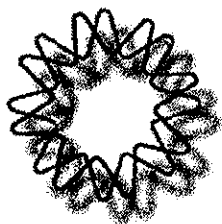


00591
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Instituto de Biotecnología

Obtención y caracterización de
cristales catalíticos de cloroperoxidasa

T E S I S

Que para obtener el título de

Doctora en Ciencias

Presenta

I.Q. Marcela Ayala Aceves

Cuernavaca, Morelos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mi querido esposo Andoni.

A mi querido amigo Raúl.

A la familia Ayala Aceves, con amor.

Si sobrevives, si persistes, canta,
sueña, emborráchate.
Es el tiempo del frío: ama,
apresúrate. El viento de las horas
barre las calles, los caminos.
Los árboles esperan: tú no esperes,
éste es el tiempo de vivir, el único.

Jaime Sábines

Agradecimientos

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por su orientación durante mi formación como investigadora. Gracias por el entusiasmo y las oportunidades que me brindaste para completar este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Agustín López-Munguía Canales, Dr. Eduardo Horjales Reboledo y Dr. Manuel Jiménez Estrada, por su comprometida participación durante el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Raunel Tinoco Valencia y a la Biól. Rosa Román Miranda por el entrenamiento y apoyo técnico proporcionado a lo largo de mi estancia en el Instituto de Biotecnología.

A los grupos del Dr. Rafael Vázquez, Dr. Agustín López y Dr. Eduardo Horjales por su excelente disposición y su colaboración incondicional.

Al Dr. Riccardo Basosi y a su grupo de investigación por su hospitalidad y cooperación durante mi estancia en la Universidad de Siena, Italia.

A los miembros del jurado: Dr. Mario Soberón Chávez, Dr. Sergio Revah Moiseeu, Dr. Edmundo Castillo Rosales, Dr. Eduardo Bárzana García, Dr. Enrique Rudiño Piñera y Dr. Rodolfo Quintero Ramírez, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y las sugerencias aportadas para su perfeccionamiento.

Al Instituto Mexicano del Petróleo (FIES 98-110-VI) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (33611-U) por el respaldo proporcionado a este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la UNAM por la beca y los apoyos para estudios de posgrado otorgados durante el periodo septiembre 1997-agosto 2002.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
1. Antecedentes	
1.1 Aplicaciones industriales de las enzimas.....	5
1.2 Estabilización de proteínas.....	11
1.3 Cristales entrecruzados de enzimas.....	17
1.4 La cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i>	23
1.5 BIODESULFURIZACIÓN.....	34
2. Hipótesis y objetivos.....	40
3. Protocolo experimental	
3.1 Reactivos.....	42
3.2 Equipo.....	42
3.3 Métodos.....	43
4. Resultados y discusión	
4.1 BIODESULFURIZACIÓN.....	49
4.2 Cristalización de la cloroperoxidasa.....	58
4.3 Entrecruzamiento de cristales de cloroperoxidasa.....	64
4.4 Propiedades de los cristales entrecruzados de cloroperoxidasa.....	74
5. Conclusiones y perspectivas.....	81
6. Bibliografía.....	84
7. Apéndices.....	96
7.1 Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization	
7.2 Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase-catalyzed oxidation of diesel fuel	
7.3 Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of <i>Caldariomyces fumago</i>	
7.4 Spectroscopic characterization of a manganese-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by <i>Bjerkandera adusta</i> in the absence of manganese: evidence of a protein centred radical by hydrogen peroxide	
7.5 Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes	
7.6 Cross-linked crystals of chloroperoxidase	

RESUMEN

La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* cataliza la oxidación de compuestos azufrados tales como los que se encuentran presentes en el diesel. Por esta razón, la capacidad catalítica de esta enzima resulta atractiva en procesos como la biodesulfurización. Sin embargo, al igual que muchas proteínas, la cloroperoxidasa pierde rápidamente su actividad en condiciones típicas de este tipo de industria, como son altas temperaturas o presencia de solventes orgánicos.

En este trabajo se reporta por primera vez la obtención de cristales entrecruzados de una peroxidasa, la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. Los cristales de esta enzima fueron entrecruzados con glutaraldehído para producir cristales catalíticamente activos e insolubles. A diferencia de otras preparaciones inmovilizadas de cloroperoxidasa, los cristales entrecruzados fueron más termoestables que la enzima libre. Se propone que este aumento en la estabilidad se debe a la conservación de la estructura tridimensional en el arreglo cristalino. Adicionalmente, se encontró que los cristales sin entrecruzar retienen más actividad que la enzima libre en presencia de un solvente orgánico con bajo contenido de agua.

