172

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago* EN SISTEMAS CON SOLVENTES ORGANICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

KAREM ZUÑIGA SANCHEZ

MEXICO, D.F. 2002

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	**Profra:**	**Marina Gavilanes Ruiz**
Vocal	**Prof.**	**Simón Hernandez Ortega**
Secretario	**Prof.**	**Eduardo Torres Ramírez**
1er Suplente	**Prof.**	**Ismael Bustos Jaimes**
2do Suplente	**Prof.**	**José Pedraza Chaverri**

INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO
PROGRAMA: Biotecnología del Petróleo

ASESOR: **Dr. Eduardo Torres Ramírez** E. Torres. R.

SUSTENTANTE: **Karem Zúñiga Sánchez**

DEDICATORIAS

"Pues has oído mi voz y mis suplicas;
porque has inclinado a mi tu oído.
Ahora pagaré mis votos a mi Señor,
Delante de todo su pueblo" Salmo 116:1,2,14

A mis Padres, por todo lo que hacen cada día, por todo el cariño, por todo el esfuerzo que ha implicado tantos años.....

A ti, a quien admiro y con quien descubrí que el carácter se forja en la adversidad. A ti, que me haces creer en la magia de una ilusión

A todos ustedes, con los que reí, con los que llore, a los que ame y con los que existe un lazo, quizás presente, quizá olvidado, pero no roto.

La mayor parte de los sueños se olvidan, pero este quedo grabado en mi memoria. Debo creerlo.
Debo de confiar en Dios.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México recinto de ideales, pensamientos y acciones que han forjado la juventud que enorgullece una gran Nación.

A la Facultad de Química, parte de mi vida profesional y de mi existir.

Al Instituto Mexicano del Petróleo, por permitirme hacer realidad un sueño pero con especial cariño al Dr. Eduardo Torres Ramírez por haberme soportado.

INDICE GENERAL

	Pag
Indice General	5
Indice de Tablas	7
Indice de Figuras	8
NOMENCLATURA	10
RESUMEN	11
Capítulo I ANTECEDENTES	13
• Problemática del azufre en el Petróleo	13
• Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*	20
• Ambiente proteico Hemo	23
• Reacciones de oxidación de la cloroperoxidasa	25
• Enzimología en medios no convencionales	27
• Modelos termodinámicos para predecir comportamiento biocatalítico en medios con solventes orgánicos	33
• Limitaciones de las peroxidasas en la oxidación de sustratos hidrofóbicos	39
Capítulo II OBJETIVOS	42
Capítulo III DIAGRAMA DE FLUJO	43
Capítulo IV MATERIAL Y METODOS	46
• Reactivos	46
• Determinación de proteina	47
• Actividad Catalítica y Específica	47
• Identificación del producto de reacción	48
• Determinación de la actividad termodinámica	49
• Determinación de alteraciones en la conformación proteica en solventes orgánicos	
* Espectrofluorometria	50
* Calculo del CEM	50
* Espectrofotometría	50

- Inmovilización de CPO 51
- Modificación química 52
- Preparación de la enzima para Fluidos supercríticos 52
- Biocatálisis en Fluidos supercríticos 52

Capítulo V
RESULTADOS Y DISCUSION **54**

- Capacidad de oxidación de la cloroperoxidasa (CPO) 54
- Identificación del producto de reacción 56
- Actividad catalítica y específica de la cloroperoxidasa de *C. fumago* en mezclas acuosas con solventes orgánicos 60
- Actividad enzimática experimental frente a modelos termodinámicos 64
- Actividad enzimática versus conformación estructural en sistemas con solventes orgánicos 69
- Alternativas en el mejoramiento de la biocatálisis
  - * Inmovilización 76
  - * Modificación química 78
  - * Fluidos supercríticos 80

Capítulo VI
CONCLUSIONES **82**

Capítulo VII
REFERENCIAS **84**

INDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre	Pag
I	Oxidación de dibenzotiofeno (DBT) catalizado por hemoproteínas	18
II	Oxidación de organoazufrados por la cloroperoxidasa (CPO)	19
III	Algunas reacciones catalizadas por CPO en presencia de H_2O_2	26
IV	Reacciones enzimáticas en sistemas con solventes orgánicos	27
V	Efectos generales de los solventes orgánicos en la biocatálisis	28
VI	Reacciones enzimáticas en fluidos supercríticos	38
VII	Valores de las constantes de equilibrio vapor- líquido de los sistemas monofásicos bicomponentes utilizados	49
VIII	Condiciones probadas para fluidos supercríticos	53
IX	Valores de actividad óptima de agua y de solvente para la biocatálisis	63
X	Comparación de la λ_{max} de los espectros de absorción de la cloroperoxidasa por fluorometría en diferentes solventes.	69
XI	Valores de λ_{max} e I_{max} de la CPO a diferentes concentraciones de urea	71
XII	Comparación de la λ_{max} del grupo hemo en los diferentes solventes ensayados.	74
XIII	Resultados de Fluidos supercríticos. En la parte izquierda se muestran los resultados de la actividad específica de la CPO frente a pireno. En la derecha se dan los valores de área del sustrato (4,6 DMDBT)por HPLC posterior a la biocatálisis en FSC.	81

INDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Pag.
1	Vías metabólicas aerobia y anaerobia, para la desulfuración del DBT	16
2	Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*	20
3	Ciclo catalítico de la cloroperoxidasa (CPO)	22
4	Ferroprotoporfirina IX, grupo prostético de las cloroperoxidasas	24
5	Actividades catalíticas de la cloroperoxidasa de *C. fumago*	25
6	Diagrama de Fluidos supercríticos	37
7	Representación del concepto de concentración umbral (C_{50}) en la oxidación de tiantreno y en acetonitrilo por citocromo C de corazón de caballo en presencia de peróxido de hidrógeno.	40
8	Efecto de la concentración de THF y la hidrofobicidad del sustrato en la biocatálisis con citocromo C	41
9	Esquema de equipo de Extracción usado para sistemas en condiciones supercríticas	53
10	Oxidación del 4,6 DMDBT en función de la concentración de enzima	54
11	Cinética de desaparición del 4,6 DMDBT por acción de CPO	55
12	Cromatograma por HPLC de reacción. En el recuadro se muestra el espectro de absorción del producto de reacción	56
13	Cromatograma de análisis por Cromatografía de Gases	58
14	Cromatograma de análisis por Espectrometría de Masas	59
15	Comparación de actividad específica de CPO constante en diferentes solventes	60
16	Correlación de C_{50} experimental frente al logaritmo de coeficiente de partición (log P) de los solventes utilizados	64

17	Correlación de C_{50} experimental frente a los valores de $E_T[30]$ reportados para los solventes utilizados	65
18	Comparación entre el C_{50} experimental y el valor de C_{50} obtenido a partir de DC (Capacidad de desnaturalización)	66
19	Correlación entre los valores de C_{50} experimentales y los calculados a partir del parámetro de Hidrofobicidad	67
20	Correlación entre el C_{50} experimental y el C_{50} calculado con el modelo de Coeficiente de Solubilidad	68
21	Correlación entre el Centro Espectral de Masas (CEM) y la actividad específica (min-1)	70
22	Efecto de la concentración de urea sobre la estructura enzimática de la cloroperoxidasa de C. *fumago*	71
23	Estudio de la desnaturalización de la enzima sobre la actividad de la cloroperoxidasa	73
24	Efecto de la hidrofobicidad del sustrato sobre la biocatálisis por la cloroperoxidasa de C. *fumago*	75
25	Esquematización de reacción de acoplamiento de affi-gel 15 con los grupos amino libres de la enzima	76
26	Esquematización de reacción de acoplamiento de affi-gel 102 con los grupo carboxilo libres de la cloroperoxidasa	77
27	Esquematización de la modificación química realizada a la CPO con PEG	79

NOMENCLATURA

4,6 DMDBT	4,6 dimetildibenzotiofeno
ABTS	2,2'-Azino- bis- (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfonico) sal diamonio
ACN	Acetonitrilo
a_s	Actividad de Solvente
a_w	Actividad de Agua
BDS	Desulfuración biocatalítica
C_{50}	Concentración de solvente a la cual la actividad catalitica disminuye a la mitad
CEM	Centro Espectral de Masas
CPO	Cloroperoxidasa
CS	Coeficiente de Solubilidad
DBT	Dibenzotiofeno
DC	Capacidad de Desnaturalización
DMF	N, N dimetilformamida
EDAC	etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodimida
$E_T[30]$	Parámetro de Dimroth-Reichard
EtOH	Etanol
FSC	Fluidos supercríticos
H	Hidrofobicidad
HPA´s	Hidrocarburos poliaromáticos
H_{50}	Hidrofobicidad a la C_{50}
ISO	Isopropanol
Log P	Logaritmo del Coeficiente de Partición en un sistema agua-1-octanol.
MeOH	Metanol
PEG_{350}	Polietilenglicol de 350 Da.
T_c, P_c	Temperatura y Presión critica
THF	Tetrahidrofurano
λ_{max}	Longitud máxima de absorción

RESUMEN

A fin de desarrollar tecnologías útiles a la problemática del alto contenido de azufre existente en el crudo Mexicano se realizó un estudio con la enzima del hongo *Caldaryomices fumago*, en medios acuosos con solventes orgánicos. Con dicho estudio se determinó la capacidad de oxidación de compuestos organoazufrados recalcitrantes presentes en el crudo mexicano por dicha enzima, encontrando que en sistemas con concentraciones de hasta del 85 porciento de solvente se presentó actividad.

A partir de los resultados experimentales y de la correlación con algunos parámetros termodinámicos (Capacidad de Desnaturalización, Coeficiente de Solubilidad e Hidrofobicidad) se determinó que el comportamiento de la enzima en sistemas con solventes orgánicos puede ser explicado por la disminución de las interacciones hidrofóbicas, las cuales son necesarias para llevar a cabo la biocatálisis.

Asimismo, se realizaron diferentes pruebas espectroscópicas que sugirieron que el efecto de los solventes sobre la estructura no es determinante en la actividad catalítica; sin embargo, la modificación biocatalítica de sustratos hidrofóbicos por CPO es dependiente de la partición del sustrato entre el sitio activo de la hemoproteína y el solvente orgánico.

Con base en la habilidad que presentó la hemoproteína en medios con solventes, se plantearon alternativas para mejorar la capacidad catalítica de la enzima como la inmovilización de la enzima en soportes resistentes a solventes, la modificación química de la misma con polietilenglicol y por último el uso de fluidos en condiciones supercríticas, encontrándose que las condiciones ensayadas no permitieron oxidar al 4,6 DMDBT.

Capítulo I

ANTECEDENTES

Problemática del Azufre en el Petróleo

La energía, en todas sus formas, es la fuerza motora de las sociedades modernas e industrializadas. Es por ello que en nuestro país, bajo cualquier escenario, y de acuerdo con el grado de evolución de la tecnología de fuentes alternativas, se prevé que, en los próximos 25 años, alrededor del 70% de la energía será provista por los hidrocarburos.

En México, la industria petrolera se mantiene como principal fuente de suministro de energía siendo la extracción total de petróleo crudo al año 2000, de tres millones de barriles por día, sin embargo para mejorar la calidad de este energético es necesario limitar el contenido de azufre presente bajo la forma de muy variados tipos de compuestos. En el análisis de los compuestos de azufre contenidos en una muestra de crudo, se encuentran cuarenta y tres diferentes compuestos orgánicos de azufre, siendo los mercaptanos y tiofenos, los tipos de compuestos encontrados en mayor concentración. Se ha encontrado que en los gaseolos, los benzotiofenos son los compuestos más comunes. En general, se observa que al aumentar el peso molecular de la fracción de petróleo que se estudia, aumenta la proporción de tiofenos, mismos que constituyen el tipo de compuestos más difícil de descomponer (Maldonado y Campero, 1973).

Arriba del 70% del azufre de algunos crudos de Texas ha sido identificado como componente del dibenzotiofeno (DBT), y en varios crudos del Medio Este, benzo y dibenzotiofenos sustituidos constituyen más del 40% del azufre orgánico. La ubicuidad de derivados aromáticos de tiofeno en virtualmente todos los crudos ha permitido el uso del DBT como un compuesto modelo en investigaciones de desulfuración de aceites crudos (Aguilar, 1997).

Estos constituyentes llamados en forma general hidrocarburos poliaromáticos (HPA's), son compuestos contaminantes dañinos al planeta debido a las emisiones por combustión de importantes cantidades de azufre en forma de compuestos orgánicos, o bien en forma de partículas, óxidos de azufre y ácidos que además presentan potenciales efectos tóxicos y carcinogénicos (Black, *et al.*, 1983; Kusk, 1981; Pipe y More, 1986; Savino y Tanabe, 1984).

Debido a la preocupación por estas emisiones, se han elaborado diversas regulaciones en varias partes del mundo para reducirlas. En México normas como la NOM-086-ECOL (1994) regulan el contenido máximo de azufre en los combustibles ligeros; paralelamente se fortalecen estandares internacionales de calidad como la ISO 14001 (1996), con lo que se prevé disminuir a 300 partes por millón el contenido de azufre para el año 2004 y a 50 partes por millón después del 2010, lo cual justifica el interés por tecnologías que permitan disminuir el contenido de azufre en los combustibles.

En la actualidad, las técnicas usadas para la eliminación de azufre son: la **Extracción con solvente**, que puede eliminar moléculas enteras azufradas de las corrientes de hidrocarburos, sin embargo este método no es económicamente factible para eliminar el azufre de fracciones pesadas de petróleo debido a grandes pérdidas del producto; otra es por **Adsorción en mallas moleculares**, ampliamente utilizada para eliminar compuestos de azufre del gas natural, así como hidrocarburos, gasolinas y mercaptanos ligeros, sulfuros y disulfuros; por último la **Hidrodesulfuración catalítica** que implica la reacción de compuestos de azufre con hidrógeno en presencia de un catalizador metálico, resultando en la descomposición de los primeros en ácido sulfhídrico e hidrocarburo libre de azufre (McKetta,1980).

Recientemente, la industria petrolera se ha interesado en procesos como la **Desulfuración biocatalítica** (**BDS**, por sus siglas en inglés), que presenta muchas ventajas frente a la desulfuración tradicional, el cual se basa en la capacidad de los microorganismos de emplear los compuestos organoazufrados de los hidrocarburos como fuente de azufre y utilizarlo en sus procesos metabólicos. Entre los microorganismos reportados con la capacidad de realizar este proceso, se encuentran *Pseudomonas cepacia, Pseudomonas stutzeri, Rhodococcus rhodochrous, Corynebacterium sp., Mycobacterium sp., Arthrobacter sp., Desulfuvibrio desulfuricans, Desulfotomaculum orientis* y *Thermodesulfobacterium commune* (Boldrin *et al.*, 1993; Griffoll *et al.*, 1995; Grimberg *et al.*, 1996), así como algunos hongos como *Phanerocheate leavis, Phanerocheate chrysosporium* y *Plearotus ostreatus* (Bezalel et al., 1996; Bogan y Lamar, 1995; Bogan y Lamar, 1996).

Dichos microorganismos pueden realizar la desulfuración, en condiciones aerobias o anaerobias, según sean las características metabólicas del mismo. En el primer caso la degradación oxidativa del azufre ocurre cuando los compuestos azufrados se emplean como donadores de electrones, es decir, el compuesto azufrado sufre una oxidación, en tanto que en el segundo los microorganismos tienen la capacidad de obtener energía a través de la reducción del azufre del compuesto organoazufrado a H_2S que es excretado al medio (Figura 1).

