.
50. Louie, G., Brayer, G.D. (1989). A polypeptide chain-refolding event occurs in the Gly 82 variant of yeast iso-1-cytochrome c. *J. Mol. Biol.* 209:313-322.
51. Louie, G., Pielak, G.J., Smith, M., Brayer, G.D. (1988). Role of phenylalanine 82 in yeast iso-1-cytochrome c and remote conformational changes induced by a serine residue at this position. *Biochem.* 27:7870-7876.
52. Louie, G.V., Hutcheon, W.L.B., Brayer, G.D. (1988). Yeast iso-1-cytochrome c a 2.8 Å resolution three-dimensional structure determination. *J. Mol. Biol.* 199:295-314.
53. Martinez, P., Arnold, F.H. (1991). Surface charge substitutions increase the stability of α -lytic protease in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 113:6336-6337.
54. Marty, A., Chulalaksanakul, W., Willemot, R.N., Condoret, J.S. (1992). Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical CO₂. *Biotechnol. Bioeng.* 39:273-280.
55. Masaphy, S., Levanon, D., Henis, Y., Venkateswarlu, K., Kelly, S.L. (1995). Microsomal and cytosolic cytochrome P₄₅₀ mediated benzo[a]pyrene hydroxylation in *Pleurotus pulmonarius*. *Biotechnol. Lett.* 17:969-974.
56. Mauk, A.G. (1991). Electron transfer in genetically engineered proteins. The cytochrome c paradigm. *Struct. Bonding.* 75:131-137.
57. Modi, S., Primrose, W.V., Lian, L.Y., Roberts, G.C.K. (1995). Effect of replacement of ferriprotoporphyrin IX in the haem domain of cytochrome P₄₅₀ BM-3 on substrate and catalytic activity. *Biochem. J.* 310:939-943
58. Mozhaev, V.V., Khmel'nitsky, Y.L., Sergeeva, M.V., Belova, A.B., Klyachko, N.L., Levashov, A., Martinek, K. (1989).

- Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures. α -chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide cosolvents. Eur. J. Biochem. 184:597-602.
59. Nakamura, K. (1990). Biochemical reactions in supercritical fluids. TIBTECH, 8:288-292.
60. Oldfield, C. (1990). Evaluation of the steady state kinetic parameters for enzymes solubilized in water in oil microemulsion systems. Biochem. J. 272:15-22.
61. Ortiz-Leon, M., Velasco, L., Vazquez-Duhalt, R. (1995). Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by hemoglobin and hydrogen peroxide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 215,3:968-973
62. Pettigrew, G.W., Moore, G.R. (1987). In Cytochrome c Biological aspects. cap.1:1-27.
63. Pipe, R.K., Moore, M.N. (1986). An ultrastructural study on the effects of phenanthrene on lysosomal enzyme β -glucuronidase in digestive cell of periwinkle *Littorina littorea*. Aquat. Toxicol. 8:65-76
64. Rafferty, S.P., Pearce, L.P., Barker, P.D., Guillemette, J.D., Kay, C.M., Smith, M., Mauk, A.G. (1990). Electrochemical, kinetic and circular Dichroic consequences of mutations at position 82 of yeast iso-1-cytochrome c. Biochem. 29:9365-9369.
65. Rees, G.D., Robinson, B.H., (1995). Esterification reactions catalyzed by *Chromobacterium viscosum* lipase in CTAB-based microemulsions systems. Biotechnol. Bioeng. 45:344-355.
66. Reichard, C. (1979). Empirical parameters of solvent polarity as linear free-energy relationships. Angew. Chem. Int. Engl. 18:98-110
67. Rosell, C.M., Vaidya, A.M., Halling, P. (1995). Prediction of denaturing tendency of organic solvent in mixtures with water by measurements of naphthalene solubility. Biochim. Biophys. Acta. 1252:158-164.

68. Ryu, K., Dordick, J. (1992). How the organic solvents affect peroxidase structure and function?. *Biochem.* 31:2588-2598.
69. Sanglard, D., Leisola, M.S.A., Fiechter, A. (1986). Role of extracellular ligninases on biodegradation of benzo[a]pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 8:209-212
70. Sato, K., Hasumi, H., Tsukidate, A., Sakurada, J., Nakamura, S., Hosoya, T. (1995). Effect of mixed solvents on three elementary steps in the reactions of horseradish peroxidase and lactoperoxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1253:94-102.
71. Savino, J.F., Tanabe, L.L., (1984). Sublethal effects of phenanthrene, nicotine and pinane on *Daphnia pulex*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42:778-784
72. Shimada, M., Habe, T., Umezawa, T., Higuchi, T., Okamoto. (1984). The C-C bond cleavage of lignin model compound, 1,2-diarylpropane-1,3-diol, with a heme-enzyme model catalyst tetraphenylporphyrinato iron(III) chloride in the presence of tert-butyl hydroperoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:1247-1252.
73. Snubnada, S., Sundaram, P.V. (1995). The role of pH change caused by the addition of water-miscible organic solvent in the destabilization of an enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 17:330-335.
74. Yoshimoto, T., Ritani, A., Ohwada, K., Takahashi, K., Kodera, Y., Matshushima, A., Saito, Y., Inada, Y. (1987). Polyethylene glycol derivative-modified cholesterol oxidase soluble and active in benzene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148(2):876-882.
75. Torres, E., Sandoval, J.V., Rossell, F.I., Mauk, A.G., Vazquez-Duhalt, R. (1995). Site-directed mutagenesis improved biocatalytic activity of iso-1-cytochrome c in polycyclic hydrocarbon oxidation. *Enzyme Microb. Technol.* 17:1014-1020.