Al comparar con la enzima libre se encontró que los cristales entrecruzados tienen una actividad específica menor. La eficiencia del entrecruzamiento depende de varios factores: los impedimentos estéricos que representa la glicosilación de la enzima; el reducido número de grupos aminos primarios en la superficie de la proteína y las condiciones de reacción poco favorables para el entrecruzamiento pero esenciales para la estabilidad de la enzima. Se estableció que un aumento en el número de grupos aminos en la superficie de la proteína favorece el entrecruzamiento de los cristales, aunque la actividad específica observada sigue siendo muy baja. Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten suponer que las modificaciones inespecíficas del glutaraldehído sobre algunos residuos y los problemas de accesibilidad de sustratos voluminosos hacia los sitios activos son responsables de este comportamiento.

En conclusión, se obtuvieron cristales entrecruzados de cloroperoxidasa cuya principal ventaja sobre la enzima libre es la mayor estabilidad que el estado cristalino confiere a las moléculas de proteína dentro del cristal. Estos cristales son más estables que la enzima libre en presencia de solventes orgánicos con bajo contenido de agua y resisten altas temperaturas.

ABSTRACT

Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* catalyzes the oxidation of sulfur-containing compounds like those present in diesel fuel. The catalytic efficiency of the enzyme in sulfoxidation reactions makes it a potential catalyst for biodesulfurization. However, chloroperoxidase is rapidly inactivated when exposed to high temperatures or organic solvents.

In this work, cross-linked crystals of a peroxidase have been obtained for the first time. Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* was crystallized and the crystals were cross-linked with glutaraldehyde. The cross-linked crystals were insoluble and catalytically active. An increase in the number of amino groups on the protein surface enhanced the cross-linking extent of the crystals. Unlike other immobilized preparations, cross-linked crystals of chloroperoxidase are more thermostable than the soluble enzyme. Probably the increased stability could be due to a better conservation of the protein tridimensional conformation inside the crystalline array. Moreover, non cross-linked crystals retained more activity than the soluble enzyme after exposure to an organic solvent. Cross-linked crystals showed lower specific activity than the soluble enzyme. This might be due to glutaraldehyde-derived inespecific modifications of some residues that might be important for catalysis. Accesibility problems for bulky hydrophobic substrates to active sites may also explain the lower activity of cross-linked crystals.

INTRODUCCIÓN

La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* tiene aplicaciones potenciales en diversos campos de la biotecnología. Una de ellas es la biodesulfurización de combustibles derivados del petróleo, como el diesel. Dentro de las características que hacen atractiva a la cloroperoxidasa para la industria petrolera están su eficiencia catalítica en la reacción de sulfoxidación y el amplio intervalo de sustratos azufrados que reconoce.

El diseño de un catalizador estable y reciclable es esencial para el desarrollo de procesos económicamente viables. Se ha reportado que los cristales entrecruzados de enzimas representan un tipo de biocatalizador atractivo para procesos que involucran condiciones de operación tales como el uso de solventes orgánicos y alta temperatura. Esto se debe a que dentro de un cristal de proteína existen contactos intermoleculares que estabilizan la estructura de las moléculas, lo que por un lado desfavorece la desnaturalización y la agregación de las moléculas de proteína y por otro lado mantiene la actividad catalítica bajo condiciones altamente desfavorables para las enzimas libres.

Tomando esto en consideración, en este trabajo se estudió la posible aplicación de la cloroperoxidasa en procesos de desulfurización. De esta manera se planteó como objetivo principal la obtención de cristales catalíticamente activos de cloroperoxidasa para el desarrollo de un biocatalizador insoluble y más estable que la enzima libre.

1. ANTECEDENTES

1.1 Aplicaciones industriales de las enzimas

La función de una enzima es la de cualquier catalizador: acelerar la velocidad de una reacción química, permitiendo al sistema alcanzar más rápido el equilibrio de reacción. Una enzima de origen microbiano es un catalizador con una estructura compleja de carácter proteico que se produce a partir de recursos renovables por medio de una fermentación. Cabe mencionar que la complejidad estructural de las enzimas es el resultado de millones de años de evolución, lo cual les permite catalizar diversas reacciones con gran especificidad.

La complejidad de las enzimas se traduce en ventajas muy particulares. Una de ellas es su alta selectividad química. Gracias a esta selectividad disminuyen los subproductos y las reacciones secundarias en el medio de reacción, lo que reduce costos y facilita la recuperación del producto. Además, una enzima puede ser muy selectiva para discriminar entre estereoisómeros y distinguir regiones y grupos funcionales dentro del sustrato. Las enzimas son capaces de funcionar a temperatura ambiente y presión atmosférica. Adicionalmente, las enzimas son biodegradables. Por último, las enzimas son catalizadores muy eficientes, acelerando la velocidad de una reacción en varios órdenes de magnitud.