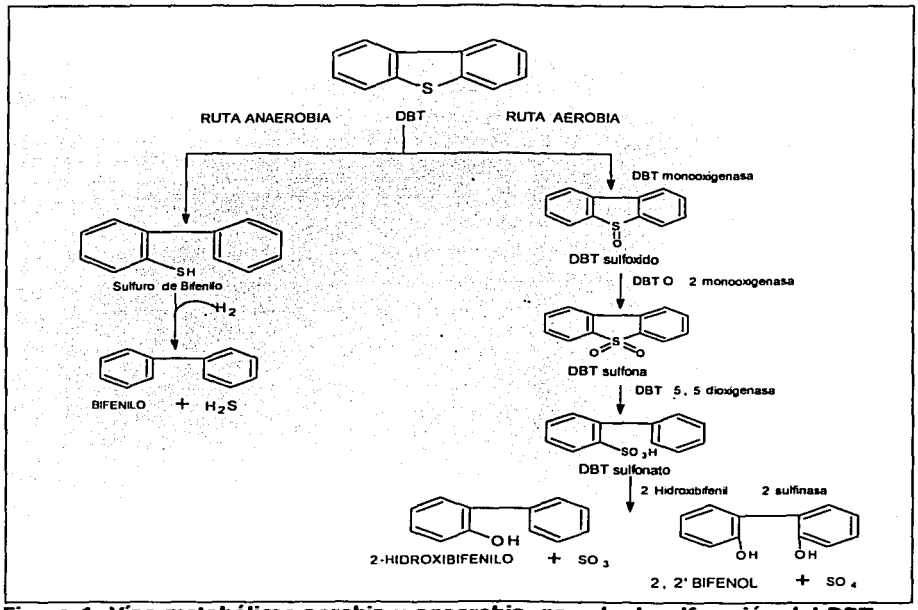


Figura 1. Vías metabólicas aerobia y anaerobia, para la desulfuración del DBT (Grossman,1995)

Entre las ventajas de este tipo de proceso se incluyen, bajos costos tanto de capital como de operación, así como condiciones de operación "suaves", es decir, baja presión y temperatura y no requerir hidrógeno por vía aerobia. Sin embargo, se presentan inconvenientes técnicos como el de remover el azufre dejando esencialmente intacto el hidrocarburo, ésto se debe a que los microorganismos degradan los anillos de carbono adyacentes al azufre presente en la misma molécula. También esta el problema de biodisponibilidad, en el que siendo los HPA's compuestos con un alto número de anillos bencénicos, son altamente hidrofóbicos, lo que disminuye la capacidad de los microorganismos de llevar a cabo la biotransformación (Volkering *et al.*, 1992). Una forma de disminuir estos problemas es utilizando solventes miscibles en agua (Black *et al.*, 1983). Sin embargo, estos sistemas son inadecuados para los microorganismos debido a su toxicidad. Adicionalmente, los grandes contenidos de agua utilizados hacen que el proceso sea hasta el momento no viable económicamente.

Recientemente se ha demostrado la capacidad de biotransformación de sustratos azufrados y poliaromáticos en medios no acuosos, por enzimas como las peroxidasas (Ayala *et al.*, 2000), lacasas (Bresster *et al.*, 2000), citocromo P_{450} (Schlenk *et al.*, 1994) y algunas hemoproteínas no enzimáticas como el citocromo c y la hemoglobina (Torres *et al.*, 2000). En la Tabla I se muestran las actividades específicas de las diferentes enzimas en la oxidación del dibenzotiofeno como sustrato modelo. Como puede apreciarse la cloroperoxidasa (CPO) se presenta como una enzima atractiva por la alta velocidad de oxidación del dibenzotiofeno.

Enzima	Sustrato	Velocidad de reacción (moles de sustrato/mol enzima min.)
Cloroperoxidasa	DBT	126
Hemoglobina	DBT	0.7
Citocromo C	DBT	0.7
Peroxidasa de rábano	DBT	0.03
Mioglobina	DBT	0.15
Hemina	DBT	0.014

Tabla I. Oxidación de Dibenzotiofeno (DBT) catalizada por hemoproteínas [Ayala *et al.*, (2000); Klyachko y Klibanov, (1992);Torres *et al.*, (2000); Vazquez- Duhalt *et al.*, (1993)]

En la Tabla II se muestran algunos compuestos organoazufrados puros ensayados que fueron oxidados en presencia de cloruros y peróxido de hidrógeno sin que el potencial de ionización presente una limitante en la oxidación contrario a lo observado con los compuestos poliaromáticos no azufrados, en el cual sustratos con potencial de ionización de 8.2 no fueron oxidados por la CPO. Recientes reportes demostraron la alta capacidad de remoción de azufre del diesel por medio de una oxidación enzimática de los compuestos organoazufrados acoplada a un proceso de destilación. La aplicación de esta técnica resultó en una significativa disminución del azufre total presente en el diesel desde 500 ppm hasta 200 ppm (Ayala *et al.*, 2000).

Para la posterior eliminación de los compuestos oxidados enzimáticamente, se han propuesto otros métodos adicionales a la destilación como el de impresión molecular selectiva, en el cual se crea un polímero que presente sitios de reconocimiento especifico para los compuestos azufrados o sus derivados y estos sean retenidos en dicho polímero, con lo que se permita00 reducir el contenido de azufre total presente en el diesel desde 15 000 ppm hasta 13 000 ppm (Castro *et al.*, 2001). O bien, la eliminación de las sulfonas a través de la extracción con acetonitrilo (Yazu *et al.*, 2001) o de su retención en el soporte donde la enzima se encuentra inmovilizada (Ryu *et al.*, 2002).

Compuesto	PI (eV)	Actividad especifica (min^{-1})
Tiantreno	7.80	1310 (± 132)
2,2'- bitiofeno	7.83[a]	840 (± 8)
Difenilsulfato	7.88	831 (± 32)
Dibenzotiofeno	8.39	126 (± 9)
Benzotiofeno	8.73	557 (± 42)
Etil-fenil- sulfato	8.80	1725 (±145)
Bencenetiol	8.90	116 (± 5)
Tioanisol	8.95	2917 (± 58)
Difenil-disulfato	9.40	352 (± 10)

Tabla II. Oxidación de organoazufrados por la cloroperoxidasa (CPO) (Ayala *et al.*, 2000).
a PI Potencial de ionización medido por transferencia de carga.

Por lo anteriormente expuesto, se puede concluir que la oxidación enzimática de azufrados acoplada a un proceso de remoción de las sulfonas se presenta como una técnica alternativa atractiva para la desulfuración del diesel o derivados del petróleo. Lo anterior nos lleva a determinar el potencial de la enzima más activa (cloroperoxidasa) para la oxidación de azufrados en sistemas más parecidos al diesel o gasolina, que son los solventes orgánicos. A continuación se describen aspectos relevantes tanto de la enzima como de la biocatálisis en solventes orgánicos.

Cloroperoxidasa *Caldariomyces fumago*

La cloroperoxidasa (CPO) es una hemoproteína glicosilada extracelular producida por el hongo filamentoso *Caldariomyces fumago* con un peso molecular aproximado de 42 000 Da (Figura 2). La principal actividad de la cloroperoxidasa como enzima, son las reacciones de halogenación, aun cuando también presenta actividad catalítica de peroxidasa, monooxigenasa y catalasa.

Figura 2. Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*

Debido a ésto, la CPO es la más versátil de las hemoenzimas conocidas y ha sido objeto de múltiples investigaciones acerca de su estructura y función como biocatalizador. La cloroperoxidasa posee características propias de las peroxidasas y, como se ha sido reportado por Sundaramoorthy *et al.* (1995), presenta características estructurales similares al citocromo P_{450} el cual es una hemoproteína no peroxidásica.

El ciclo catalítico de las peroxidasas presenta en un inicio a la porfirina con el (Fe^{III}) pentacoordinado en estado basal (**resting state**), a partir del cual la catálisis se inicia por una oxidación del peróxido de hidrógeno o alguno otro peróxido orgánico, con alto spin, para dar una oxo (Fe^{IV}) porfirina, la cual es llamada **Compuesto I.** A partir de dicho compuesto se pueden dar tres rutas (Figura 3).

La primera ruta da lugar a la actividad peroxidasa, en donde el compuesto I se somete a una reducción por un electrón para formar el **Compuesto II,** el cual contiene un centro oxiferril coordinado a una porfirina con la respectiva oxidación de un sustrato orgánico ($^{\cdot}AH_2$).

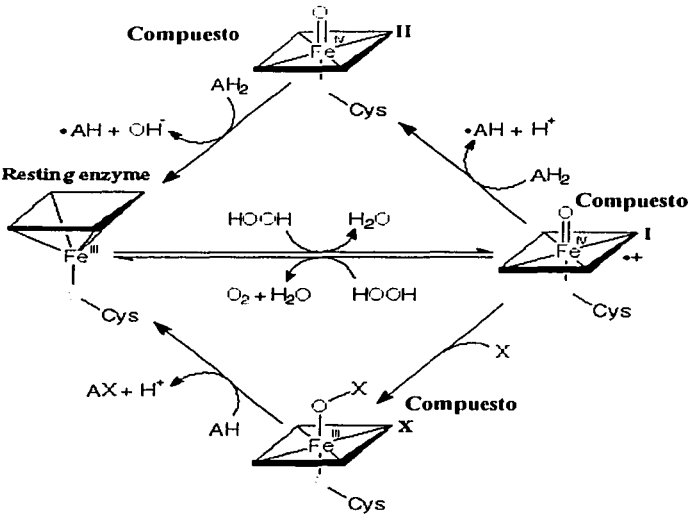


Figura 3. Ciclo catalítico de la cloroperoxidasa (CPO)

El **Compuesto II** es reducido por un electrón más regresando así al estado basal con la simultánea oxidación de un sustrato. La segunda ruta, la actividad catalasa resulta en la descomposición de una segunda molécula de H_2O_2, presentándose la liberación de H_2O_2 /O_2 y el retorno del grupo hemo al estado nativo. La tercera es la halogenación, en esta ruta el compuesto I reacciona con un halógeno (**X**) para formar un intermediario hipohalogenado con una forma de fierro llamada **Compuesto X**, el cual transferirá el halógeno a un sustrato (AH) regenerando así el estado basal.

Ambiente proteico del Hemo.

La cloroperoxidasa pertenece al grupo de enzimas que comparten la característica de poseer al grupo prostético ferroprotoporfirina IX (Figura 4), la cual está unida a la proteína principalmente por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Los grupos nitrógeno de los grupos pirrólicos proveen los cuatro ligandos ecuatoriales del fierro, mientras que la naturaleza del quinto ligando corresponde al grupo tiol de la cisteína 29, a diferencia del resto de las peroxidasas, en las que el grupo axial cercano es una histidina (Sundaramoorthy *et al.*, 1995).

De la misma manera en que en el citocromo P_{450}, el grupo tiol de la cisteína en la CPO funciona como un fuerte donador de electrones interno que facilita el rompimiento del enlace O – O que da lugar al compuesto I de las peroxidasas (Figura 3). En consecuencia con este hecho, la biocatálisis se favorece. La parte distal del hemo de la CPO esta ocupada por una molécula de solvente, la cual esta demasiado lejos, 3.4A, como para formar un enlace axial fuerte. Debido a lo anterior, el fierro de la cloroperoxidasa presenta un estado pentacoordinado de alto spin. El sitio activo de la CPO es de carácter polar como en la mayoría de las peroxidasas y el aminoácido involucrado en el rompimiento del enlace O-O es el ácido glutámico 183 (Sundaramoorthy *et al.*, 1995*)*.

La estructura cristalográfica de la CPO muestra que tanto los contornos como el fierro del hemo están accesibles al sustrato, aunque en una dimensión diferente; es decir, el acceso al fierro del hemo está limitado a sustratos pequeños, mientras que el acceso a los contornos del hemo presenta mayor tamaño. Esto resulta en una enzima capaz de reconocer un amplio número de sustratos de diversa naturaleza química, lo que la hace un biocatalizador muy atractivo principalmente para la industria de síntesis.

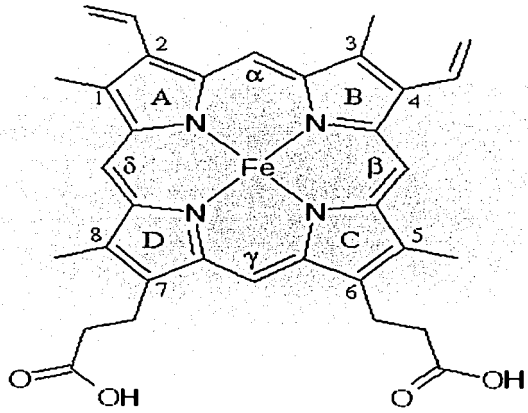


Figura 4. Ferroprotoporfirina IX, grupo prostético de las peroxidasas

Reacciones de oxidación de la cloroperoxidasa

El campo de reacciones catalizadas por la CPO es muy amplio, incluye entre otras, la deshidrogenación, halogenación oxidativa, descomposición de peróxido de hidrógeno y oxidación (Figura 5).

Deshidrogenación oxidativa

$$2SH + H_2O_2 \longrightarrow 2S^{\cdot} + 2\,H_2O$$

Halogenación oxidativa

$$SH + H_2O_2 + H^{(+)} + X^{(-)} \longrightarrow SX + H_2O$$

X= Cl, Br, I.

Rompimiento del H_2O_2

$$2\,H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2$$

Transferencia de oxígeno

$$SH + O_2 \longrightarrow SOH + H_2O$$

Figura 5. Actividades catalíticas de la cloroperoxidasa de *C. fumago*.

En la bibliografía se encuentran reportadas una gran cantidad de sustratos en reacciones de oxidación catalizadas por la CPO y en la Tabla III se resumen algunas de estas reacciones que hacen de esta enzima un biocatalizador muy atractivo.

TIPO DE REACCION (SUSTRATO)	CARACTERISTICAS	CONVERSION (%)	REFERENCIAS
Oxidación de heteroátomos. (alquil-aril-sulfuros) Ejemplos: C_6H_5-S- CH_3 o-CH_3 C_6H_4 –S- CH_3	Reacción prometedora para producir sulfóxidos quirales. Alta actividad catalítica. Producción del enantiómero con alta pureza.	24-100	Colonna et al., 1993
Oxidación de alquenos. (olefinas) Ejemplos: Cis-2-hepteno	Producción de compuestos quirales bioactivos. Alta producción de epóxidos puros con cis - alquenos pequeños de hasta 9 carbonos.	2-100	Zaks y Dodds,1995
Oxidación de indoles. Ejemplos: 5-Cl indol 4-Cl indol	Método más eficiente y rápido que el químico en la obtención de oxindoles con alta pureza. Disminución en la capacidad de oxidación cuando el indol se encuentra sustituido en las posiciones 5 y 6.	70-99	Van Deurzen,1996
Oxidación de alcoholes primarios	Obtención de aldehídos y en algunos casos el ácido correspondiente.	--	Geigert et al., 1983
Otros tipos de reacciones	Hidroxilación selectiva de hidrocarburos cíclicos y alquenos	--	Zaks y Dodds,1995

Tabla III. Algunas reacciones catalizadas por CPO en presencia de H_2O_2.

Enzimología en medios no convencionales

La alta hidrofobicidad de los compuestos presentes en el diesel obliga al uso de solventes orgánicos como medio de reacción, lo cual ha probado ser un sistema extremadamente útil para expandir el rango y la eficiencia de las aplicaciones practicas de la biocatálisis (Khmelnitski y Rich,1999). 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; ajuste del equilibrio termodinámico a favor de la síntesis sobre la hidrólisis, como en la síntesis de péptidos por lipasas y aumento en la termoestabilidad de la enzima, como el caso de las lipasas que se mantienen estables por largo tiempo a 100 °C (Ortiz- León *et al.*, 1995; Kise y Hayakawa, 1991; Zaks y Klibanov, 1985). En la Tabla IV se muestran ejemplos de enzimas y reacciones en este tipo de medios.

Reacción	Enzima	Medio
Oxidación de colesterol	Colesterol oxidasa	Tolueno
Oxidación de alcoholes	Alcohol deshidrogenasa	Eter
Oxidación de fenoles	Peroxidasa de rábano	Dioxano
Hidrólisis de sacarosa	Levansacarasa	Acetonitrilo
Síntesis de péptidos	Quimotripsina	Dimetilformanida
Resolución de mezclas racémicas	Lipasas	Heptano
Condensación de glucosa	Glucoamilasa	Etilenglicol
Síntesis de sacarosa	Invertasa	Butanol
Síntesis de poliesteres	Lipasas	Eter

Tabla IV. Reacciones enzimáticas en sistemas con solventes orgánicos (Dordick, 1991)

Sin embargo la naturaleza del solvente puede afectar la catálisis enzimática de formas diferentes, una de ellas es 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; otra forma es que el solvente puede afectar la interacción del sustrato y del producto con el sitio activo de la enzima (Hwang y Arnold, 1991; Laane *et al.*, 1987; Martínez y Arnold, 1991; Mozhaev *et al.*, 1989). La Tabla V resume las principales ventajas y desventajas de la biocatálisis en medio orgánico.