76. Tramper, J. (1993). Applied biocatalysis: from product request to idea to product. En *Applied Biocatalysis*. Eds. by Cabral, J.M.S., Best, D., Boross, L., Tramper, J. Ed. Harwood Academic Publisher.
77. Valivety, R.H., Halling, P.J., Macrae, A.R., (1992). Reaction rate with lipase catalyst shows similar dependence of water activity in different organic solvents. *Biochem. Biophys. Acta.* 1118:218-222.
78. Vazquez-Duhalt, R., Fedorak, P.M., Westlake, D.W.S., (1993). Chemical modification of protein molecules improved their activity in organic solvents. En *Stability and Stabilization of enzymes*. Editado por W.J.J. van Den Tweel, A. Harder and R.M. Buitelaar, 511-517.
79. Vazquez-Duhalt, R., Semple, K.M., Westlake, D.W.S., Fedorak, P.M. (1993). Effect of water-miscible organic solvent on the catalytic activity of cytochrome c. *Enzyme Microb. Technol.* 15:936-943
80. Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S., Fedorak, P.M. (1993). Cytochrome c as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. *Enzyme Microb. Technol.* 15:494-499.
81. Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S., Fedorak, P.M. (1994). Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60,2:459-466
82. Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S., Fedorak, P.M., (1993). Cytochrome c as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. *Enzyme Microb. Technol.* 15:494-499.
83. Vermöe, M.H., Tramper, J., de Jong, J.P.J., Oonton, W.H.M., (1992). Enzymic transesterification in near critical carbon dioxide: Effect of pressure, Hildebrand solubility parameter and water content. *Enzyme Microb. Technol.* 14:649-655.
84. Volkering, F., Breure, A.M., van Andel, J.G., Rukens, W.H. (1995). Influence of nonionic surfactant on

- bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61,5:1699-1705.
85. Volkering, F., Breure, A.M., Sterkenburg, A., van Andel, J.G. (1992). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:548-552.
86. Yang, B., Kuo, S., Hanyadi, P., Perkin, K.L. (1994). Solvent suitability for lipase-mediated acyl-transfer and esterification reactions in microaqueous milieu is related to substrate and product polarities. *Enzyme Microb. Technol.* 16:577-583.
87. Yang, F., Russell, A.J. (1995). A comparison of lipase-catalyzed ester hydrolysis in reverse micelles, organic solvents, and biphasic systems. *Biotechnol. Bioeng.* 47: 60-70.
88. Yang, F., Russell, A.J. (1996). The role of hydration in enzyme activity and stability: 2. Alcohol Dehydrogenase activity and stability in a continuous gas phase reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 49:709-716.
89. Zaks A., Klivanov, A.M., (1988). The effect of water on enzymatic action in organic media. *J. Biol. Chem.* 17:8017-8021.
90. Zaks, A., Klivanov, A. (1985). Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science*, 224:1249-1251.

Solvent hydrophobicity predicts biocatalytic behaviour of lignin peroxidase and cytochrome *c* in aqueous solution of water-miscible organic solvents

Eduardo Torres, Raunel Tinoco, Rafael Vazquez-Duhalt*

Instituto de Biología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Received 12 February 1996; revised 22 March 1996; accepted 26 March 1996

Abstract

A new hydrophobicity parameter for water-organic solvent mixtures is proposed. This hydrophobicity concept (H) includes the thermodynamic activity of solvent and solvent polarity parameter from Dimuth-Reichardt transition energy [$E_T(30)$]. Solvent hydrophobicity (H) was a useful tool for the prediction of the threshold concentration C_{50} for biocatalytic oxidation of five hydrophobic substrates with lignin peroxidase and cytochrome *c* in aqueous solutions of water-miscible organic solvents.

Keywords: Biocatalyst; Cytochrome *c*; Heme; Hydrophobicity; Lignin peroxidase; *Phanerochaete chrysosporium*; Organic solvent

1. Introduction

The use of organic solvents in biocatalysis induced a rapidly expanding biotechnological field (Zaks and Klivanov, 1988; Khmelnsky et al., 1988; Dordick, 1989). A biocatalyst placed into non-aqueous medium is subjected to many fac-

tors that can alter its native, aqueous-based structure and function. Physical properties of pure solvents, such as logarithm of the partition coefficient octanol:water ($\log P$), have been used to predict the enzyme behaviour in organic solvent (Laane et al., 1987; Halling, 1990; Manjon et al., 1992). Most of these studies were performed in pure organic solvents containing low amounts of water. However, the $\log P$ cannot be applied for aqueous mixtures containing water-miscible organic solvents.

* Corresponding author. Fax: + 52 73 172388; email: vazq-duh@ibt.unam.mx

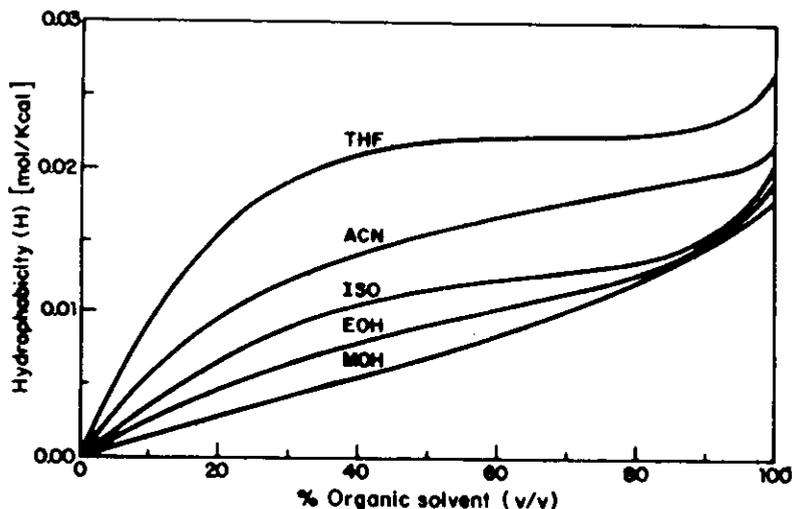


Fig. 1. Hydrophobicity parameter (H) for aqueous mixtures of water-miscible organic solvents. THF, tetrahydrofuran; ACN, acetonitrile; ISO, isopropanol; EOH, ethanol; MOH, methanol.

Increasing concentrations of water-miscible organic solvents into aqueous solutions results in a decrease of enzymatic activity. Threshold concentration (C_{50}) is the organic solvent concentration at which half-inactivation occurs (Khmelnitsky et al., 1988, 1991; Vazquez-Duhalt et al., 1993b). Inactivation at high organic solvent concentration has been correlated with changes of protein structure (Mozhaev et al., 1989; Ryu and Dordick, 1992). Disruption of non-covalent forces, including hydrogen bonding, and ionic, hydrophobic and van der Waals interactions, can lead to decrease in catalytic activity. A mathematical model describing the solvent effect on catalytic activity has been proposed (Khmelnitsky et al., 1991). However, several exceptions have been found, and extensive experimental work should be done to obtain confident thermodynamic predictions (Halling, 1994).