Por sus ventajas las enzimas son cada vez más usadas en procesos industriales. Un ejemplo es la producción de más de 30,000 toneladas/año de acrilamida utilizando a la enzima nitrilo hidratasa (Figura 1.1.1) [1]. El proceso químico utiliza un catalizador de cobre que genera desechos tóxicos como HCN, opera a temperaturas entre 80° y 100°C y siempre produce ácido acrílico como subproducto. Por otro lado, el proceso enzimático opera a 10°C y produce acrilamida con un rendimiento del 100% [2]. Estas condiciones de reacción son ambientalmente deseables pues disminuyen el gasto en energía y la emisión de gases al ambiente.



Figura 1.1.1 Ejemplo de una reacción de producción de una sustancia química a escala industrial mediante una biotransformación

Debido a que las enzimas han sido diseñadas a la perfección por la naturaleza para cumplir con una función fisiológica, su actividad y estabilidad no siempre satisfacen las expectativas de un industrial o de un químico orgánico. De hecho, existe cierta resistencia a la idea de utilizar enzimas en ciertos campos de la industria. Esto se debe a la percepción de que las enzimas son catalizadores costosos y poco estables en las condiciones de operación de ciertos procesos, como la presencia de solventes orgánicos y alta temperatura. Esta idea no siempre es correcta. Por ejemplo, los precios de los catalizadores biológicos y los químicos no son tan diferentes (Tabla 1.1.1).

Tabla 1.1.1 Precios de catalizadores industriales [2]

Enzima	Dólares / kg	Catalizador	Dólares / kg
Deshidrogenasa láctica	100,000	BINAP	40,000
Esterasa de hígado porcino	15,000	Platino	12,000
Penicilina amidasa	10,000	ChiraPhos	10,000
Aspartasa	10,000	Sharpless	10,000
Tripsina	5,000	Pd(Diphos) ₂	5,000
Lipasa	5,000	Rh(PPh ₃) ₃ Cl	2,000
Glucosa isomerasa	500	Jacobsen	1,000
Proteasa de detergente	250	Chirald	500
Glucoamilasa	100	Niquel Raney	30

En términos económicos es más pertinente preguntarse cuánto contribuye la enzima al costo del producto final. La Tabla 1.1.2 muestra algunos ejemplos de productos cuya obtención involucra el uso de enzimas y nos permite afirmar que en ocasiones el costo de las enzimas representa solamente una pequeña parte del valor del producto [3].

Tabla 1.1.2 Costo de algunas enzimas en relación al valor del producto [3]

Producto	Cantidad de enzima (ppm)	Costo de la enzima (% del valor del producto)
Detergentes	150-200	1-4
Jarabe fructosado	150-200	2-3
Etanol	300-400	2-3
Queso	3-6	0.1-0.3

En cuanto a la estabilidad de las enzimas, el factor realmente importante es su estabilidad operacional. En la mayoría de los procesos biocatalíticos se utilizan preparaciones de enzimas inmovilizadas, que pueden ser recuperadas y reutilizadas. La estabilidad y estabilización de las enzimas serán discutidas en la siguiente sección.

El desarrollo de las aplicaciones industriales de las enzimas ha sido espectacular. En la década de los 80's las enzimas industriales tenían un mercado de 300 millones de dólares. Como resultado de los avances en la tecnología de ADN recombinante, las compañías incrementaron su producción e introdujeron nuevas enzimas al mercado. En la Tabla 1.1.3 se muestran ejemplos de algunas enzimas y el tipo de actividad en el que encuentran aplicación. La lista completa que incluye todas las enzimas que se utilizan en diagnóstico clínico, análisis de alimentos y en ingeniería genética, es larga y muy impresionante.