Principales ventajas	**Principales desventajas**
Alta solubilidad de sustratos hidrofóbicos.	Disminución de la actividad enzimática
Incremento de la regio-, enantio- y estereoespecificidad.	Los disolventes polares pueden actuar como desnaturalizantes
Ajuste del equilibrio químico	Inactivación en la interfase en sistemas de dos fases.
Eliminación de la contaminación microbiana	Toxicidad
Mejoramiento de la termoestabilidad de las enzimas.	
Reducción de las reacciones laterales encontradas en agua.	
Inmovilización de enzima en ocasiones innecesaria.	
Mas fácil recuperación del producto con solventes de bajo punto de ebullición	

Tabla V. Efectos generales de los solventes orgánicos en la biocatálisis

En años recientes, diversos estudios se han llevado a cabo con el fin de entender los procesos involucrados en el comportamiento de las enzimas en solventes orgánicos, particularmente en la elucidación de las propiedades estructurales de las enzimas en ambientes no acuosos, en el mejoramiento de las propiedades catalíticas, en el diseño de nuevos tipos de medios de reacción y, eventualmente, en la implementación de estos desarrollos en aplicaciones a gran escala.

Con las investigaciones realizadas por Zaks y Klibanov, (1988) se determinó que 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. Las evidencias recientes sugieren que se necesita que los residuos de aminoácidos cargados sean solvatados por el agua para que la enzima sea catalíticamente activa. 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 (Dordick, 1989). Esta concentración de agua es desde luego dependiente del tipo de solvente utilizado.

La incapacidad de la mayoría de los solventes orgánicos (no polares) de formar los múltiples puentes de hidrógeno que forma el agua con la proteína, por un lado y la baja constante dieléctrica de los sistemas no acuosos por otro lado, provocan que la flexibilidad de una enzima en sistemas con baja actividad de agua esté significativamente disminuida. La baja flexibilidad de las enzimas o su alta rigidez trae como consecuencia que las enzimas sean menos activas, aunque, como ha sido reportado, su termoestabilidad sea más alta (Zaks y Klibanov,1988).

En este tipo de sistemas existe una cierta competencia por el agua entre la enzima, el solvente, el sustrato y el producto. Por lo anterior es recomendable utilizar como parámetro de contenido de agua 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 en equilibrio.

Las reacciones llevadas a cabo en condiciones óptimas de actividad de agua, con solventes hidrofóbicos, el uso de solventes o aditivos con capacidad de formación de enlaces de hidrógeno, pueden ayudar a aumentar la actividad catalítica de las enzimas en medios no convencionales (Zaks y Klibanov, 1988; Kitaguchi y Klibanov, 1989; Halling, 1994).

Uno de los aspectos que debe tomarse en cuenta para evitar la caída en la actividad catalítica en medios con baja actividad de agua es el estado de protonación de la enzima. En sistemas acuosos la actividad biocatalítica es altamente dependiente del estado de protonación de los grupos ionizables de la proteína, y dado que en solventes orgánicos el pH no tiene un significado real, el estado de protonación estará controlado por el pH de la solución acuosa a la cual estuvo la proteína expuesta previamente. Este fenómeno fue nombrado como "memoria al pH". Es decir el comportamiento biocatalítico de la enzima en solventes orgánicos estará en función del pH de la última solución acuosa a la cual fue expuesta. El fenómeno de "memoria al pH" fue cuantitativamente elucidado basándose en estudios de espectroscopía de infrarrojo; en donde el estado de ionización de diferentes compuestos modelos que contenían grupos funcionales encontrados en las proteínas (grupos amino, carboxilos y fenolicos) fue determinado en estado sólido después de ser liofilizados a diferentes valores de pH. Los valores de pK_a de los compuestos modelos fueron muy similares (0.3 unidades de diferencia) en solución acuosa y en estado liofilizado. Esto significa que la remoción de agua por liofilización no afecta el estado de ionización de grupos cargados (Constatino *et al.*, 1997).

Posteriores trabajos se enfocaron a determinar si los cambios estructurales de las enzimas expuestas al solvente orgánico eran los responsables de la disminución de la actividad. Reportes con diferentes solventes orgánicos mostraron que, sin importar en que solvente se encontraba la enzima, la estructura secundaria y terciaria era virtualmente idéntica (Schmitke *et al.*, 1997; Griebenow y Klibanov, 1997). Sin embargo Kijima *et al.*, (1996), demostraron que los cambios estructurales de la enzima α–quimotripsina eran los principales responsables de los cambios en la actividad catalítica. En conclusión, la actividad catalítica puede o no estar relacionada con los cambios estructurales de la enzima y esto dependerá de la enzima misma.

Con el paso de los años 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.) (Fitzpatrick y Klibanov, 1991; Kijima *et al.*, 1996; Rosell *et al.*, 1995).

El trabajo pionero realizado por Laane *et al.*, (1987) sobre el efecto de los solventes orgánicos en la biocatálisis llevó a la conclusión 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, en tanto que los mas hidrofóbicos no tienen esa capacidad (log P>4).

Posteriormente se encontró que la polaridad del sustrato y producto tienen que tomarse en cuenta en la correlación propuesta por Laane *et al.* (1987). Yang *et al.* (1994) propusieron que para sustratos polares los solventes más adecuados son los que tienen un log P menor a 2 y para sustratos apolares los mejores solventes son aquellos con un log P mayor a 4.

La estabilización del estado basal del sustrato, la energía del estado de transición y las intensidades de las interacciones enzima - sustrato pueden ser significativamente afectadas por el solvente orgánico, estos efectos han sido cuantitativamente determinado como responsables particularmente de la reducción de la actividad enzimática (Xu *et al.*, 1994; Wangikar *et al.*, 1995; Schmitke *et al.*, 1996). Esto puede ser resuelto con la selección adecuada del sistema de solventes a utilizar; esta selección deberá estar basada principalmente en las propiedades termodinámicas del solvente, las cuales disminuyan la energía de solvatación del sustrato, incrementándose así las interacciones enzima – sustrato y favoreciendo la estabilización del estado de transición.

Modelos termodinámicos para predecir comportamiento biocatalítico en medios con solventes orgánicos

Diferentes autores han reportado que la tendencia a la desnaturalización de proteínas por mezclas acuosas de solventes puede ser explicada mediante modelos termodinámicos, los cuales ayudarían a predeterminar la concentración de solventes en el sistema que permita mantener en estado nativo a la proteína y con ello mantener su actividad catalítica.

Entre los primeros reportes se encuentra el trabajo realizado por Martinek *et al.* (1981), basado en la noción de que, parte de la desnaturalización es ejercida por un solvente con alta capacidad de tener interacciones solvofóbicas, que juega un importante papel en mantener la conformación nativa. En este trabajo se usó la energía libre de micelización de un surfactante estándar, como una medida de la capacidad de diferentes solventes para mantener las interacciones solvofóbicas. De acuerdo a este criterio los mejores solventes para proteínas son agua, glicerol y etilenglicol, ya que el resto de los solventes son desnaturalizantes fuertes. Sin embargo, se presenta la limitante de que en algunos solventes como los alcoholes alifáticos de cadena corta la micelización no ocurre; ésto y el hecho de que dicho modelo no permite la predicción de la concentración de solvente a la cual la enzima se encuentra intacta hace que este modelo no sea adecuado. Debido a ello Khmelnitsky *et al.* (1991) propusieron un criterio cuantitativo para la selección de solventes orgánicos como medio de reacción basado en un modelo que involucra los enlaces de la enzima con moléculas de agua y de solvente en la proteína nativa, de ésto deriva una escala llamada **Capacidad de Desnaturalización (DC,** por sus siglas en inglés) con la cual se pueden predecir cuantitativamente las concentraciones limite de varios solventes a las cuales diferentes proteínas mantienen sus propiedades nativas.

Por su parte Rosell *et al.* (1995), propusieron un modelo basado en el efecto hidrofóbico, que refleja la baja solubilidad de moléculas no polares en agua, de lo cual se obtiene una escala del **Coeficiente de Solubilidad.** Este parámetro se correlacionó directamente con la desnaturalización de la proteína y ello con la disminución de su actividad. Los autores 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 se encuentra principalmente relacionada con la disminución del efecto hidrofóbico (Rossell *et al.*, 1995).

Al existir varias excepciones que no se acoplan al modelo propuesto por Khemelnitsky *et al.* (1991), se propuso un nuevo parámetro llamado **Hidrofobicidad** (**H_{50}**) para predecir el comportamiento biocatalítico de la lignino peroxidasa y citocromo C. Dicho concepto incluye la actividad termodinámica del solvente, la polaridad del solvente medido por el parámetro de energía de transición E_T[30] de Dimroth-Reichardt. La hidrofobicidad del solvente fue utilizada para la predicción de la concentración umbral C_{50} (Figura 6) para la oxidación biocatalítica de cinco sustratos hidrofóbicos en sistemas acuosos con solventes orgánicos (Torres *et al.*, 1996).

La dilucidación de algunas de las causas de la disminución de la actividad catalítica de las enzimas en un medio orgánico ha llevado al planteamiento de nuevas estrategias con el propósito de mejorar la funcionalidad de las enzimas en estos sistemas.

Una de las estrategias empleadas para incrementar la actividad catalítica en solventes orgánicos ha sido la aplicación del **Estampado biomolecular**; es decir, la inducción de una mejor conformación estructural del sitio activo de la enzima para un determinado sustrato. La conformación inducida se logra a través del acomplejamiento de la enzima en solución con un ligando químicamente similar al sustrato pero que no produzca reacción. La remoción del ligando en solvente anhidro mantiene el sitio activo de la enzima en una conformación estructural de mayor afinidad para el sustrato de interés. Como resultado de este procedimiento tres proteínas, albúmina, papaína y lactoglubulina mostraron actividad catalítica en reacciones de β- eliminación en acetonitrilo, mientras que las mismas proteínas no sometidas a ese tratamiento no mostraron actividad para la misma reacción (Ohya *et al.*, 1996; Slade y Vulfson, 1998).

Otra ha sido la **Ingeniería de proteínas**; es decir, el mejoramiento del comportamiento enzimático por modificación de la naturaleza del biocatalizador, esto incluye, inmovilizaciones del biocatalizador, el acomplejamiento de las enzimas con lípidos o surfactantes, las modificaciones quimicas, genéticas o ambas de la proteína (De Santis y Jones, 1999).

Por ultimo, y sin dejar de encontrarse en constante desarrollo es la modificación de las propiedades del medio de reacción, lo cual ha contribuido notablemente a mejorar las propiedades catalíticas de las enzimas como la especificidad, selectividad, estabilidad y la termoestabilidad, y que se ha denominado como **Ingeniería de solventes** y se refiere al estudio de las características termodinámicas de los sistemas de reacción que influencian el comportamiento de las enzimas en medios no convencionales (Dordick, 1989; Halling, 1990).

Un sistema particularmente interesante son los fluidos supercríticos como ha sido reportado por Kamat *et al.* (1995), los cuales son muy atractivos para realizar ingeniería de solventes es decir, para el estudio de la relación de ambiente – estructura – función, ya que es posible manipular las características termodinámicas de estos medios con cambios en la presión y/o temperatura sin cambiar la naturaleza del solvente.

El estudio de las reacciones en fluidos supercríticos se ha incrementado debido a que resultan una excelente opción para reemplazar a los disolventes orgánicos. Un medio supercrítico es aquel en el que un fluido se encuentra a temperaturas y presiones por arriba de su punto crítico en el diagrama de equilibrio líquido – vapor y por lo tanto no se puede licuar al incrementar la presión del sistema (Figura 6).

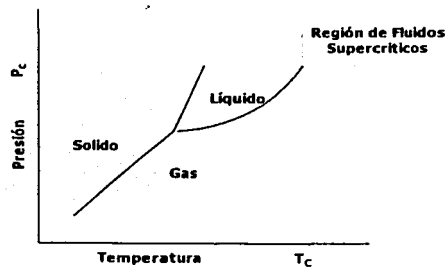


Figura 6. Diagrama de Fluidos Supercríticos

Adicionalmente los Fluidos supercríticos presentan características atractivas como 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.

En la Tabla VI se muestra un pequeño listado de reacciones enzimáticas en condiciones supercríticas. En donde se observa que, el CO_2 ha sido el medio más utilizado para reacciones en condiciones supercríticas, debido a ello el CO_2 presenta condiciones críticas relativamente bajas (T_c=31 °C y P_c= 0.38 MPa), es un material no tóxico, relativamente barato e inerte.

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, fluoroformo y hexafluoruro de azufre en condiciones supercríticas como medio de reacción para síntesis de acrilatos por la lipasa de *Candida cylindracea* ha sido informado (Kamat *et al.*, 1993). Por los resultados obtenidos, el fluoroformo aparece como un buen material para estudios de ingeniería de solventes debido a que presenta los cambios más evidentes en sus propiedades termodinámicas al alterar la presión del sistema. Sin embargo, los materiales descritos anteriormente presentan la desventaja de ser tóxicos, explosivos o de empleo muy delicado, por lo que sus estudios tanto a nivel de investigación como industrial son limitados.

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
Esterificación de ácido oleico	Lipasa	CO_2, 40 °C, 13 MPa

Tabla VI. Reacciones enzimáticas en fluidos supercríticos (Kamat et al., 1995; Nakamura, 1990)

La selección del mejor sistema para una reacción dada dependerá de varios factores como la compatibilidad del solvente con la reacción de interés, así como que la partición de los sustratos y productos no causen inhibición de la enzima al ser retenidos cerca del sitio activo (Sato *et. al.*,1995; Yang, *et al.*, 1994), así como que el solvente sea inerte, poco tóxico, disponible, de bajo costo y principalmente que afecte lo menos posible a la estructura de la enzima.

Limitaciones de las peroxidasas en la oxidación de sustratos hidrofóbicos

En sistemas acuosos hidrofílicos la interacción entre el sitio activo de la enzima y el medio se ve favorecido al incrementarse la hidrofobicidad del sustrato, siempre y cuando el ambiente proteico del sitio activo sea hidrofóbico. Esto resulta en una mayor afinidad por el sustrato y una mayor actividad catalítica al incrementarse la hidrofobicidad del sustrato (Backes *et al.*,1993; Khatisashvili *et al.*,1997; Satoh *et al.*,1999). Por otro lado, la biocatálisis con solventes orgánicos obedece al proceso contrario: el aumento de la hidrofobicidad del sustrato podría disminuye la interacción con el sitio activo de la enzima si este es hidrofobico (Torres *et al.*, 1996). Es decir, la biocatálisis con sustratos hidrofóbicos en sistemas orgánicos está limitada por la partición del sustrato hidrofóbico hacia el solvente, lo cual disminuye tanto la actividad catalítica como la afinidad por el sustrato (Ryu y Dordick, 1992; Wangikar *et al.*, 1995).

Como resultado de trabajos reportados fue posible demostrar que la biocatálisis del citocromo C con sustratos hidrofóbicos, como los compuestos aromáticos, está seriamente limitada por la partición del sustrato entre el sitio activo y el solvente. En un inicio, al aumentar la concentración de solvente orgánico la actividad específica aumenta hasta un máximo, ya que se disminuyen los problemas de transferencia de masa. A mayores concentraciones de solvente y después de alcanzar ese máximo, la actividad disminuye debido a la disminución de la interacción entre el sitio activo y el sustrato, y/o a una desnaturalización. En la Figura 7 se ilustra esta idea junto con C_{50}.