In this work, a new numeric concept for hydrophobicity of water-organic solvent solutions is proposed. This hydrophobicity parameter has correlated with the biocatalytic behaviour of lignin peroxidase and cytochrome *c*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Lignin peroxidase, partially purified, was obtained from Tienzyme Inc. (State College, PA). Cytochrome *c* from horse heart, yeast cytochrome *c*, chloroperoxidase from *Calldariomyces fumago*, human hemoglobin, and pinacyanol chloride were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Pyrene, thianthrene and diphenylamine were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI). Bromophenol blue and protein reagent were obtained from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). The high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade solvents acetonitrile, isopropanol, ethanol, methanol and tetrahydrofuran were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Tetrahydrofuran was distilled in the presence of ferrous sulphate to eliminate peroxides. Buffer salts and hydrogen peroxide were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). Iso-1-cytochrome *c* variants were a gift from Dr. A. Grant Mauk (Department of Biochemistry and

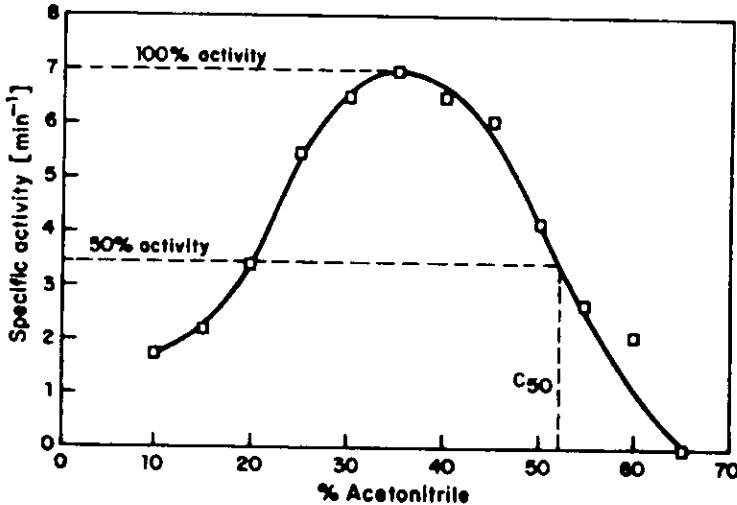


Fig. 2. Threshold concentration (C_{50}) of thianthrene oxidation in acetonitrile by horse heart cytochrome *c* in the presence of hydrogen peroxide.

Molecular Biology, University of British Columbia). Poly(ethylene)glycol-modified cytochrome *c* was prepared as previously reported (Vazquez-Duhalt et al., 1993b) by using activated poly(ethylene)glycol (MW 5000).

2.2. Protein determination

Protein concentrations were estimated by protein measurement with the Bio-Rad procedure and by spectrophotometry using the extinction coefficients, as previously reported (Torres et al., 1995).

2.3. Reaction conditions

Specific activities of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* were estimated in a 1-ml reaction mixture containing from 1.4 to 7.2 nM of enzyme and 20 μM substrate (pyrene, thianthrene, diphenylamine, or bromophenol blue) in 40 mM succinate buffer pH 4.0 with different concentrations of water-miscible organic

solvent. When pinacyanol chloride was used the substrate concentration was 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Reactions were started by adding 40 μM hydrogen peroxide.

Reactions with horse heart cytochrome *c* were performed using from 140 to 440 nM of cytochrome *c* in 60 mM phosphate buffer pH 6.1 with different concentrations of organic solvent. One ml cytochrome reactions were started by adding 1 mM hydrogen peroxide. For chloroperoxidase the buffer solution was 60 mM sodium acetate (pH 3.0). Reactions of all the other hemo-proteins were carried out in 60 mM phosphate buffer (pH 6.1).

The reaction progress was monitored spectrophotometrically as a decrease in absorbance and by using the following extinction coefficient ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 32.6 for pyrene at 335 nm; 35.0 for thianthrene at 254 nm; 13.6 for diphenylamine at 279 nm; 82.35 for pinacyanol chloride at 603 nm; and 77.24 for bromophenol blue at 595 nm. The specific activity is defined as the number of substrate molecules transformed by 1 molecule of protein per time unit.

Table 1
Biocatalytic activity, threshold concentration (C_{50}), solvent (a_s) and water (a_w) activities, and mixture hydrophobicity at C_{50} concentrations (H_{50}) for the biocatalytic oxidation of different substrates by lignin peroxidase and hydrogen peroxide

Substrate/Solvent	Maximum activity (min^{-1})	C_{50} (%v/v)	a_s	a_w	H_{50} ($\mu\text{mol cat}$)
Pyrene					
Tetrahydrofuran	17.5	14.7	0.48	0.97	12.8
Acetonitrile	61.2	19.1	0.43	0.94	9.2
Isopropanol	65.9	18.8	0.31	0.96	6.3
Ethanol	28.2	27.9	0.31	0.91	6.0
Methanol	57.3	21.7	0.17	0.90	2.9
Thianthrene					
Tetrahydrofuran	45.8	18.0	0.55	0.96	14.6
Acetonitrile	97.6	20.1	0.44	0.94	9.6
Isopropanol	60.5	19.6	0.32	0.96	6.5
Ethanol	55.0	26.2	0.31	0.92	5.9
Methanol	39.4	28.1	0.22	0.87	2.9
Diphenylamine					
Tetrahydrofuran	58.4	19.3	0.57	0.96	15.2
Acetonitrile	64.6	24.7	0.50	0.92	6.6
Isopropanol	59.5	25.6	0.39	0.94	8.0
Ethanol	54.3	27.1	0.31	0.99	5.9
Methanol	52.3	18.9	0.14	0.91	2.6
Pinacyanol					
Tetrahydrofuran	274.4	23.0	0.63	0.95	16.9
Acetonitrile	396.3	28.0	0.54	0.92	11.8
Isopropanol	364.1	30.0	0.43	0.93	8.9
Ethanol	304.0	29.3	0.33	0.91	6.3
Methanol	157.5	15.0	0.11	0.93	2.0

2.4. Analytical methods

Substrate hydrophobicity was estimated by HPLC on a Waters (Millipore) system with a UV detector. Substrate hydrophobicity was determined as the elution time on a reverse-phase column Resolve C_{18} 5 μ (3.9×150 mm). The elution solvent was acetonitrile-water (60:40 v/v) at a flow rate of 1 ml/min.

Ligand binding of substrate compounds to cytochrome *c* was detected with the spectrum change as previously reported (Vazquez-Duhalt et al., 1993a). Spectrum change was detected in a Beckman DU-650 spectrophotometer. The sample (1 ml) contained 5 μM cytochrome *c* and 40 μM substrate in phosphate buffer with different proportions of organic solvent. The blank consisted of 5 μM cytochrome in the same organic solvent concentration.

3. Results and discussion

Polarity of pure organic solvent can be estimated by using an empirical parameter described by Dimroth-Reichardt (Reichardt, 1979), $E_T(30)$, which represents the ability of different solvents to solvate polar fragments measured by solvatochromism. This parameter has been derived from the principle of linear relationship between free energies (LFE relationships). The $E_T(30)$ value has been introduced by Khmelnsky et al. (1991) in a thermodynamic model for enzyme denaturation by organic solvents. However, with this model, which also includes $\log P$ value, several exceptions were found. Correlations have been found between $E_T(30)$ value and maximum specific activity of cytochrome *c* (Vazquez-Duhalt et al., 1993b), and a solvent effect parameter (Ryu and Dordick, 1992).

Table 2
Biocatalytic activity, threshold concentration (C_{50}), solvent (a_s) and water (a_w) activities, and mixture hydrophobicity at C_{50} concentrations (H_{50}) for the biocatalytic oxidation of different substrates by cytochrome *c* and hydrogen peroxide

Substrate Solvent	Maximum activity (min ⁻¹)	C_{50} (% v/v)	a_s	a_w	H_{50} (μ mol/cal)
Pyrene					
Tetrahydrofuran	1.0	19.1	0.57	0.96	15.1
Acetonitrile	1.1	28.0	0.54	0.92	11.7
Isopropanol	0.9	27.6	0.41	0.94	8.4
Ethanol	1.6	32.9	0.36	0.88	6.8
Methanol	1.7	27.8	0.21	0.86	3.8
Thianthrene					
Tetrahydrofuran	2.7	36.6	0.77	0.94	20.6
Acetonitrile	7.0	52.2	0.73	0.86	15.9
Isopropanol	6.3	57.8	0.59	0.88	12.2
Ethanol	5.8	60.0	0.53	0.81	10.3
Methanol	6.2	63.7	0.51	0.63	9.1
Diphenylamine					
Tetrahydrofuran	4.5	65.4	0.83	0.93	22.3
Acetonitrile	9.3	58.0	0.76	0.84	16.6
Isopropanol	8.3	61.5	0.60	0.88	12.4
Ethanol	6.7	70.0	0.59	0.76	11.4
Methanol	9.4	67.5	0.54	0.59	9.8
Bromophenol					
Tetrahydrofuran	2.9	62.0	0.83	0.93	22.3
Acetonitrile	4.7	62.5	0.78	0.83	17.0
Isopropanol	5.6	61.0	0.60	0.88	12.4
Ethanol	6.3	59.2	0.53	0.81	10.2
Methanol	4.3	64.9	0.52	0.61	9.3
Pinacyanol					
Tetrahydrofuran	14.1	65.2	0.83	0.93	22.3
Acetonitrile	26.9	73.6	0.84	0.79	18.2
Isopropanol	16.4	64.0	0.61	0.87	12.6
Ethanol	23.4	60.7	0.54	0.81	10.3
Methanol	15.4	75.0	0.62	0.51	11.1

We assume that the solvent polarity is inversely correlated with the solvent hydrophobicity and that, for a water-organic solvent mixture, the hydrophobicity is directly correlated with the organic solvent concentration. This may be expressed by the following equation:

$$H = \frac{a_s}{E_T(30)}$$

where H is the hydrophobicity parameter and a_s is the thermodynamic activity of organic solvent in the mixture. In contrast to concentrations,

thermodynamic activities represent the available amount of organic solvent for the solvate process. The solvent activities (a_s), in aqueous solutions, were determined by using isothermal data for vapor-liquid equilibrium at 25°C, and calculated by NRTL equations (Gmehling et al., 1981). Thus, the hydrophobicity of an aqueous mixture of water-miscible organic solvent could be defined by the organic solvent activity (a_s) divided by the transition energy as Dimroth-Reichardt parameter. Fig. 1 shows the hydrophobicity parameter at different concentrations of organic solvent. In

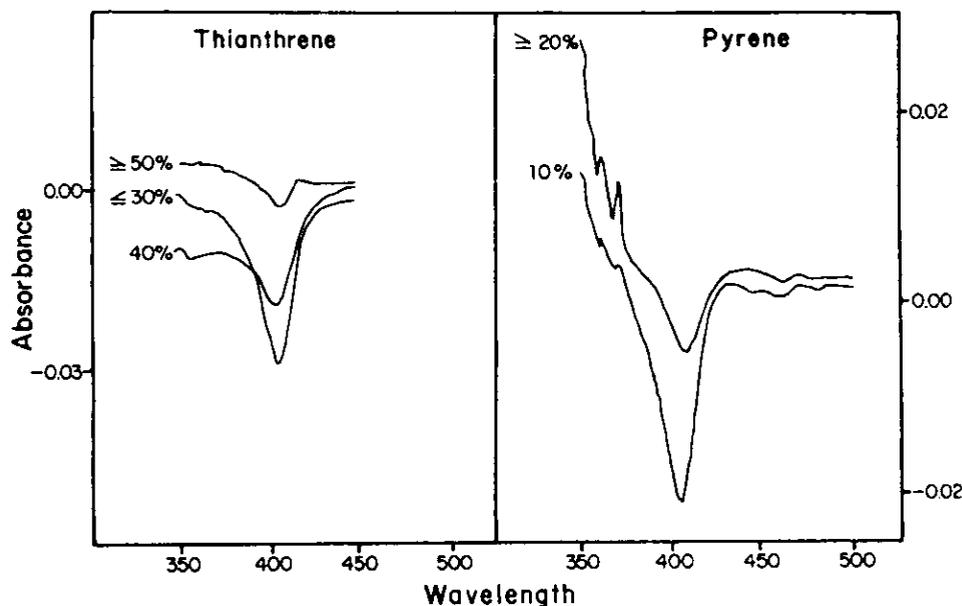


Fig. 3. Difference spectra of cytochrome *c* with thianthrene (A), and pyrene (B). The percentage values represent the tetrahydrofuran concentration in the binding reaction mixture.

contrast to the $\log P$, the hydrophobicity parameter (H) is correlated with the capacity to dissolve hydrophobic compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in aqueous solutions containing water-miscible organic solvents. For example, solutions containing acetonitrile ($\log P = -0.33$) are able to dissolve larger amounts of PAH than isopropanol ($\log P = 0.38$) solutions, beside the lower $\log P$ value. However, at any concentration, in volume basis, the acetonitrile solutions show higher hydrophobicity value (H) than the isopropanol ones (Fig. 1).