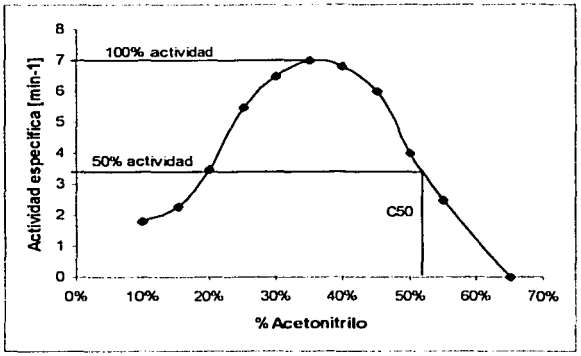


Figura 7. Representación del concepto de concentración umbral (C_{50}) en la oxidación de tiantreno en acetonitrilo por citrocromo C de corazón de caballo en presencia de peróxido de hidrógeno (Torres *et al.*, 1996).

Ensayos con diferentes sustratos mostró que la C_{50} (concentración de solvente a la cual se observa el 50% de la actividad máxima) variaba en función de la hidrofobicidad del sustrato (Figura 8), con lo que se llegó a la conclusión que la C_{50} era también una función del sustrato y no sólo del poder de desnaturalización del solvente como había sido reportado previamente (Khmelnitsky *et al.*, 1991; Torres *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 1997 y Torres, 1998). Los autores concluyeron que la biocatálisis con hemoproteínas con solventes orgánicos, para sustratos hidrofóbicos estaba seriamente limitada por la desfavorable partición del sustrato entre el sitio activo y el solvente.

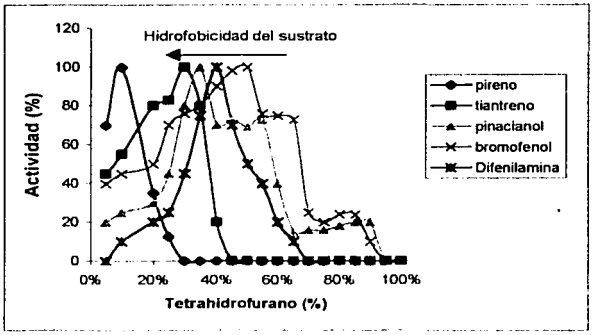


Figura 8. Efecto de la concentración de tetrahidrofurano y la hidrofobicidad del sustrato en la biocatálisis con citocromo C (Torres *et al.*, 1997).

Por todo lo anteriormente expuesto, nace la necesidad de realizar estudios de ingeniería de solventes con la cloroperoxidasa en la oxidación de organoazufrados, con el propósito de determinar su comportamiento biocatalítico en sistemas no acuosos y con ello determinar sus limitantes y potencialidades como biocatalizador en la industria del petróleo. Para lograr lo anterior nos hemos propuesto los siguientes objetivos

Capítulo II

OBJETIVOS

GENERAL

Estudiar el comportamiento biocatalítico de la CPO en sistemas orgánicos en la oxidación de 4,6-dimetil dibenzotiofeno como sustrato modelo de compuestos organoazufrados presentes en el petróleo.

PARTICULARES

- Determinar la capacidad de la CPO para oxidar 4,6-dimetil dibenzotiofeno e identificar sus productos de oxidación.

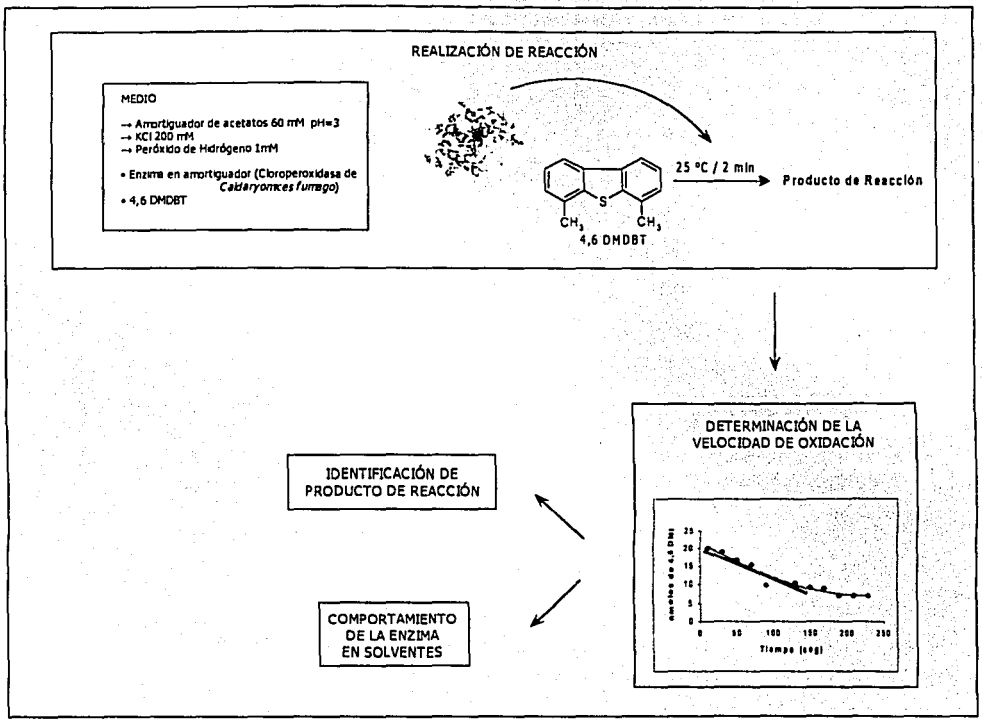
- Estudiar el comportamiento de la CPO en sistemas monofásicos de Isopropanol, Etanol, Metanol, Acetonitrilo, N,N- dimetilformamida, Tetrahidrofurano y Fluidos supercríticos.

- Estudiar el efecto de la hidrofobicidad del sustrato en la oxidación catalizada por la CPO en medios orgánicos.

- Estudiar el efecto de la naturaleza del solvente en algunos aspectos estructurales de la CPO, como estructura terciaria y sitio activo.

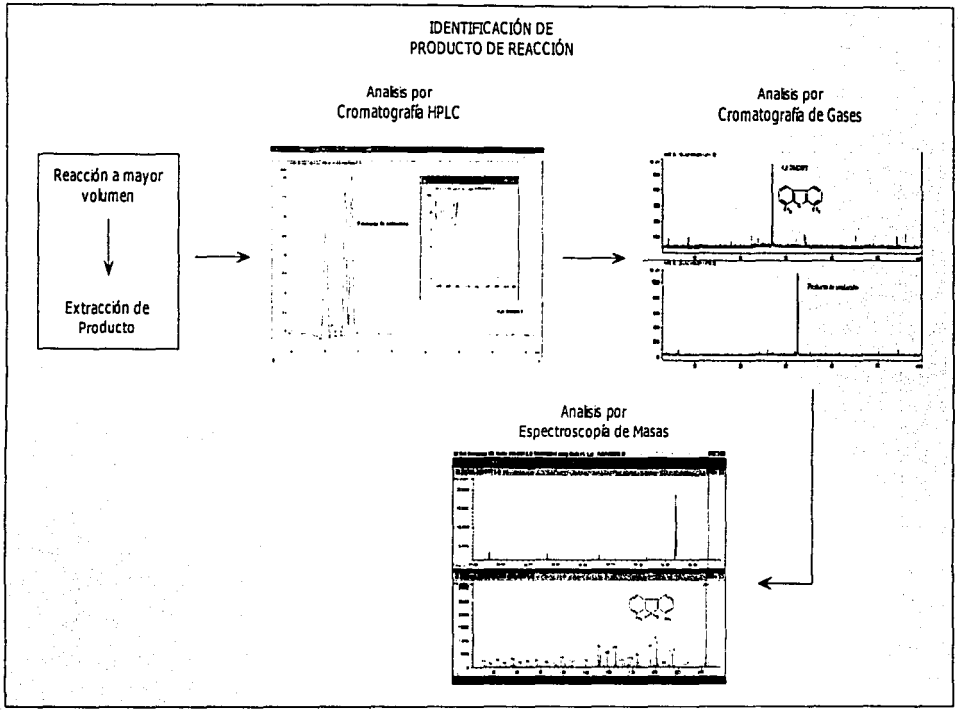
- Correlacionar actividad catalítica contra parámetros termodinámicos y/o estructurales.

DIAGRAMA DE FLUJO

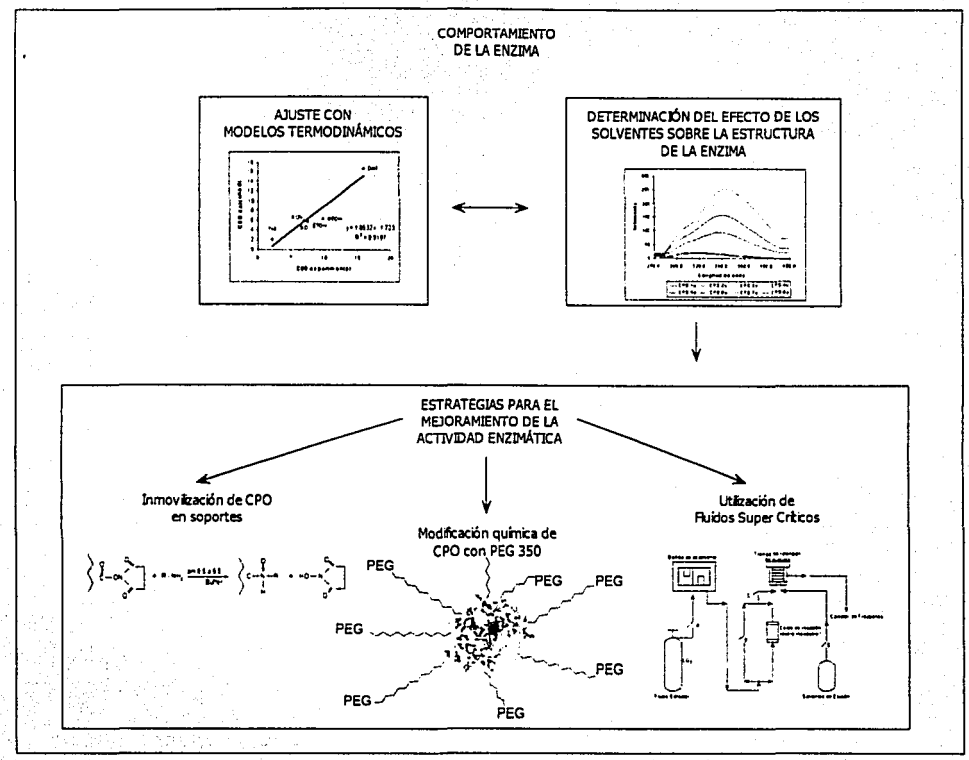


43

Continuación



Continuación



Capítulo IV

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

La cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* fue amablemente proporcionada por el Dr. Michael A. Pickard de la Universidad de Alberta, Canadá.

El 4,6 dimetildibenzotiofeno (4,6 DMDBT), el 2,2'–Azino – bis (3-ethylbenzotiazoline – 6 – ácido sulfónico) sal diamonio (ABTS), el pireno y el benzo (α) pireno, así como el Hidroperóxido de Cumeno (α, α -dimetilbenzil hidroperóxido) se obtuvieron de Aldrich Chemical Co. La 1- etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) se adquirió con Sigma en tanto que el Sulfato ferroso se compró a Productos Químicos Monterrey y el peróxido de hidrógeno a Fermont. Las sales para la preparación de los amortiguadores así como el sulfato de sodio anhidro, se adquirieron de J.T. Baker.

De los solventes utilizados, el Acetonitrilo grado HPLC, fue obtenido de Burdick & Jackson, el Etanol a J.T. Baker, el Isopropanol y la Dimetilformamida grado HPLC fueron adquiridos a Prolabo, en tanto que el Metanol, el diclorometano y el Tetrahidrofurano fueron comprados a Aldrich Chemical Co., siendo este último destilado en presencia de sulfato ferroso antes de su uso para evitar la presencia de peróxidos.

Determinación de proteína

La proteína fue cuantificada a 403 nm a partir de su coeficiente de extinción molar cuyo valor es de ε=75.3mM^{-1} cm^{-1}.

Actividad Catalítica y Específica

Las reacciones se llevaron a cabo con 20 μM de 4,6 DMDBT en presencia de 20 mM de cloruro de potasio y 1 mM de peróxido de hidrógeno, en diferentes proporciones de solvente orgánico en amortiguador de acetatos pH 3, teniéndose como volumen final de reacción 1 mL. EL inicio de la reacción se dió con la adición de H_2O_2. El control consistió en el mismo medio de reacción en ausencia de la hemoproteína. El progreso de la reacción se monitoreó por cromatografía líquida de alta resolución después de 2 min de reacción, leyendo a una longitud de onda de 240 nm adecuada para el sustrato. La actividad catalítica se expresó como actividad específica en moles de sustrato transformado por mol de enzima adicionada por minuto.

El estudio de la actividad de la cloroperoxidasa (CPO), de la variante química, así como de las inmovilizaciones de la misma, se realizó en un equipo de Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (HPLC) Hewlett Packard Serie 1100, con una columna de C_{18} Waters y un detector UV-visible, siendo la fase de elección una mezcla de acetonitrilo- agua (80:20 v/v) con un flujo de 1mL/min

La actividad específica frente a pireno y ABTS fue determinada por Espectrofotometría UV-Vis a partir de λ= 335nm ε=32600 M^{-1}cm^{-1} y λ= 436nm ε= 29300 M^{-1} cm^{-1} respectivamente.

Identificación del producto de reacción

Se repitieron por triplicado las reacciones aumentando proporcionalmente cada uno de los componentes y teniéndose un volumen final de 10mL en 20 % de acetonitrilo, siendo necesaria la adición de enzima y peróxido de hidrógeno cada media hora por tres ocasiones, con un tiempo total de reacción de 4 horas a una temperatura de 25°C. En forma simultánea se realizó una reacción en 1 mL bajo las mismas condiciones, la cual se analizó por HPLC en una columna C_{18} de Waters a fin de verificar el tiempo en que se alcanza la completa desaparición del sustrato.

Completado el tiempo de reacción, los triplicados se juntaron, acidificándose el medio con 1 mL de HCl concentrado, posteriormente se procedió a extraer con 15 mL de diclorometano grado HPLC en tres ocasiones. Las fases orgánicas obtenidas se juntaron haciéndose pasar a través de un filtro con sulfato de sodio anhidro. El siguiente paso consistió en evaporar totalmente el solvente presente, (para ello se utilizó un Rotavapor Buchi R-124/ B480). El control consistió del mismo sistema que las reacciones sin enzima y tratado de igual manera que las reacciones. El compuesto obtenido fue disuelto en 1 mL de diclorometano y analizado por Cromatografía de Gases. El equipo utilizado fue un Cromatógrafo de Gases Modelo Hewlett-Packard, con Columna capilar de 30 m de Longitud, diámetro interno de la columna 0.32 mm. Las condiciones de elución de la muestra fueron: temperatura inicial del horno 90 °C durante 2 min , la velocidad de la rampa 4 °C/min, temperatura final de la rampa 300 °C, tiempo de mantenimiento de temperatura final 5 min, modo de inyección Split 10-1 flujo de 15 mL/min, gas acarreador helio, Columna capilar modelo NoHP190917-413, HP-1 methylsiloxane, temperatura máxima de la columna 325 °C, cuyas dimensiones son de 30m X 320 μm X 0.2 μm.

Bajo dichas condiciones la muestra fue analizada por un detector de quimiluminiscencia especifico para azufre orgánico (Siever Instruments Inc, modelo 355) acoplado a un detector de ionización de flama (FID) y Espectrometría de Masas.

Determinación de la actividad termodinámica

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

$$Ln\gamma_s = X_a^2[T_{21}(G_{21}/X_s + X_a G_{21})^2] + [T_{12}G_{12}/(X_a + X_s G_{12})^2]$$

$$Ln\gamma_a = X_a^2[T_{12}(G_{12}/X_a + X_s G_{12})^2] + [T_{21}G_{21}/(X_s + X_a G_{21})^2]$$

Donde Ln γ_s y Ln γ_a son los logaritmos de los coeficientes de la 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 VII) cuyas unidades están dadas en cal/mol con el valor de R de 1.98721 cal /mol °K y las unidades de temperatura en °K.