Lignin peroxidase and cytochrome *c* biocatalyses were carried out with the aim of testing our hydrophobicity parameter for the prediction of catalytic activity in mixtures containing water-miscible organic solvents. Biocatalytic oxidations of 5 hydrophobic substrates in 5 different water-miscible organic solvents were performed in the presence of hydrogen peroxide. Lignin peroxidase

is able to oxidize hydrophobic substrates such as polycyclic aromatic hydrocarbons to form ketones and hydroxyles (Hammel et al., 1986; Vazquez-Duhalt et al., 1994). Cytochrome *c* showed peroxidase activity (Fujita et al., 1994), and was able to oxidize thiophenes and organosulfide compounds (Vazquez-Duhalt et al., 1993a; Klyachko and Klivanov, 1992) and polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH (Torres et al., 1995). Pyrene, thianthrene, diphenylamine, pinacyanol chloride and bromophenol blue were used as substrates. Tetrahydrofuran, acetonitrile, isopropanol, ethanol and methanol were used as organic solvents. No oxidation was detected when biocatalyst or hydrogen peroxide were added alone.

Hydrophobic substrates showed a threshold behaviour (Fig. 2), in which at low organic solvent concentration, the mass action can limit the biocatalytic activity. When the concentration of organic solvent is increased, the mass transfer

limitation is reduced and the biocatalytic activity reaches its maximum value (100% activity). Significant enhancement of catalytic activity has also been found for some enzymes in systems containing low concentration of water-miscible organic solvents (Khmelnitsky et al., 1988; Batra and Gupta, 1994). Then, an increase of the organic solvent concentration induces a decrease of the biocatalytic activity. Threshold concentration (C_{50}) is defined as the specific organic solvent concentration at which half-inactivation occurs (Fig. 2).

Specific threshold concentrations were found for each substrate using both biocatalysts (Tables 1 and 2). Similarly, differences of C_{50} values were found for each substrate and the water-miscible organic solvent. In general, the lower the solvent hydrophobicity, the higher is the solvent concentration showing activity. On the other hand, the lower substrate hydrophobicity, the higher is the solvent concentration showing activity. Substrate hydrophobicity was determined as the elution time of the compound on HPLC system with a reverse-phase column (see Methods). This method has been used for polarity determination of hydrophobic compounds with $P > 1000$ values (Braun et al., 1986). The obtained values were: pyrene, 16.25; thianthrene, 12.57; diphenylamine, 5.64; bromophenol blue, 0.80; and pinacyanol chloride, 0.76. This behaviour was more conspicu-

Table 3

Maximum specific activities and threshold concentrations (C_{50}) for pyrene oxidation in tetrahydrofuran-water mixtures with different hemoproteins

Hemoprotein	Maximum specific activity (min^{-1})	C_{50} (% vol.)
Chloroperoxidase	2291	19.9
Lignin peroxidase	17.5	14.7
Hemoglobin	1.13	22.1
Horse heart cytochrome <i>c</i>	1.02	21.8
PEG-cytochrome <i>c</i>	15.24	17.9
Yeast iso-1-cytochrome <i>c</i>	3.01	16.8
Phe82Gly variant	5.09	16.8
Lys79Ala variant	2.62	19.4

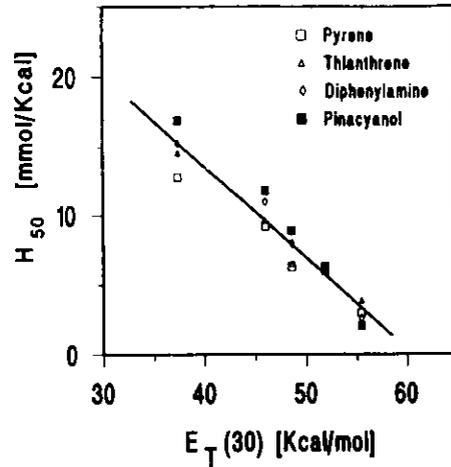


Fig. 4. Lignin peroxidase shows a linear correlation between the hydrophobicity of solvent mixture at C_{50} concentration (H_{50}) and the polarity parameter of pure solvent [$E_T(30)$]. Pure solvent polarities [$E_T(30)$] in kcal/mol are: tetrahydrofuran, 37.4; acetonitrile, 46.0; isopropanol, 48.6; ethanol, 51.9; methanol, 55.5; and water, 63.1 (from Reichardt, 1979).

ous for cytochrome biocatalysis. Tables 1 and 2 also show the maximum specific activities, thermodynamic activities of solvent and water at C_{50} concentrations, and the system hydrophobicities at C_{50} concentration (H_{50}), for lignin peroxidase and cytochrome *c* respectively.

From these results, it seems that the substrate properties are the main factor of the biocatalytic behaviour in organic solvent mixtures. This could be explained by the substrate partitioning between the active site (heme) and the bulk solvent. Substrates can interact with the heme group of cytochrome *c* as ligand (Vazquez-Duhalt et al., 1993a), detected by difference spectra. Fig. 3 shows the difference spectra of horse heart cytochrome *c* with pyrene and thianthrene in different THF concentrations. Pyrene showed a strong interaction at 10% THF and no interaction could be detected at 20% THF. Thianthrene showed an interaction with the heme prosthetic group at 40% THF, while no interaction has been detected at 50% THF. These substrate interactions are corre-

lated with the decrease of activity when the concentration of organic solvent is increased.

Ryu and Dordick (1992), working on phenols oxidation by horseradish peroxidase, suggested that the substrate partitioning into the enzyme's active site in non-aqueous media is solely governed by hydrophobic interactions. We have tried to modify the interaction behaviour by changing the heme pocket in the protein. This was done by using different hemoproteins, and by using site-directed variants of iso-1-cytochrome *c* from *Saccharomyces cerevisiae*. Three variants of yeast cytochrome, three hemoproteins, and two hemoenzymes were tested for threshold concentration of tetrahydrofuran in pyrene oxidation (Table 3). In spite of differences in the nature of residues placed close to heme group (active site pocket) for the different hemoproteins, only slight differences of solvent effect on catalytic activity have been found.

With the aim to find a mathematical model able to predict the solvent effect on biocatalysis, the H_{50} value was used and correlated with the solvent polarity [$E_T(30)$]. A linear correlation has been found for both biocatalysts, lignin peroxi-

dase and cytochrome *c* (Figs. 4 and 5). This correlation can predict the H_{50} value for all solvents and all substrates, as follows:

$H_{50} = 39.9 - 0.66 E_T(30)$ for lignin peroxidase

$H_{50} = 46.7 - 0.69 E_T(30)$ for cytochrome *c*.

Moreover, in both cases the line projection to a hydrophobicity value of zero ($H = 0$), which corresponds to 100% water in the system ($a_s = 0$), matched with the $E_T(30)$ value for water (61.3 kcal/mol).