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/ dimetilformamida	503.0421	-190.9073	0.3022

Tabla VII. Valores de las constantes de equilibrio vapor- líquido de los sistemas monofásicos bicomponentes utilizados (Gmehline *et al.*, 1981.).

Determinación de alteraciones en la conformación proteica en solventes orgánicos

Espectrofluorometría

Se realizaron los espectros de emisión de la enzima en mezclas de solventes orgánicos en un Espectrofluorómetro RF-5301PC Shimadzu, con los siguientes parámetros: una amplitud de slit de emisión y excitación de 3 nm, una longitud de onda de excitación de 275 nm, en un rango de emisión de 280-400 nm, una velocidad de escaneo de media y alta sensitividad, utilizándose como control la enzima en presencia de amortiguador de acetatos 60 mM pH 3.

Calculo del CEM

El Centro Espectral de Masas (CEM), se calculó a través de la siguiente ecuación:

$$\mathbf{CEM} = \Sigma\, I_{(\lambda)} * \lambda * \Delta\lambda \,/\, \Sigma\, I_{(\lambda)} * \Delta\lambda$$

donde:

λ= Longitud de onda de emisión
I = Intensidad a una longitud de onda de emisión dada
$\Delta\lambda$ = Incremento en la longitud de onda de lectura

Espectrofotometría

Por esta técnica se realizaron los espectros de absorción del grupo hemo en presencia de los diferentes solventes ensayados en un equipo Thermospectronic Helios α, realizándose un escaneo de 350-500 nm con una velocidad de escaneo de 600 nm/min

Inmovilización de CPO

Se inmovilizó a la enzima en dos diferentes soportes de inmunoafinidad activados affi-gel 15 y affi-gel 102, los cuales fueron comprados a Bio- Rad. La inmovilización en cada uno de ellos, se llevó a cabo como a continuación se describe. Se tomó aproximadamente 1g (5mL) de affi-gel 15 y se lavó con 10mL de amortiguador de acetatos 60mM pH3. Posteriormente se le agregó 1mL de enzima con una concentración de 30.4nmoles/mL y se llevó a un volumen final de 5mL. La reacción se llevó a cabo a 25°C con agitación constante durante 4horas.

Posteriormente se lavó con amortiguador con el fin de eliminar aquella enzima cuyos grupos aminos libres no hubieran reaccionado. En cuanto al affi-gel 102, a 2 g previamente lavado con amortiguador de acetatos 60 mM pH 5, se le adicionó 1 mL de enzima (30.4nM/mL), manteniendo agitación constante y un pH entre 4.7- 5.0. Después se adicionaron 5 mg de EDAC, para posteriormente llevar a un volumen final de 5 mL, lo cual se mantuvo durante 4 horas a 25°C, para posteriormente lavar con amortiguador y así eliminar la proteína que no se acopló al gel (mismo que reaccionara con los grupos carboxilos libre de la enzima).

Modificación química

La modificación química de la CPO se realizó con Polietilenglicol 350 (PEG-350). Para ello se colocaron 2 mL de enzima con una concentración de 30.4 nmoles/mL en presencia de EDAC y PEG-350. Lo anterior se llevo a un volumen final de 5mL con amortiguador de acetatos 60mM pH5 siendo la concentración final del PEG y EDAC, 10 veces en exceso molar por carboxilo libre presente en la enzima. La reacción se llevó a cabo a 25°C, con agitación constante, durante 4 horas. Finalmente la solución se dializó reiteradas veces con amortiguador y se concentró en una celda de ultrafiltración Millipore con una membrana de celulosa de 10 000 Da de poro.

Preparación de la enzima para Fluidos Supercriticos

Se preparó una solución de sacarosa 1 M en amortiguador de acetatos 60 mM pH 3 con CPO (304 nmol/mL),siendo el volumen final 5 mL, para posteriormente colocar dicha solución en viales que fueron centrifugados a vacio durante aproximadamente 5 horas en un equipo DyNA vap.

Biocatálisis en Fluidos Supercríticos

La solubilidad del 4,6 dimetildibenzotiofeno (4,6 DMDBT) y la actividad catalítica de la CPO, se estudiaron en un equipo de extracción supercrítica Hewlett Packard Modelo 7680T. Ensayándose tres diferentes condiciones supercríticas de CO_2, tomándose como referencia el reporte de Bartle *et al.* (1991), en el que se proporcionan rangos de condiciones de solubilidad del dibenzotiofeno en CO_2 supercrítico.

El primer paso para la realización de reacciones en CO_2 supercrítico consistió en determinar las condiciones a las cuales el 4,6 DMDBT se disuelve. Para esto se eligieron tres condiciones supercríticas dentro del rango reportado para el Dibenzotiofeno como punto de inicio. Las condiciones se muestran en la Tabla VIII.

Condición	Presión (bar)	Temperatura (°C)	Densidad
1	76	40	0.25
2	211	40	0.85
3	211	60	0.74

Tabla VIII. Condiciones probadas para fluidos supercríticos (Bartle et al., (1991)

Las reacciones se llevaron a cabo en las mismas condiciones supercríticas durante 15 min de equilibrio y 5 min de extracción, siendo el sustrato 4,6 DMDBT 20 μM, necesitándose el uso de hidroperóxido de cumeno 2 mM. El sustrato se removió de la celda de extracción con acetonitrilo y se cuantificó por Cromatografía de líquidos a Alta Presión. En la Figura 9 se muestra el diagrama de flujo del equipo de CO_2.

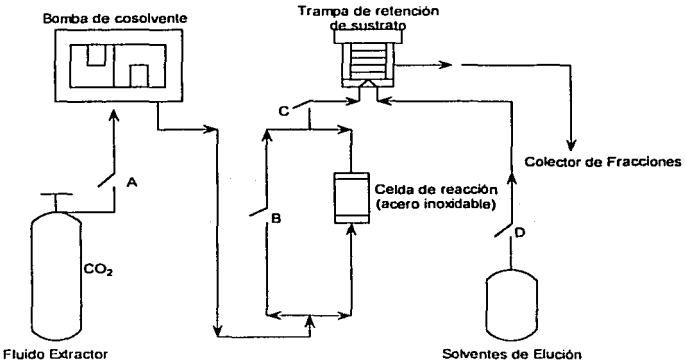


Figura 9. Esquema del equipo de Extracción supercrítica usado para reacciones en CO_2 supercrítico.

Capítulo V

RESULTADOS Y DISCUSION

Capacidad de oxidación de la cloroperoxidasa (CPO)

Como primera parte del trabajo experimental se verificó la capacidad de la cloroperoxidasa (CPO) de oxidar al 4,6-dimetildibenzotiofeno (4,6 DMDBT), el cual se tomó como compuesto modelo de investigación de organoazufrados presentes en el petróleo. Para ello, en un sistema con 15 % de acetonitrilo se colocó a la enzima en presencia de dicho compuesto observándose una disminución en la concentración del organoazufrado, la cual fue proporcional a la cantidad de enzima adicionada. Este resultado confirma que la oxidación del 4,6 DMDBT es debida a la acción de la enzima (Figura 10).

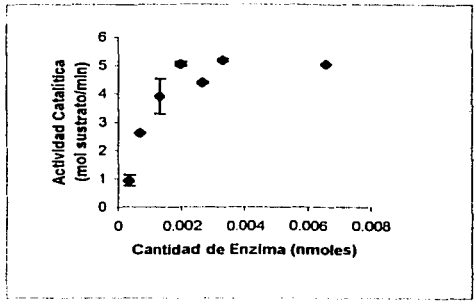


Figura 10. Oxidación del 4,6 DMDBT en función de la concentración de enzima.

Posteriormente se procedió a determinar el intervalo de tiempo de reacción más adecuado para determinar la velocidad inicial. Para ello se monitoreó la desaparición del 4,6 DMDBT a lo largo del tiempo, determinándose así que la velocidad inicial podría ser calculada durante los dos primeros minutos de reacción (Figura 11).

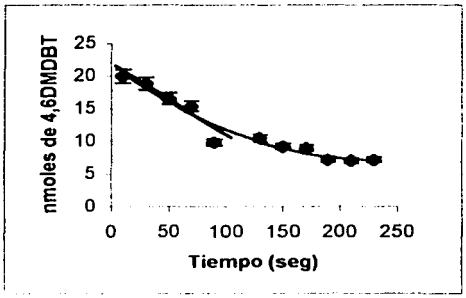


Figura 11. Cinética de desaparición del 4,6 DMDBT por acción de la CPO.

Identificación del producto de reacción

Los cromatogramas obtenidos por HPLC de las reacciones realizadas, evidencian la presencia de dos picos en los primeros minutos de elución (Figura 12). El primer pico con un tiempo de retención de 1.6 min desaparece lentamente para dar lugar al segundo pico con tiempo de retención de 1.8 min.

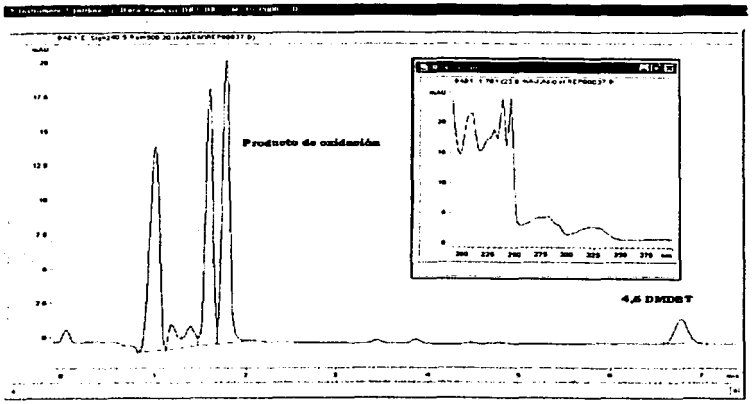


Figura 12. Cromatograma por HPLC de reacción. En el recuadro se muestra el espectro de absorción del producto de reacción con tiempo de retención 1.8 min.

A partir de lo observado en los espectros del HPLC se procedió a realizar la misma reacción en mayor proporción a fin de obtener el **Producto de oxidación** en una mayor cantidad que permitiera su análisis por otras técnicas.

La primera determinación se llevó a cabo a través de una cromatografía de gases (Figura 13), realizándose un control con el 4,6 DMDBT, el cual aparece a un tiempo de retención de 27 min, en tanto que el producto de oxidación aparece a 33 min., como era de esperarse, el producto tiene peso molecular mayor, lo que incrementa el punto de ebullición, y por ende, se retiene más tiempo en la columna. Posteriormente se realizó el análisis del producto por espectrometría de masas. El resultado mostró la presencia de un pico a 35 min que corresponde a un compuesto con un peso molecular de 244 m/z, que indica la adición de dos moléculas de oxígeno al 4,6 Dm DBT, así como los picos de fragmentación de 215 m/z, 201 m/z, 195 m/z, 165 m/z, 150 m/z (Figura 14). La generación del producto oxidado del 4,6 DMDBT por la CPO permitiría la separación del mismo más fácilmente debido a cambios en las propiedades fisicoquímicas como la solubilidad, punto de ebullición. Por otro lado, existen informes que a través de la reacción de oxidación del DBT se ha logrado obtener la sulfona del DBT catalizada por el citocromo c, (Vazquez-Duhalt, *et al.*, 1994), la hemoglobina (Torres, *et al.*, 2000), lacasa (Bresster *et al.*,2000), citocromo P_{450} (Schlenk, *et al.*, 1994) y la lignino peroxidasa (Torres, *et al.*, 1996). Por lo que pensamos que el producto obtenido a partir de la catálisis con CPO podría ser la sulfona del 4,6 DM DBT.

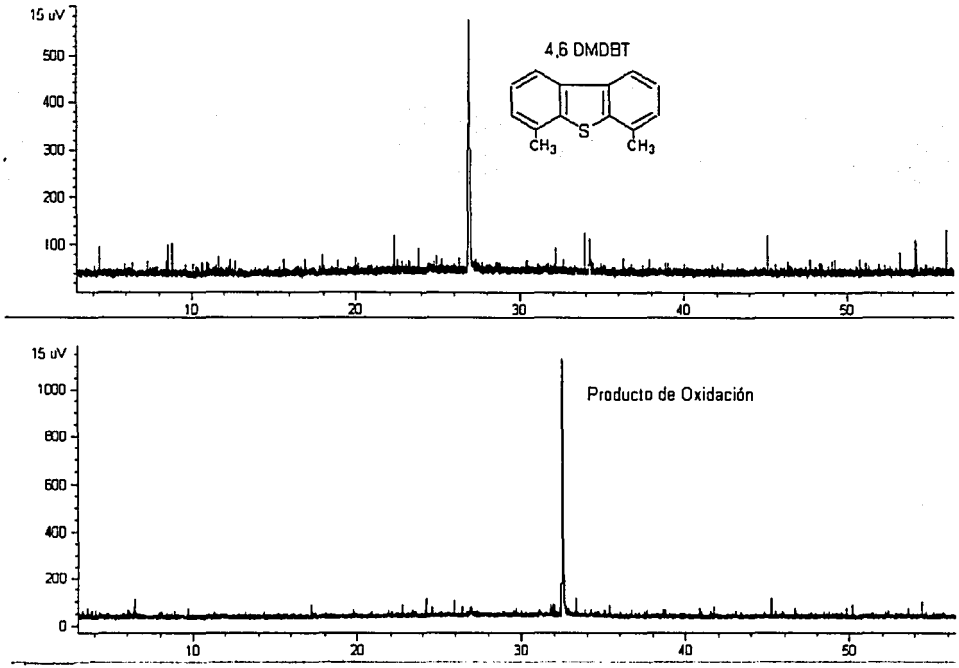


Figura 13. Análisis por cromatografía de gases del producto de la reacción catalizada por la CPO

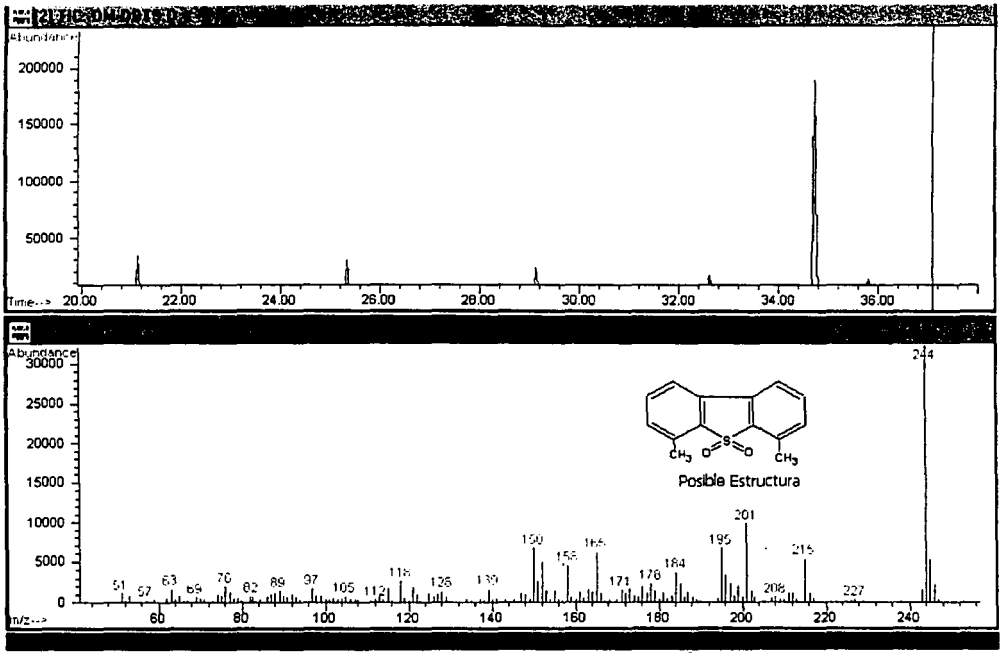


Figura 14. Análisis por Espectrometría de Masas del producto de la reacción catalizada por la CPO.