Thus, our hydrophobicity value (H) seems to be a good solvent parameter for aqueous mixtures containing water-miscible organic solvent. On the other hand, the substrate partitioning between active site and bulk solvent may determine the catalytic behaviour in systems containing organic solvents. This substrate partitioning may determine the C_{50} value before changes of protein structure leading to the inactivation. Biocatalytic oxidation of hydrophobic compounds cannot be envisaged without a favourable substrate partitioning between active site and bulk solvent.

Acknowledgements

This work was supported by the National Council for Science and Technology of Mexico (Grant CONACyT 4217A-9405) and by DGAPA (Grant IN214594/UNAM). Acknowledgement is made to Prof. A. Grant Mauk from the University of British Columbia, Canada for donation of iso-1-cytochrome *c* variants. We thank Maria Piedad Diaz (MSc) from Colombian Petroleum Institute for technical assistance.

References

- Batra, R. and Gupta, M.N. (1994) Enhancement of enzyme activity in aqueous-organic solvent mixture. *Biotechnol. Lett.* 16, 1059–1064.
- Braun, B.S., Benbow, U., Lloyd-Williams, P., Bruce, J.M. and Dutton, P.L. (1986) Determination of partition coefficients of quinones by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* 125, 119–129.
- Dordick, J.S. (1989) Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 194–211.

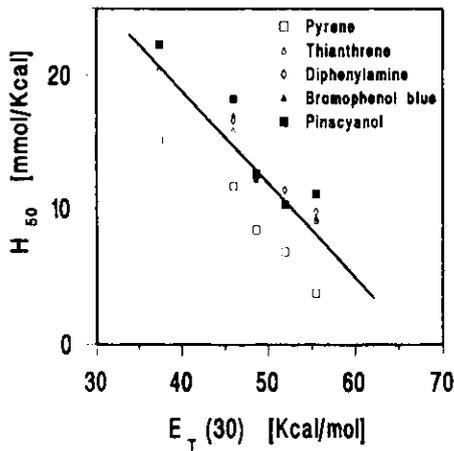


Fig. 5. Cytochrome *c* shows a linear correlation between the hydrophobicity of solvent mixture at C_{50} concentration (H_{50}) and the polarity parameter of pure solvent [$E_T(30)$]. Pure solvent polarities are shown in Fig. 4 legend.

- Fujita, A., Senzu, H., Kunitake, T. and Hamachi, I. (1994) Enhanced peroxidase activity of cytochrome *c* by phosphate bilayer membrane. *Chem. Lett.* 1219-1222.
- Gmelhing, J., Onken, U. and Aitl, W. (1981) Vapor-Liquid Equilibrium Data Collection. 1a. DECHEMA Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Frankfurt, Germany.
- Halling, P.J. (1990) Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: predictions of effects on equilibrium position. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 691-701.
- Halling, P.J. (1994) Thermodynamic predictions for biocatalysis in non-conventional media: theory, test, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 178-206.
- Hammel, K.E., Kalyanaraman, B. and Kirk, T.K. (1986) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzol(p)dxoms by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261, 16948-16952.
- Khmelnitsky, Y.L., Levashov, A.V., Klyachko, N.L. and Martinek, K. (1988) Engineering biocatalytic system in organic media with low water content. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 710-724.
- Khmelnitsky, Y.L., Belova, A.B., Levashov, A.V. and Mozhaev, V.V. (1991) Relationship between surface hydrophobicity of a protein and stability against denaturation by organic solvents. *FEBS Lett.* 284, 267-269.
- Klyachko, N.L. and Klivanov, A.M. (1992) Oxidation of dibenzothiphene catalysed by hemoglobin and other hemoproteins in various aqueous-organic solvent media. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 37, 53-68.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Vecger, C. (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 81-87.
- Manjon, A., Obon, J.M., Canovas, M. and Iborra J.L. (1992) Correlations between enzyme activity, water activity and log *P* in one-liquid-phase system. In: Tramper, J., Vermue, M.H., Beelink, H.H. and von Stockar, U. (Eds.), *Biocatalysis in Non-Conventional Media*. Elsevier Science Publishers, Holland, pp. 121-127.
- Mozhaev, V.V., Khmelnitsky, Y.L., Sergeeva, M.V., Belova, A.B., Klyachko, N.L., Levashov, A.V. and Martinek, K. (1989) Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic co-solvent mixtures. *Eur. J. Biochem.* 184, 597-602.
- Reichardt, C. (1979) Empirical parameter of solvent polarity as linear free-energy relationships. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18, 98-110.
- Ryu, K. and Dordick, J.S. (1992) How do organic solvents affect peroxidase structure and function. *Biochemistry* 31, 2588-2598.
- Torres, E., Sandoval, J.V., Rosell, F.J., Mauk, A.G. and Vazquez-Duhalt, R. (1995) Site-directed mutagenesis improves the biocatalytic activity of iso-1-cytochrome *c* in polycyclic hydrocarbon oxidation. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 1014-1020.
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S. and Fedorak, P.M. (1993a) Cytochrome *c* as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 494-499.
- Vazquez-Duhalt, R., Semple, K.M., Westlake, D.W.S. and Fedorak, P.M. (1993b) Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of cytochrome *c*. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 936-943.
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S. and Fedorak, P.M. (1994) Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 459-466.
- Zaks, A. and Klivanov, A.M. (1988) Enzymatic catalysis in non-aqueous solvents. *J. Biol. Chem.* 263, 3194-3201.

Thermodynamic hydrophobicity of aqueous mixtures of water-miscible organic solvents predicts peroxidase activity

Eduardo Torres ^a, Barabara Siminovich ^a, Eduardo Barzana ^b, Rafael Vazquez-Duhalt ^{a*}

^a Biotechnology Institute U.N.A.M., Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

^b Faculty of Chemistry U.N.A.M., Mexico D.F., Mexico

Received 7 July 1997; accepted 13 August 1997

Abstract

The effect of different water-miscible organic solvents on biocatalytic activities of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* and horseradish peroxidase was determined. A new hydrophobicity parameter for water-organic solvent mixtures was used to predict the enzyme behavior. This thermodynamic concept of hydrophobicity also describes the catalytic behavior of three other biocatalysts with peroxidase activity. So far, all reported data of peroxidase activity in increasing concentrations of water-miscible organic solvents are effectively predicted by the thermodynamic model presented in this work. © 1997 Elsevier Science B.V.