Actividad catalítica y específica de la cloroperoxidasa de *C. fumago* en mezclas acuosas con solventes orgánicos

Con el propósito de comprender el comportamiento biocatalítico de la CPO en solventes orgánicos se procedió a determinar la actividad específica de este biocatalizador en diferentes solventes miscibles. Los solventes seleccionados fueron acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), etanol (EtOH), dimetilformamida (DMF), isopropanol (ISO) y tetrahidrofurano (THF), solventes todos miscibles que van desde los muy polares como el metanol hasta los poco polares como el tetrahidofurano. Siendo en acetonitrilo al 20 % e isopropanol al 40 % donde se observaron los máximos valores de actividad especifica con 1534.03 min^{-1} para el primero y de 2466.17 min^{-1} para el segundo, en tanto que en sistemas con etanol al 20 %, metanol al 25 %, tetrahidrofurano y N,N dimetilformamida al 10 %, los valores de actividad máxima fueron de 903.70 min^{-1}, 951.53 min^{-1} ,1507.77 min^{-1} y 1904.45 min^{-1} respectivamente (Figura 15).

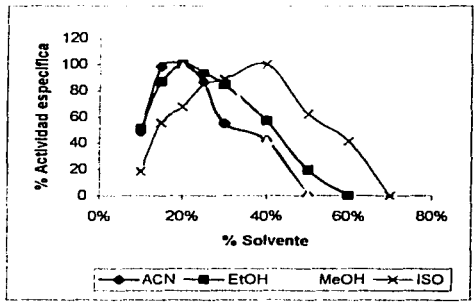


Figura 15. Comparación de actividad específica de CPO constante en diferentes solventes.

Como se muestra, la biocatálisis llevada a cabo con solventes de hidrofobicidad media como el acetonitrilo, metanol, etanol e isopropanol, está favorecida a bajas concentraciones de solvente, debido probablemente a que los mismos ayudan a disminuir los problemas de transferencia de masa, hasta alcanzar un máximo, después de lo cual se presenta una disminución de la actividad de la enzima. Lo anterior puede deberse a que a altas concentraciones de solvente se ocasiona la desnaturalización de la enzima, lo que a su vez ocasiona la pérdida de actividad catalítica.

A su vez en los solventes como el Tetrahidrofurano y la N,N dimetilformamida se observa que la máxima actividad se presentó a la mínima concentración de solvente, lo cual pudo deberse a una alta capacidad de solvatación de cada uno de ellos, aun cuando al igual que como con los primeros solventes al aumentar la concentración de solvente se observa que la actividad disminuye hasta ser nula, lo cual puede deberse a que los mismos solventes ocasionen una desnaturalización de la enzima.

El efecto de los solventes sobre el comportamiento catalítico de la peroxidasa de rábano blanco, la lignino peroxidasa de *P. crysosporium*, y varias enzimas no peroxidásicas ha sido estudiado con anterioridad (Bogan y Lamar 1995; Sato, *et al.*, 1995; Klyancho y Klibanov 1992; Torres, *et al.*, 1996). De estos estudios se ha reportado un comportamiento similar al obtenido en este estudio para sustratos altamente hidrofóbicos. Es decir, cuando el sustrato es hidrofóbico, el comportamiento de las enzimas muestra la forma de una campana.

La disminución de la actividad después de alcanzar el máximo (Figura 15) se debió, por un lado, a la desnaturalización de la enzima por parte del solvente (Ryu y Dordick, 1992) y, por otro lado, a efectos del solvente sobre la solvatación del sustrato (Torres, *et al.*, 1996). Cuando el sustrato es poco hidrofóbico el comportamiento es un tanto diferente. La actividad se mantiene intacta (el 100%) hasta una concentración de solvente donde disminuye drásticamente hasta cero. La disminución en la actividad para sustratos poco hidrofóbicos es debido principalmente a la desnaturalización de la enzima (Xu *et al.*, 1997).

De la Figura 15 se obtuvieron los valores de C50 (concentración de solvente a la que se presenta el 50 % de la actividad máxima), y como puede apreciarse de la Figura 15, la CPO es activa a concentraciones de solvente relativamente bajas, lo que podría ser una desventaja si se planea utilizarla en sistemas de derivados del petróleo, donde los contenidos de agua son muy bajos.

Como parte del intento por caracterizar los sistemas de reacción para la CPO, se decidió determinar la existencia de alguna relación con la actividad termodinámica del solvente en soluciones acuosas. Para ello se recurrió al uso de los datos de las isotermas de equilibrio vapor–líquido a 25°C y las ecuaciones del modelo NRTL, encontrando que para cada solvente existe una actividad de solvente óptima (Tabla IX).

Solvente	Actividad óptima	
	Agua	**Solvente**
ACN	0.98	0.4
EtOH	0.95	0.25
MeOH	0.90	0.18
ISO	0.95	0.60
THF	0.98	0.35
DMF	0.98	0.03

Tabla IX. Valores de actividad óptima de agua y de solvente para la biocatálisis

Dado que no se encontró relación con la actividad termodinámica de los solventes se decidió verificar la influencia de la actividad termodinámica del agua encontrando un valor de actividad del agua entre 0.90 -1.00 en cada uno de los sistemas con solventes utilizados (Tabla IX), lo que nos indica que el grado de hidratación que la enzima requiere es elevado para mantener su actividad.

Actividad enzimática experimental frente a modelos termodinámicos

Con el fin de explicar el efecto observado de los solvente sobre las reacciones de oxidación de la cloroperoxidasa, se buscó alguna relación entre la C50 y parámetros fisicoquímicos de los solventes, comenzando por log P (coeficiente de partición, 1-octanol / agua). Como se muestra en el Figura 16 para solventes con polaridades opuestas como lo es el tetrahidrofurano y la N,N dimetilformamida los valores de C50 son similares, por lo que no existe correlación alguna entre este último y el log de P. El log P ha sido el parámetro más reportado en la literatura para correlacionar el comportamiento biocatalítico de diferentes enzimas en solventes orgánicos (Vazquez- Duhalt *et al.*, 1993; Halling, 1994). De estas correlaciones, los autores han concluído que la competencia por el agua entre la enzima y el solvente es el principal factor involucrado en la disminución de actividad de las enzimas.

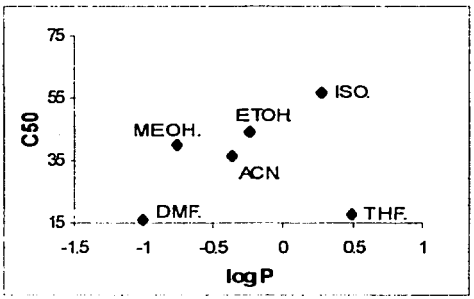


Figura 16. Correlación de C_{50} experimental frente al logaritmo del coeficiente de partición (log P) (Laane, *et al.*,1987).

De esta manera, los solventes polares (log P menor a 2) resultaron ser los menos adecuados para enzimas como la quimotripsinas (Kijama, *et al.*, 1996), lipasas (Ghatorae, *et al.*, 1994), y lacasas (Mozhaev, *et al.*, 1989; Rodakiewicz, *et al.*, 2000). El hecho de que la C_{50} de la CPO no siga una correlación más o menos clara con el log P sugiere que otros factores están involucrados con mayor importancia que la competencia por agua.

El siguiente parámetro elegido fue el llamado $E_T[30]$, valor que indica la capacidad de solvatación del solvente. De esta comparación se evidencia la inexistencia de alguna relación clara entre dichos parámetros; sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 17, los solventes con mayor poder de solvatación ($E_T[30]$ menores) son los que presentan valores de C_{50} más bajos. Es decir, la Figura 17 sugiere que la capacidad del solvente de solvatar a la enzima o al sustrato afecta importantemente la biocatálisis con la CPO.

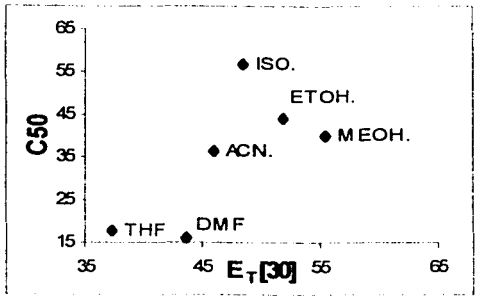


Figura 17. Correlación de C50 experimental frente a los valores de $E_T[30]$ (Reichard, C. ,1979).

Debido a que con los parámetros establecidos para los solventes puros no fue posible explicar el comportamiento observado en las pruebas realizadas, se recurrió a los diferentes modelos termodinámicos reportados en la literatura, verificando si alguno de ellos se ajusta a los resultados experimentales.

El modelo propuesto por Khmelnitsky de capacidad de desnaturalización no permitió explicar lo que sucede con la hemoproteína, ya que como se puede observar en la Figura 18 los valores de C_{50} que se obtienen a partir de la ecuación propuesta, son solo similares para el metanol y el etanol, en tanto que para el resto de los solventes utilizados los valores experimentales difieren de los calculados, lo cual se reafirma al presentarse entre ellos un valor bajo del coeficiente correlación de 0.4456.

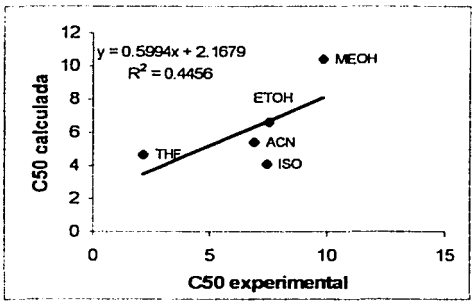


Figura 18. Comparación entre el C_{50} experimental y el valor de C_{50} obtenido a partir de DC (Capacidad de Desnaturalización) (Khmelnitsky *et al.*, 1991).

Con el fin de determinar el efecto de la hidrofobicidad de los solventes sobre la enzima, se utilizaron las ecuaciones deducidas a partir de la correlación entre el parámetro de hidrofobicidad del solvente reportado por Torres *et al.*, (1996) y el E_T [30] para la lignino peroxidasa. La C_{50} calculada a partir de la ecuación para ligninas peroxidasas frente a los valores de C_{50} experimentales presentan un valor de r^2 = 0.7491, dicho valor nos indica que el parámetro propuesto no explica adecuadamente el efecto de los solventes sobre la enzima. Sin embargo reafirma lo encontrado en el modelo de coeficiente de solubilidad con respecto a solventes como el tetrahidrofurano, en tanto que el comportamiento en la N,N- dimetilformamida no pudo ser explicado (Figura 19).

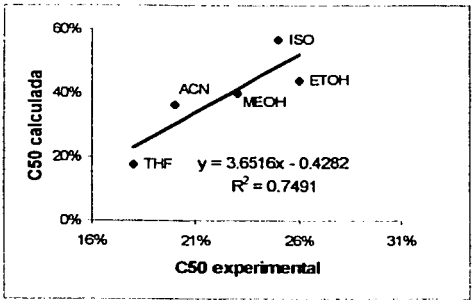


Figura 19. Correlación entre los valores de C_{50} experimentales y los calculados a partir del parámetro de Hidrofobicidad (Torres, *et al.*,1997).

Debido a que los modelos anteriores no explicaron adecuadamente el comportamiento experimental, se recurrió al modelo de coeficiente de solubilidad de Rosell *et al.*, (1995). En la Figura 20 se presenta la correlación entre los datos experimentales y los calculados a partir de este modelo observándose una buena correlación, lo que nos indica que la disminución de las interacciones hidrofóbicas son las principales responsables del cambio en la actividad catalítica.

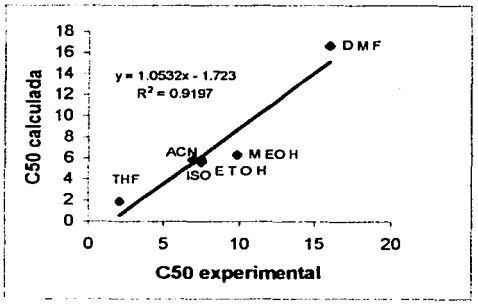


Figura 20. Correlación entre el C_{50} experimental y el C_{50} calculado con el modelo de Coeficiente de solubilidad. (Rosell, *et al.*, 1995)

Actividad enzimática versus conformación estructural en sistemas con solventes orgánicos

Con el fin de estimar el efecto de los solventes orgánicos sobre la estructura de la CPO, así como determinar si existe una relación entre dichos cambios y la actividad enzimática, se realizó un estudio de fluorescencia de la cloroperoxidasa en diferentes mezclas agua y solvente.

Como primera parte del trabajo se obtuvieron los espectros de emisión de la CPO en cada uno de los solventes usados; encontrando que al aumentar la concentración de solvente existe un desplazamiento de la longitud máxima de emisión a mayor longitud de onda, así como un aumento en la intensidad de emisión, como se muestra en la Tabla X. El metanol y la N,N dimetilformamida fueron los solventes donde se detectaron los mayores desplazamientos, cabe mencionar que las determinaciones se realizaron hasta observar la precipitación de la enzima.

SOLVENTE /CONCENTRACION	ACN	MEOH	ETOH	ISO	DMF	THF
0	318 (16.293)	318 (16.293)	318 (16.293)	318 (16.293)	318 (16.293)	318 (16.293)
10	318 (20.040)	318 (16.293)	318 (16.293)	317 (8.353)	319 (9.585)	323 (14.716)
15	318 (20.661)	318 (11.727)	318 (11.358)	ND	ND	ND
20	326 (32.940)	316 (12.054)	319 (14.715)	316 (9.954)	318 (8.494)	327 (44.868)
25	328 (35.473)	ND	ND	ND	ND	ND
30	332 (54.669)	319 (13.087)	323 (20.619)	321 (16.018)	319 (9.334)	329 (212.542)
40	334 (134.538)	329 (54.869)	330 (50.089)	327 (30.036)	330 (24.611)	329 (451.865)
50	P	335 (150.848)	333 (275.110)	330 (50.900)	335 (274.047)	328 (508.575)
60	P	P	333 (346.613)	P	P	328 (653.648)

Tabla X. Longitudes de onda máxima de emisión de la cloroperoxidasa en diferentes solventes. Entre paréntesis se muestra la intensidad a la emisión máxima ND no determinado; P precipitación de la CPO

Los datos anteriores fueron analizados basándose en el centro espectral de masas (CEM), que es un parámetro normalmente utilizado para describir los cambios conformacionales de las proteínas. En la Figura 21 se muestra los valores del CEM comparados con la actividad catalítica de la CPO. Como puede apreciarse en la Figura, el CEM sugiere que los cambios en la estructura terciaria son los responsables de los cambios de actividad catalítica.

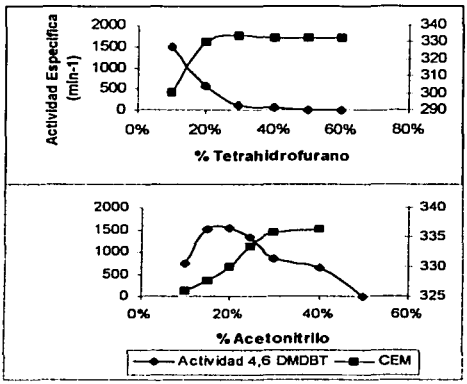


Figura 21. Correlación entre el Centro Espectral de Masas (CEM) y Actividad Específica (min-1) de CPO.

Para determinar si dichos desplazamientos se debían efectivamente a una alteración de la estructura de la enzima, se realizaron los espectros de emisión de la CPO en urea a diferentes concentraciones, los cuales se utilizaron como referencia de desnaturalización. Dichos espectros muestran que al aumentar la concentración de urea existe un aumento en la intensidad así como un corrimiento de la longitud máxima (Figura 22 y Tabla XI).

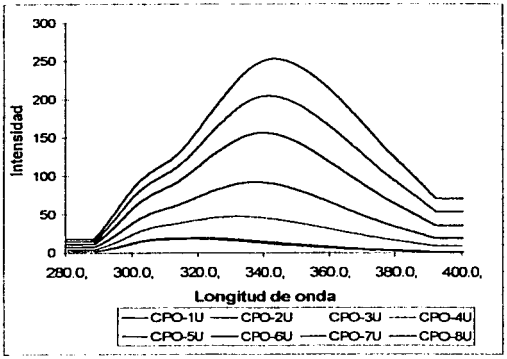


Figura 22. Efecto de la concentración de urea sobre la estructura de la cloroperoxidasa de *C. fumago*. (CPO 1U; corresponde a la concentración 1 molar de urea a la que se realizó el espectro y así sucesivamente)

Concentración urea (M)	λ_{max} (nm)	I_{max}
1	317	18.309
2	319	19.889
3	321	25.954
4	332	47.826
5	338	92.669
6	339	156.925
7	341	205.025
8	343	253.613

Tabla XI. Valores de λ_{max} e I_{max} de la CPO a diferentes concentraciones de urea.

Al compararse los espectros de emisión de la CPO, en diferentes sistemas (Figura 23) es evidente que el máximo de la CPO en condiciones naturales no concuerda con los máximos del resto de las soluciones, lo que indica que en cada una de las soluciones podría existir un mayor o menor grado de desnaturalización.

Ahora bien, la solución de CPO en 50 % de metanol presentó el máximo desplazamiento en la longitud de onda de emisión (Tabla X), la cual coincide con los desplazamientos en urea 5M (335 nm); apoyados en el reporte de Hang, *et al.* (2001), en el que se demostró que hasta una concentración 5M de urea se mantiene el 100 % de la actividad de la CPO, se puede concluir que los desplazamientos observados con los solventes no necesariamente implican una desnaturalización de la CPO.

Debido a que la desnaturalización causada por la urea es diferente a la causada por el solvente orgánico se realizó el espectro de emisión del triptofano en 50 % de metanol, que al ser comparado con el triptofano en solución acuosa (360 nm) mostró un desplazamiento del máximo hacia una longitud de onda menor de 360 a 350 nm. Este último resultado sugiere que los desplazamientos podrían deberse también a una modificación de la hidrofobicidad del medio.

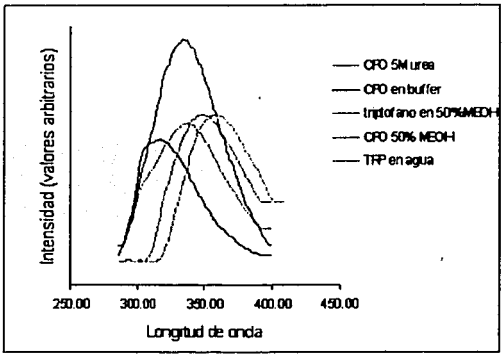


Figura 23. Estudio de desnaturalización de la enzima sobre la actividad de la cloroperoxidasa.

Los resultados anteriores indican que el comportamiento catalítico podrían no deberse sólo al efecto de los solventes sobre la estructura terciaria de la enzima, sino que pudieran también deberse a un cambio en la hidrofobicidad del microambiente del interior de la proteína.

Adicionalmente se determinó el efecto de los solventes sobre el sitio activo (grupo hemo) de la CPO. En la Tabla XII se muestran los cambios en los valores de la longitud de onda máxima de absorción (λ_{max}) del grupo hemo de la CPO. Como se puede apreciar, las $\lambda_{max's}$ se desplazan a longitudes de onda menores a medida que aumenta la concentración de solvente, llegando a un mínimo alrededor de 400 nm (un desplazamiento de 13 nm) para la mayoría de ellos.

Ha sido determinado anteriormente que los cambios en la λ_{max} del grupo hemo de la peroxidasa de rábano son indicativos de la penetración del solvente hacia el sitio activo, pudiendo o no causar cambios estructurales (Ryu y Dordick, 1992), pero si afectando principalmente la interacción sustrato – sitio activo (Ayyagari *et al.*, 2002). Esto sugiere que los cambios en el espectro de absorción pueden deberse a la penetración de solvente en la estructura de la enzima. Es decir, la hidrofobicidad del microambiente ha cambiado por la presencia del solvente en el interior.

SOLVENTE /CONCENTRACION	ACN	MEOH	ETOH	ISO	DMF	THF
	$\lambda_{max.}$ / ABS					
0	413 (0.228)	413 (0.228)	413 (0.228)	413 (0.228)	413 (0.228)	413 (0.228)
10	410 (0.210)	413 (0.205)	413 (0.223)	413 (0.238)	404 (0.239)	407 (0.184)
20	407 (0.229)	411 (0.205)	411 (0.207)	412 (0.240)	403 (0.229)	402 (0.234)
30	400 (0.310)	410 (0.216)	411 (0.209)	410 (0.249)	403 (0.232)	400 (0.376)
40	399 (0.332)	407 (0.231)	403 (0.235)	405 (0.221)	403 (0.293)	400 (0.376)
50	399 (0.352)	399 (0.299)	401 (0.266)	404 (0.240)	403 (0.291)	400 (0.430)

Tabla XII. Comparación de la $\lambda_{max.}$ del grupo hemo en los diferentes solventes ensayados. Entre paréntesis se encuentra el valor de la absorbancia.

Para determinar si la interacción sustrato – enzima era afectada por la penetración del solvente y por lo mismo era la causa de los cambios en el comportamiento catalítico de la CPO, se llevó a cabo la oxidación de tres sustratos diferentes con la CPO. Para ello se utilizó ABTS, pireno y 4,6 DMDBT. Los resultados con los tres sustratos muestran que ha mayor hidrofobicidad del sustrato la actividad catalítica se observó a una mayor concentración de solvente (Figura 24).

Estos resultados indican que al aumentar la hidrofobicidad del sustrato se favorece la biocatálisis a concentraciones de solvente más altas, lo cual puede ser explicado con base en la disminución de las interacciones hidrofóbicas provocadas por el solvente.

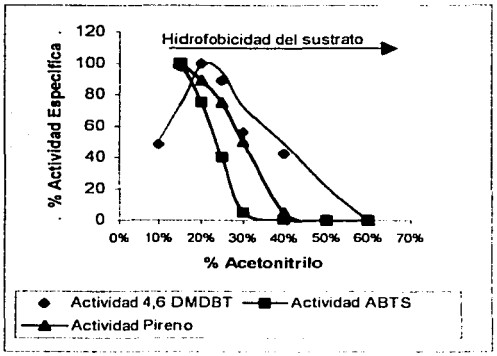


Figura 24. Efecto de la hidrofobicidad del sustrato sobre la biocatálisis del 4,6 DMDBT por la cloroperoxidasa de *C. fumago*

Es decir, es sabido que la interacción enzima sustrato es debida principalmente a interacciones de tipo hidrofóbico, las cuales disminuyen al adicionar solvente orgánico, desfavoreciendo el acomplejamiento sitio activo - sustrato. De esto se deduce que a mayor hidrofobicidad del sustrato, y por lo mismo mejor interacción con el sitio activo, la cantidad de solvente necesaria para romper esa interacción deberá ser más alta, lo cual explicaría los perfiles observados en la Figura 24, donde el 4,6 DMDBT (el más hidrofóbico con log P de 5.26) es oxidado hasta una concentración de acetonitrilo de 45%, mientras que el ABTS (log P $\leq$1.5) y el pireno (log P 4.93) son oxidados por la CPO hasta 25 y 35 % de acetonitrilo respectivamente.

Este último resultado nos permite confirmar que el comportamiento de la enzima en sistemas con solventes orgánicos, es debido tanto al efecto de los solventes sobre la estructura terciaria como al cambio en la hidrofobicidad del microambiente (disminución de interacciones hidrofóbicas) que por ende, ocasionan una partición desfavorable entre el sustrato y el sitio activo.

Alternativas en el mejoramiento de la biocatálisis

Inmovilización

Con el propósito de hacer de la cloroperoxidasa un biocatalizador más adecuado a los medios con solvente orgánico se propusieron algunas de las alternativas que se han estudiado para mejorar la actividad enzimática en medios no convencionales.

Como primer intento para mejorar la actividad de la enzima se inmovilizó a la enzima en dos diferentes geles. Primeramente se probó el affi-gel 15, el cual se une mediante una reacción de acoplamiento (Figura 25) a los grupos aminos libres de la enzima.

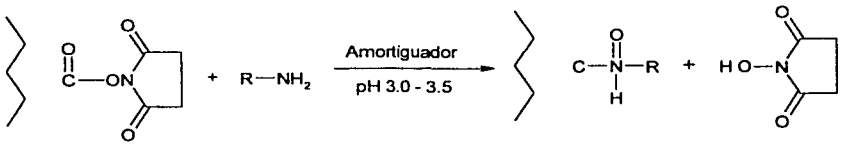


Figura 25. Esquematización de reacción de acoplamiento de affi-gel 15 con los grupos amino libres de la enzima

En tanto que el affi-gel 102 se une mediante una reacción de acoplamiento a los grupos carboxilos libres (Figura 26). Lo anterior se hizo con el fin de determinar las diferencias entre el acoplamiento con los grupos amino o carboxilo libres.

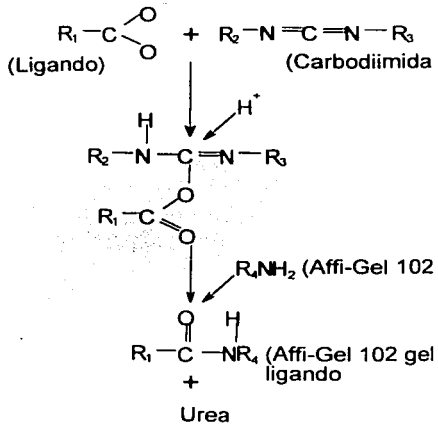


Figura 26. Esquematización de reacción de acoplamiento de affi-gel 102 con los carboxilos libres de la cloroperoxidasa (ligando).

Posterior, al proceso de inmovilización, se determinó la actividad de la enzima en acetonitrilo, determinando que se mantiene el mismo grado de actividad catalítica en ambos soportes. Al respecto existen reportes que indican que la inmovilización de la enzima ayuda a mejorar la estabilidad térmica y al solvente (Reyes *et al.*, 1999), lo cual nos llevó a considerar la inmovilización de la enzima, lo que nos permitiría disminuir la flexibilidad de la enzima y con ello evitar su desplegamiento y precipitación de la enzima a altas concentraciones de solvente.

Sin embargo, dicha inmovilización no mejoró la afinidad del sustrato con la enzima, lo cual pudiera deberse a que la inmovilización no evita posibles alteraciones en las interacciones en el sitio catalítico, es decir la inmovilización de la enzima no mejora la capacidad de oxidación del 4,6 DMDBT.

Modificación química

Como tercera opción para mejorar la actividad biocatalítica de la hemoproteína se modificó a la enzima en sus grupos aminos superficiales con polietilenglicol de 350 Da (PEG–350) (Figura 27). Lo anterior se realizó en base a los reportes existentes que muestran que la modificación con polietilenglicol ayuda a la solubilización de proteínas en sistemas con solventes orgánicos (Hernaiz, *et al.*, 1997), permitiendo la biocatálisis a altas concentraciones de solvente. Lo que nos llevó a considerar la posibilidad que la enzima se hiciera más estable si lográbamos aumentar la hidrofobicidad superficial de la proteína con lo que se lograría evitar la precipitación de la enzima en presencia de altas concentraciones de solvente.

Al realizar reacciones con la enzima modificada se encontró que la enzima mantiene la capacidad de oxidar al 4,6 DMDBT en un sistema con 85 % de acetonitrilo, lo cual se lleva a cabo también sin la modificación de la CPO; sin embargo en un sistema al 90 % de acetonitrilo se observa que no se presenta la oxidación de 4,6 DMDBT. En nuestro caso es posible concluir que dicha modificación no favorece la capacidad de oxidación de la CPO, sin embargo existen reportes que muestran que dobles modificaciones sobre la enzima con PEG producen aumentos de hasta 10 veces la catálisis, lo cual puede ser atribuido a un incremento de afinidad a sustratos hidrofóbicos (Torres, *et al.*, 2000; Tinoco y Vazquez-Duhalt, 1998).

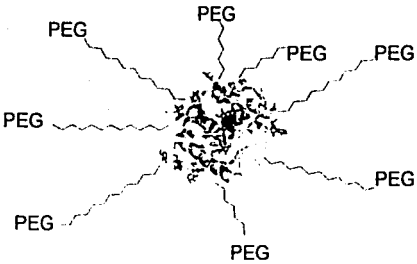


Figura 27. Esquematización de la modificación química realizada a la CPO con PEG

Finalmente podemos concluir, en nuestro caso, que la modificación de la CPO no favoreció la catálisis a mayores concentraciones de solvente, esto puede deberse a que la modificaciones propuestas, modificaciones tanto de los grupos carboxilos como de los grupos amino libres, no permitieron que se aumentara la formación del complejo sustrato proteína, es decir al realizar la modificación solo de los grupos aminos o carboxilos es posible que no se favorezca eficientemente el proceso de formación de dicho complejo.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Fluidos Supercríticos

Como una ultima propuesta al mejoramiento de reacciones en medios no convencionales y conociendo las convenientes propiedades de este tipo de sistema para las reacciones, se realizó un estudio de la actividad catalítica de la cloroperoxidasa en condiciones supercríticas.

Al encontrar que el 4,6 DMDBT es soluble bajo las tres condiciones propuestas de CO_2 supercrítico, se verificó la estabilidad de la hemoproteína bajo tales condiciones. Para ello se sometió a la enzima a las condiciones de extracción del sustrato; posteriormente se redisolvió a la enzima en 2 mL de amortiguador. Finalmente, se realizaron reacciones con pireno como sustrato (λ= 335nm ε=32.6mM^{-1} cm^{-1}) siguiendo la disminución de absorbancia espectrofotométricamente del mismo. Asimismo se cuantificó a la proteína con su respectivo coeficiente de extinción (λ= 403nm ε=75.3mM^{-1} cm^{-1}). La prueba anterior demostró que la estabilidad de la CPO es afectada significativamente, lo que se podría estar relacionado con la pérdida de las moléculas de agua esenciales para mantener su conformación estructural terciaria (Tabla XIII).

	Actividad especifica (min-1)	Actividad residual		Area Control	Area Reacción
Densidad = 0.74 Presión= 211bar Temperatura= 60C promedio	175.90 1172.23 1270.40 872.00	3.983273745 26.54509953 28.76808816 19.74637681	4,6DMDBT 100µL , Hidroperoxido de cumeno10 µL, CPO (304nmol/mL)20µL.	887.59 787.57	776.13 624.16
Densidad=0.25 Presión=76bar Temperatura=40C promedio	481.80 542.30 496.73 507.00	10.91037365 12.2804487 11.24851932 11.48097826		913 856.36	455.2 836.32
Densidad=0.85 Presión=76bar Temperatura=40C promedio	348.82 239.98 294.00	7.899034375 5.434278088 6.657608696		645.11 492.16	712.68 693.64
Control promedio	4601.23 4581.05 4066.44 4416.00	104.1944519 103.7374586 92.08413179 100			

Tabla XIII. Resultados de Fluidos supercríticos. En la parte de la izquierda se muestran los resultados de la actividad especifica de la CPO frente a pireno después de ser sometida a FSC. En la derecha se dan los valores de áreas del sustrato(4,6 DMDBT) posterior a la biocatálisis en FSC.

Posteriormente, con el fin de verificar que la enzima presentaba actividad biocatalítica bajo condiciones supercríticas, se colocó en el sistema a la CPO nativa (304 nmol/mL), con 4,6 DMDBT e hidroperóxido de cumeno 2 mM. En el análisis realizado por HPLC se muestra que la enzima no presentó la capacidad de oxidar al 4,6 DMDBT en las condiciones ensayadas.

Capítulo VI

CONCLUSIONES

- La CPO tiene la capacidad de oxidar al 4,6 DMDBT en sistemas con solventes orgánicos. El producto de la catálisis enzimática fue la sulfona del 4,6 DMDBT.

- La presencia de altas concentraciones de solventes orgánicos en el medio de reacción afecta importantemente la actividad de la cloroperoxidasa. Las actividades termodinámicas muestran que la CPO es más activa a bajos contenidos de solvente o altos contenidos de agua.