1. Introduction

Enzymatic catalysis in organic solvents has opened a new field in the biotechnological applications of proteins [1–3]. Four main advantages could be obtained by using organic solvents in catalytic systems: (a) Hydrophobic substrates that have a serious mass transfer limitation in aqueous systems could be biotransformed, such as polycyclic aromatic hydrocarbons [4] and asphaltenes [5]. (b) Reactions which are thermodynamically impossible in aqueous systems could be performed in organic solvents, such as peptide synthesis by proteases [6], transesterification by lipases [7], and condensation of

glucose by glucosidase to obtain disaccharides [8]. (c) In a low water media several enzymes are more thermostable than in aqueous systems, allowing the performance of biocatalytic reactions at high temperature [9]. (d) Finally, from an industrial point of view, products and enzyme recovery after reaction could be easier from organic solvents than from water, because of the high vapor-pressure of organic solvents.

During the last decade several studies have been focused on the use of physical properties of solvents to predict the catalytic behavior of enzymes in organic solvents [10–14]. The most common being the logarithm of the partition coefficient octanol/water ($\log P$) of pure solvent. Nevertheless, this parameter is far from being general [8], and it cannot be applied for aqueous mixtures containing water-miscible organic solvents. In this work, the biocatalytic

* Corresponding author. Biotechnology Institute U.N.A.M., Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico. Fax: +52-73-172388.

behavior of ~~five~~ ^{four peroxidases and cytochrome c} peroxidases is correlated with a new hydrophobicity parameter.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Purified chloroperoxidase ($R_2 = 1.41$) from *Caldariomyces fumago* was a gift from Professor M.A. Pickard (University of Alberta, Canada). Horseradish peroxidase, pyrene, hydrogen peroxide and guaiacol were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO). HPLC-grade solvents, tetrahydrofuran, acetonitrile, isopropanol, ethanol, and methanol, were purchased from Fisher Scientific (Springfield, NJ). Buffer salts were obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ).

2.2. Reaction conditions

Chloroperoxidase activity was estimated in 1 ml reaction mixture containing 20 (mM) pyrene, 20 mM KCl and different proportions of water-miscible organic solvents in 60 mM acetate buffer pH 3.0. The reaction was started by adding 0.25 mM hydrogen peroxide, and monitored at 335 nm. The specific activity was determined by using an extinction coefficient of 32.6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ for pyrene [4]. Activity of horseradish peroxidase was estimated as the absorbance increase at 470 nm in 1 ml reaction mixture containing 16 mM guaiacol, 1 mM hydrogen peroxide, and different proportions of water-miscible organic solvents in a 60 mM phosphate buffer pH 6.1 [15].

Table I
Threshold concentration (C_{50}), organic solvent activity and hydrophobicity of the solvent system at C_{50} concentrations (H_{50}) for the peroxidase activity in water-organic solvent media

Enzyme	Organic solvent	C_{50} (%v/v)	Ref.	a_4	H_{50} ($\mu\text{mol}/\text{cal}$)
Chloroperoxidase	tetrahydrofuran	17.0	this work	0.52	13.9
	acetonitrile	18.5	this work	0.42	9.1
	isopropanol	32.5	this work	0.43	8.8
	ethanol	22.0	this work	0.25	4.8
	methanol	26.0	this work	0.20	3.6
Horseradish peroxidase	tetrahydrofuran	18.0	this work	0.55	14.7
	acetone	35.0	[19]	0.48	11.4
	acetonitrile	20.0	this work	0.44	9.6
	methanol	31.0	[19]	0.15	2.7
	ethylene glycol	3.4	[19]	0.13	2.3
Lignin peroxidase	tetrahydrofuran	14.7	[16]	0.48	12.8
	acetonitrile	19.1	[16]	0.43	9.2
	isopropanol	18.8	[16]	0.31	6.3
	ethanol	27.9	[16]	0.31	6.0
	methanol	21.7	[16]	0.17	2.9
Lactoperoxidase	acetone	35.0	[19]	0.48	11.4
	methanol	35.0	[19]	0.17	3.1
	ethylene glycol	36.0	[19]	0.14	2.5
Cytochrome c	tetrahydrofuran	19.1	[16]	0.57	15.1
	acetonitrile	28.0	[16]	0.54	11.7
	isopropanol	27.6	[16]	0.41	8.4
	ethanol	32.9	[16]	0.36	6.8
	methanol	27.8	[16]	0.21	3.8

3. Results and discussion

Organic solvent concentrations at which half of the maximum activity is obtained (C_{50}) were determined for chloroperoxidase and horseradish peroxidase in different aqueous mixtures of water-miscible organic solvents (Table 1). In addition, literature data of four other enzymes (lignin peroxidase, horseradish peroxidase, lactoperoxidase, and cytochrome c) have been used.

In a recent study we have proposed a new hydrophobicity parameter for water-organic solvent mixtures [16]. This hydrophobicity concept (H) was obtained considering the substrate partitioning between the active site of the enzyme and the bulk solvent mixture (Fig. 1). Increasing the solvent hydrophobicity (H), the substrate is partitioned preferably from the active site toward the solvent, reducing the biocatalytic activity. Substrate interaction with active site of the enzyme decreases when hydrophobicity of the solvent is increased [16]. This new hydrophobicity parameter (H) is directly correlated with the thermodynamic activity of the organic solvent (a_s) in the mixture, and inversely correlated with the solvent polarity [$E_T(30)$]:

$$H = \frac{a_s}{E_T(30)}$$

We have used thermodynamic activities, for different organic solvent concentrations (a_s), determined from isothermal data for vapor-liquid equilibrium at 25°C, and calculated by the NRTL equations [17]. In contrast to concentrations, thermodynamic activities represent the

available amount of organic solvent that participates in the total hydrophobicity of the system. Thermodynamic activity of solvent ($a_s = \gamma_s[X_s]$) in an aqueous solution of a water-miscible organic solvent at any concentration can be determined by the NRTL equation:

$$\ln \gamma_s = X_w^2 \left[\frac{A_2}{RT} \left(\frac{e^{-\alpha(A_2/RT)}}{X_s + X_w e^{-\alpha(A_2/RT)}} \right)^2 + \frac{(A_1/RT)e^{-\alpha(A_1/RT)}}{(X_w + X_s e^{-\alpha(A_1/RT)})^2} \right]$$

in which γ_s is the activity coefficient of the solvent, X_w and X_s are the molar fractions of water and organic solvent, respectively, R is the gas constant in cal/mol · K, T is the temperature in K, α is the nonrandomness parameter, and A_1 and A_2 are parameters for the interaction between components (water and organic solvent). The parameters for the NRTL equation; A_1 , A_2 , and α are available in the literature for several aqueous-organic systems [17].