- El comportamiento de la enzima en los solventes pudo ser explicado parcialmente a partir del modelo termodinámico del Coeficiente de solubilidad, reflejando que la principal causa de la pérdida de actividad fue la disminución de las interacciones hidrofóbicas.

- Al parecer los solventes orgánicos utilizados no ocasionan cambios en la estructura terciaria de la CPO, los resultados sugieren que el solvente penetra al interior de la estructura alterando con ello la hidrofobicidad de dicho microambiente.

- Los estudios por espectrometría revelaron que el sitio activo de la CPO (grupo hemo) fue alterado debido a la penetración del solvente orgánico en su interior.

- La penetración del solvente orgánico al interior trae como consecuencia la disminución de las interacciones hidrofóbicas, y por ende, la disminución en el acoplamiento enzima sustrato (la partición desfavorable sitio activo-sustrato).

- Los intentos por mejorar las propiedades catalíticas de la enzima (modificación química, inmovilización y fluidos supercríticos) no repercutieron en el mejoramiento de la actividad de la CPO.

- A fin de utilizar a la cloroperoxidasa como biocatalizador en la oxidación de compuestos presentes en los derivados del petróleo, es necesario mejorar su estabilidad a los solventes, su actividad a bajos contenidos de agua y favorecer la partición del sustrato al sitio activo.

Capítulo VII

REFERENCIAS

- Adlercreuta, P. (1992). On the importance of the support material for synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. En: Biocatalysis in non conventional media. Eds por J. tramper, M.H. Vermüe and H. H. Beeftink, 55-61.

- Aguilar, M.R. (1997). Organic sulphur compounds in mexican diesel, **V Congreso Químico de América del Norte.**

- 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.

- Ayala, M., Robledo, R. N., Lopez-Munguia, A., Vazquez –Duhalt, R. (2000). substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase-catalyzed oxidation of diesel fuel. **Environ. Sci. Technol.** 34:2804-2809.

- Ayyagari, M.S.R, Kaplan, D.L., Chatterjee, S., Walker, J.E., Akkara, J. A. (2002). Solvent effects in horseradish peroxidase-catalyzed polyphenol synthesis. **Enzym. Microb. Technol.** 30: 3-9.

- Azenbacher, P., Niwa, T., Tolbert, L.M., Sirimanno, S.R., Guengerich, F.P. (1996). Oxidation of 9-alkylanthracenes by cytochrome P_{450} 2B1, horseradish peroxidase and iron tetraphenylporphine / iodosylbenzene systems: Anaerobic and aerobic mechanism. **Biochemistry** 35:2512-2520.

- Backes, W. L., Cawley, G., Eyer, C. S., Means, M., Causey, K. M., Canady, W.J. (1993). Aromatic hydrocarbon binding to cytochrome P_{450} and other enzyme bindings sites: Are hydrophobic compounds drawn into the activity site or pushed from the aqueous phase?. **Arch. Biochem. Biophys.** 304,1:27-37.

- 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** 20,4:728-756.

- Bezalel, L., Hadar,Y., Fu, P.P., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E. (1996). Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Plearotus ostreatus.* **Appl. Environ. Microbiol.** 62,7:2547-2553.

- 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.

- 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.

- Bogan, B.W., Lamar, R.T. (1996). Polycyclic aromatic hidrocarbon- degrading capabilities of Phanerochaete leavis HHB-625 and its extracellular lignolytic enzymes. **Appl. Environ. Microbiol.** 62, 5:1597-1603.

- Boldrin,B.,Thiem, A., Fritzche, C. (1993). Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by *Mycobacterium sp.* **Appl. Environ. Microbiol.** 59, 66:1927-1930.

- Bresster, D.C., Fedorak, P.M., Pickard, M. A. (2000). Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene and dibenzothiophene by laccase of Coriolopsis gallica UAMH 8260. **Biotechnol. Lett.** 22:1119-1125.

- Castro, B., Whitcombe, M., Vulfson, E. N., Vazquez-Duhalt, R., Barzana, E. (2001). Molecular imprinting for the selective adsorption of organosulphur compounds presents in fuels. **Anal. Chim. Acta.** 21037:1-8.

- Colonna, S., Gaggero, N., Casella, L., Carrea, G., Pasta, P. (1993). Enantioselective epoxidation of styrene derivates by chloroperoxidase catalysis. **Tetrahedron: Asymm.** 4,6:1325-1330.

- Constantino, H.R., Griebenow, K., Langer, R., Klibanov, A. M. (1997). On the pH memory of lyophilized compounds containing protein functional groups. **Biotechnol. Bioeng.** 53:345-348.

- De Santis, G., Jones, B. (1999). Chemical modification of enzyme for enhanced functionality. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10:324-330.

- Dordick, J. (1991). Applied biocatalysis. En: applied biocatalysis. **Eds by Harvey W. Blanch and Douglas S. Clark,** cap. 1: 1-52

- Dordick, J. S. (1989). Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.** 11:194-221.

- Fitzpatrick, P., Klibanov, A. M. (1991). How can the solvent affect enzyme enantioselectivity. **J. Am. Soc.** 113:3166-3171.

- García, D., Ortega, F., Marti, J.L. (1998). Kinetics of thermal inactivation of horseradish peroxidase: stabilizing effect of methoxypoly(ethylenglycol). **Biotechnol. Appl. Biochem.** 27:49-54.

- Geigert, J., Datielas, D. J., Neidleman, S. L., Lee, T. D., Wadswoth, J. (1983). Peroxide oxidation of primary alcoholes to aldehydes by chloroperoxidase catalysis. **Biochem. Biophys.Res.Commun.** 114,3:1104-1108.

- Ghatorae, A. S., Guerra, M. J., Bell, G., Halling, P. J. (1994). Immiscible organic solvent inactivation of urease, chymotrypsin, lipase and ribonuclease: Separation of dissolved solvent and interfacial effects. **Biotechnol. Bioeng.** 44: 1355-1361.

- Gmehline, J., Onken, U., Arh, W. (1981) Vapor- liquid equilibrium data collection. Aqueous- organic systems (supplement 1). Universitat Dortmund, Federal Republic of Germany.

- Griebenow, K., Klibanov, A. M. (1997). Can conformational changes be responsible for solvent and excipient effects on the catalytic behavior of subtilisin Carsberg in organic solvents? **Biotechnol. Bioeng.** 53:35-362.

- 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.

- Grimberg, S.J., Stringfellow, W.T., Aitken, M.D. (1996). Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomona stutzeri* P16 in the presence of nonionic surfactant. **Appl. Environ. Microbiol.** 62,7:2387-2392.

- Grossman M. (1995). Microbiological removal of organic sulfhur from fuel. **Exxon Reseach and Engineering. E. U**

- Halling, P. (1994) Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, test, and recommendations for experimental design and analysis. **Enzyme Microb.Technol.** 16:178-205.

- Halling, P. J. (1990). Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems. Predictions of effects on equilibrium position. **Biotechnol. Bioeng.** 35:691-701.

- Han, Y., J., Watson, J. T., Stucky, G. D., Butler, A. (2002). Catalytic activity of mesoporous silicate- immobilized chloroperoxidase. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** 17:1-8.

- Hernáiz, M. L. , Sánchez –Montero, J. M., Sinisterra, J. V. (1997). Influence of the nature of modifier in the enzymatic activity of chemical modified semipurified lipase from *Candida Rugosa.* **Biotechnol. Bioeng.** 55:252-260.

- Hublick, G., Schinner, F. (2000). Characterization and immobilization of the lacasse from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuos elimination of phenolic pollutants. **Enzyme Microb Technol.** 27: 330-336.

- 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.

- Kamat, S. V., Beckman, E. J., Russell, A. J. (1995). Enzyme activity in supercritical fluids. **Crit. Rev. Biotechnol.** 15,1:41-71.

- Kamat, S. V., Critehley, 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.

- Kamat, S. V., Iwaskewyez, 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.

- Khatisashvili, G., Gordeziani, M., Kvesitadze, G., Korte, F. (1997). Plant monooxygenases: participation in xenobiotic oxidation. **Ecotoxicol. Environ. Safety.** 36:118-122.

- Khmelnitsky, Y. L., Mozhaev, V.V., Belova, A. B., Sergeeva, M. V. Martinek, K. (1991). Denaturation capacity: a new quantitative criterion for the selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. **Eur. J. Biochem.** 198: 31-41.

- Khmelnitsky, Y., Rich, J. O. (1999). Biocatalysis in nonaqueous solvents. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 3:47-53.

- Kijama , T., Yamamoto, S., Kise, , H., (1996). Study of fluorescente and catalytic activity of α-chimotripsine in aqueous – organic media. **Enzyme Microb. Technol.** 18:2-6.

- Kise, H., Hayakawa, A. (1991). Immobilization of proteases on porus chitosan beads and their catalysis for ester and peptides synthesis in organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.** 13:584-588.

- Kitaguchi, H., Klivanov, A. M. (1989). Enzymatic peptide synthesis via segment condensation in the presence of water mimics. **J. Am. Chem. Soc.** 111:9272-9273.

- Klyachko, N.L., Klibanov, A. M. (1992). Oxidation of dibenzothiophene catalyzed by hemoglobin and other hemoproteins in various aqueous – organic media. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 37, 53-68.

- Kusk, K.O. (1981). Comparison of effects of aromatic hydrocarbons on a laboratory alga and natural phytoplankton. **Bot. Mar.** 24: 611-613.

- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.** 30: 81-87.

- Maldonado, M. C., Campero, S.A. (1973). Aspectos fundamentales de los procesos de refinación de petróleo; **Publicación Interna del IMP**, 23-44.

- Martinek, K., Semenov, A.N., Berezin, I.V. (1981). Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. **J. Appl. Biochem.** 3:93-126

- 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.

- McKetta, J.J., Encyclopedia of Chemical Processing and Design. (1980) Ed. Marcel Dekker. vol. 15, USA, 216-245.

- Mozhaev, V.V., Khmelnitsky, 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. Biochemical.** 184:597-602.

- Nakamura, K. (1990). Biochemical reactions in supercritical fluids. **TIBTECH.** 8:288-292.

- Ohya, Y., Miyaoka, J., Ouch., T. (1996). Recruitment of enzyme activity in albumin by molecular imprinting. **Macromol. Rapid. Commun.** 17:871-874.

- 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.

- Pipe, R.K., Moore, M.N. (1986). An ultrastructural study on the effects of phenanthrene on lysomal enzyme β-glucoronidase in digestive cell of periwinkle Littorina littorea . **Aquat. Toxicol.** 8:65-76.

- Reichard, C. (1979) . Empirical parameters of solvent polarity as linear free-energy relationships. **Angew. Chem. Int. Engl.** 18:98-110.

- Reyes, P., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R. (1999). Hidroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccasse. **Biotechnol. Lett.** 21: 875-880.

- Rodakiewicz- Nowak, J., Kasture, S.M., Dudek, B., Haber, J. (2000). Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal lacasses. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** 11: 1-11

- Rossell, 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.

- Ryu, K., Dordick, J. (1992). How the organic solvents affect peroxidase structure an function?. **Biochem.** 31:2588-2598.

- Ryu, K., Heo, J., Yoo, I. (2002). Removal of dibenzothiofene and its oxidized product in anhydrous water-immiscible organic solvents by immobilized cytochrome c. **Biotechnol. Lett.** 24:143-146.

- 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. **Biochem. Biophys. Acta.** 1253:94-102.

- Satoh, K., Sato, R., Takahata, T., Suzuki, S., Hayakari, M., Tsuchida, S., Hayatama, I. (1999). Quantitative differences in the active-site hydrophobicity of five human glutathione S- transferase isoenzymes: water-soluble carcinogen-selective properties of the neoplastic GSTP 1-1 species. **Arch. Biochem. Biophys.** 361,2:271-276.

- Savino, J.F., Tanabe, L.L., (1984). Sublethal effects of phenanthrene, nicotine and pinane on *Daphia pulex*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**42:778-784.

- Schlenk, D., Bevers, R. J., Vertino, A. M., Cerniglia, C. E. (1994). P_{450} catalysed S-oxidation of dibenzothiophene by Cunninghamella elegans. **Xenobiotica** 24,11: 1077-1083.

- Schmitke, J. L., Stern, L.J., Klibanov, A. M. (1997). The crystal structure of Subtilisin Carlsberg in anhydrous dioxane and its comparison with those in water and acetonitrilo. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 94:4250-4255.

- Slade, C.J., Vultson, E.N. (1998). Induction of catalytic activity in proteins by lyophilization in the presence of a transition state analogue. **Biotechnol. Bioeng.** 57:211-215.

- Sundaramoorthy, M., Terner, J.,Poulus, T. L. (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase – cytochrome P_{450} functional hybrid. **Structure.** 3: 1367-1377.

- Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. (1998). Chemical modifications of cytochrome c improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Enzyme Microb. Technol.** 22: 8-12.

- Torres, E., Sandoval, J.V., Rossell, F.I., Mauk, A.G., Vazquez- Duhalt, R. (1995). Site- directed mutagenesis improve biocatalytic activity of iso-1-cytochrome C in polycyclic hydrocarbons oxidation. **Enzyme Microb. Technol.** 17:1014-1020.

- Torres, E., Siminovich, B., Barzana, E., Vazquez-Duhalt, R. (1998). Thermodynamic hydrophobicity of aqueous mixtures of water-miscible organic solvents predicts peroxidase activity. **J. Mol. Catal. B: Enzym.** 4:155-159.

- Torres, E., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., (1997). Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hidrocarbons in media containing organic solvents. **Wat. Sci. Technol.** 36,10:37-44.

- Torres, E., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. (1996). Solvent hydrophobicity predicts biocatalytic behavior of lignin peroxidasa and cytochrome c in aqueous solution of water-miscible organic solvents. **J. Biotechnol.** 49: 59-67.

- Torres, E., Vazquez –Duhalt (2000). Chemical modification hemoglobin improves biocatalytic oxidation of PAH's. **Biochem. and Biophys. Res. Comm.** 273:820-823.

- Torres, R. E. (1998). Ingeniería de solventes en la biocatálisis con citocromo c. **Tesis de Maestría.** Universidad Nacional Autonoma de México.

- Van Deurzen, M. P. J. (1996). Selective Oxidations Catalyzed by chloroperoxidase. **Tesis Doctoral.** University of Technology, Julianalaan. The Newtherlands.

- Vazquez-Duhalt, R., Wastlake, D.W.S., Fedorak, P.M. (1993). Cytochrome c as a biocatalysis for the oxidation of thiophenes and organosulfides. **Enzyme Microb. Technol.** 15:494-499.

- 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.

- Volkering, F., Breure, A. M., Sterkenburg, A., van Andel, J.G. (1992). Microbial degradation of polycyclic aromatic hidrocarbon: efect of substrate availability on bacterial growth kinetics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36:548-552.

- Wangikar, P. P., Rich, J. O., Clark, D. S., Dordick, J. S. (1995). Probing enzymic transition state hydrophobicities. **Biochemistry**. 34:12302-12310.

- Xu, K., Griebenow, K., Klibanov, A.M. (1997). Correlation between catalytic activity and secondary structure of subtilisin dissolved in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.** 53: 351-362.

- Yang, B., Kuo, S., Hanyadi, P., Perkin, K. L. (1994). Solvent suitability for lipase- mediated acyl-transfer and sterification reactions in microaqueous milieu is related to substrate and product polarities . **Enzyme Microb. Technol.** 16: 577-583.

- Yazu, K., Yamamoto, Y., Furuya, T., Miki, K., Ukegawa, K. (2001). Oxidation of dibenzothiophenes in an organic biphasic system and its application to oxidative desulfuration of light oil. **Energy Fuels Comm.** 15:1535-1536.

- Zaks, A., Dodds, D.R. (1995). Chloroperoxidase- catalyzed asymmetric oxidations: substrate specificity and mechanistic study. **J. Am. Chem. Soc.** 117,42: 10419-10424.

- Zaks, A., Klibanov, A. (1985). Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. **Science.** 224:1249-1251.

- Zaks, A., Klibanov, A.M. (1988). The effect of water on enzymatic action in organic media. **J. Biol. Chem.** 263,17: 8017-8021.