Organic solvent polarity was estimated by the Dimroth-Reichardt parameter [$E_T(30)$], which is an empirical parameter for solvent polarity and is directly related to the free energy (ΔG) of the solvation process [18]. This solvatochromic parameter includes the total sum of the interactions between the solute and the solvent molecules by measuring the change in the molecular structure of a dye in different solvents. The solvent polarity parameter is obtained from the change in the electron transition energy of a negatively solvatochromic dye (Re-

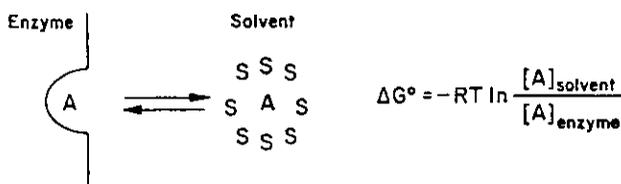


Fig. 1. Substrate partitioning between the active site of enzyme and bulk solvent.

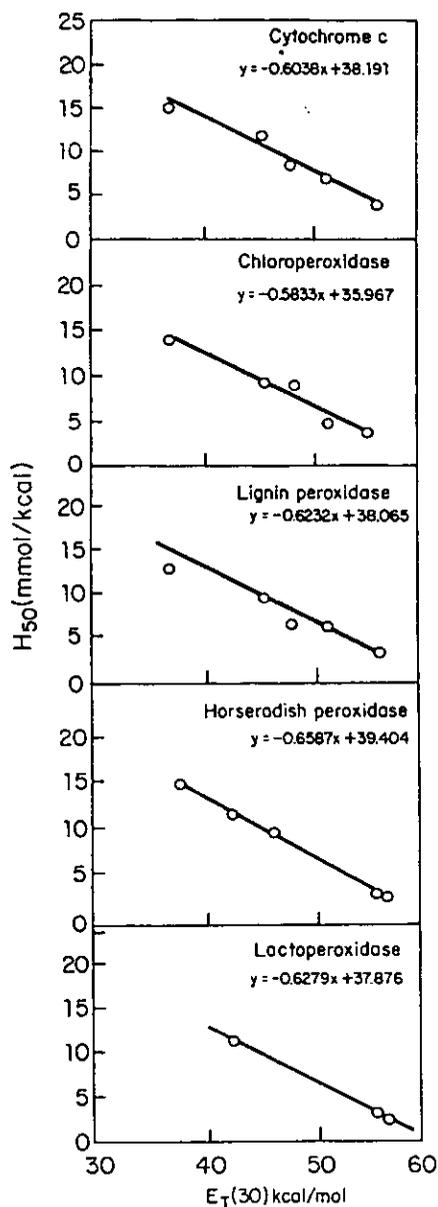


Fig. 2. Linear correlation between the hydrophobicity of solvent mixture at C_{50} concentration (H_{50}) and the polarity parameter of the organic solvent ($E_T(30)$). Pure solvent polarities, $E_T(30)$, in kcal/mol are: Tetrahydrofuran, 37.4; acetone, 42.2; acetonitrile, 46.0; isopropanol, 48.6; ethanol, 51.9; methanol, 55.5; and ethylene glycol, 56.3 (from Reichardt [18]).

ichard's dye), which is a pyridiniophenolate. The transition energies $\{E_T(30)\}$ can be used directly as empirical parameters of the solvent polarity [18] and were calculated with the following equation:

$$E_T(30) \text{ [kcal/mol]} = h\nu N = h\left(\frac{c}{\lambda}\right)N$$

in which h is Planck's constant, ν is the light frequency, c is the velocity of light, λ is the wavelength, and N is Avogadro's number.

Table 1 shows the values of H_{50} , which is the hydrophobicity of the solvent system in which half of the maximum peroxidase activity is found. In other words, it is the hydrophobicity of a solvent system at the C_{50} concentration. Fig. 2 shows that a linear correlation has been found for all peroxidases and for cytochrome *c* between the value of H_{50} and the solvent polarity $\{E_T(30)\}$. This linear correlation has also been obtained for different substrates, including pyrene, in the cases of lignin peroxidase and cytochrome *c* [16]. Our results show that threshold concentrations H_{50} of horseradish peroxidase, chloroperoxidase, and lactoperoxidase can also be predicted for all solvents and substrates, as follows:

$$H_{50} = b - a[E_T(30)]$$

Thus, this new hydrophobicity parameter, which is defined by both the thermodynamic activity of the organic solvent and the solvent polarity, predicts the biocatalytic behavior of four peroxidases and cytochrome *c* in systems containing water-miscible organic solvents. So far, all available data of peroxidase reactions in water-miscible organic solvents fit the proposed math-

ematical model showing excellent correlation coefficients.

Acknowledgements

This work was funded by DGAPA-UNAM Grant 21459 and Conacyt Grant 4217A.

References

- [1] A. Zaks, A.M. Klibanov, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 3194.
- [2] Y.L. Khmeinitzky, A.V. Levashov, N.L. Klyachko, K. Martinek, *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988) 710.
- [3] J.S. Dordick, *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989) 194.
- [4] R. Vazquez-Duhalt, D.W.S. Westlake, P.M. Fedorak, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 459.
- [5] P.M. Fedorak, K.M. Seniple, R. Vazquez-Duhalt, D.W.S. Westlake, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 429.
- [6] H. Kise, A. Hayakawa, *Enzyme Microb. Technol.* 13 (1991) 584.
- [7] W. Chulalaksananukul, J.S. Condorcet, D. Combes, *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 293.
- [8] V. Laroute, R.M. Willemont, *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 528.
- [9] A. Zaks, A.M. Klibanov, *Science* 224 (1984) 1249.
- [10] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 81.
- [11] P.J. Halling, *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1990) 691.
- [12] Y.L. Khmeinitzky, V.V. Mozhaev, A.B. Belova, M.V. Sergeeva, K. Martinek, *Eur. J. Biochem.* 198 (1991) 31.
- [13] A. Manjon, J.M. Obon, M. Canovas, J.L. Iborra, in: J. Tramper, M.H. Vermue, H.H. Beekink, U. von Stockar (Eds.), *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, Elsevier Science Publishers, Holland, p. 121.
- [14] P.J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 178.
- [15] R. Vazquez-Duhalt, P.M. Fedorak, D.W.S. Westlake, *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 837.
- [16] E. Torres, R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, *J. Biotechnol.* 49 (1996) 59.
- [17] J. Gmehling, U. Onken, W. Arlt, *Vapor-Liquid Equilibrium Data Collection. 1a. DECHEMA Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatuswesen, Frankfurt, Germany, 1981.*
- [18] C. Reichardt, *Angew. Chem. int. Ed. Engl.* 18 (1979) 98.
- [19] K. Sato, H. Hasumi, A. Tsukidate, J. Sakurada, S. Nakamura, T. Hosoya, *Biochim. Biophys. Acta* 1253 (1995) 94.