Tabla 1.1.3 Ejemplos de enzimas y su aplicación [3]

Enzima	Sustrato	Industria
Amilasas	Almidón	Jarabe fructosado, etanol
Glucosa isomerasa	Glucosa	Jarabe fructosado
Proteasas	Proteína	Detergentes, endulzantes, piel, lácteos, carne, bebidas, terapia
β -1,4-Galactosidasa	Lactosa	Lácteos
Pectinasa	Pectina	Bebidas
Lipasas	Grasa y aceites	Detergentes, lácteos
Colesterol oxidasa	Colesterol	Análisis de alimentos
Glucosa oxidasa	Glucosa	Diagnóstico clínico
Hexoquinasa	Glucosa, fructosa	Análisis de alimentos (bebidas)
Alcohol deshidrogenasa	Etanol	Análisis de alimentos (bebidas)
ADN polimerasas	ADN	Técnicas moleculares
Enzimas de restricción	ADN	Técnicas moleculares

Actualmente la industria de las enzimas tiene ventas anuales por 1,600 millones de dólares y aplicaciones en el procesamiento de almidón y alimentos (45%), en la formulación de detergentes (34%), en la industria textil (11%), en la industria de la piel (3%) y en procesamiento del papel (1.2%) [4]. Un signo del avance de esta industria es que más del 60% de las enzimas industriales son productos recombinantes. Es

interesante notar que las industrias de detergentes, alimentos y almidón representan el 75% del mercado y las enzimas que se utilizan son principalmente hidrolasas: proteasas, amilasas, lipasas y celulasas. Adicionalmente existe un mercado importante para las enzimas con aplicación en el diagnóstico clínico, las tecnologías analíticas y la industria farmacéutica. El volumen de ventas de algunas de las enzimas que se utilizan actualmente en diversos campos de la industria y la investigación se muestra en la Tabla 1.1.4.

Tabla 1.1.4 Volumen de ventas de algunas enzimas [4]

Enzima	Aplicación	Millones de dólares
Subtilisina	Detergentes	200
Quimosina	Fabricación de queso	140
Enzimas de restricción	Técnicas moleculares	100
Taq polimerasa	Técnicas moleculares	80
Enzimas terapéuticas	Farmacéutica	2,300

Pocas enzimas son vendidas directamente al público, como las enzimas incluidas en detergentes y en ablandadores de carne. En el sector químico y farmacéutico, las enzimas se utilizan para producir mejores o nuevos productos, los cuales son separados del medio de reacción y purificados. La Tabla 1.1.5 muestra el mercado mundial para algunos de estos productos obtenidos por reacciones enzimáticas.

Tabla 1.1.5 Volumen de ventas de productos obtenidos enzimáticamente [2]

Enzima	Producto	Millones de dólares	Industria
Glucosa isomerasa	Jarabe fructosado	1000	Alimentaria
Aminopeptidasa, termolisina	Aspartamo	800	Alimentaria
Nitrilo hidratasa	Acrilamida	300	Química
Penicilina amidasa	Ácido 6-aminopenicilánico	200	Farmacéutica

La especificidad de una enzima en la síntesis y resolución de intermediarios racémicos permite añadir valor agregado al producto y ahorrar costos [5]. Los compuestos enantioméricamente puros ocupan un lugar cada vez más importante dentro de las industrias química y farmacéutica. De los 100 fármacos más importantes a

nivel mundial, más de la mitad son compuestos quirales. El volumen mundial de ventas de fármacos quirales excedió los 123,000 millones de dólares en el 2000 [6]. Algunas de las enzimas que se utilizan para producir compuestos quirales con aplicación en diversas industrias se muestran en la Tabla 1.1.6 [7,8].

Tabla 1.1.6 Compuestos quirales producidos enzimáticamente [8]

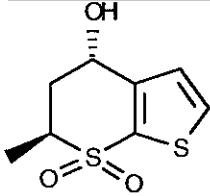
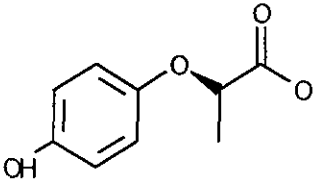
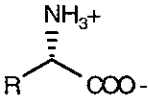
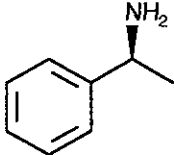
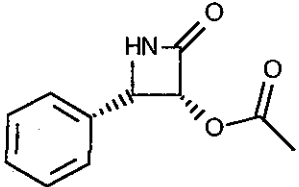
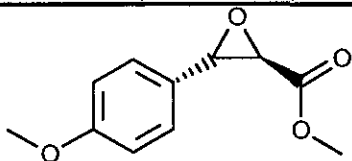
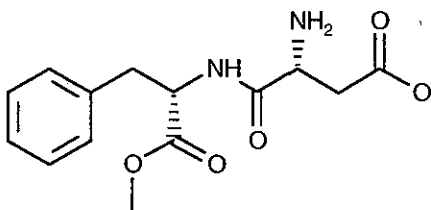
Producto	Aplicaciones, enzima, % ee, producción, compañía
 <p>(4S,6S)-5,6-Dihidro-4-hidroxi-6-metil-4H-tieno[2,3b] tiopiran-7,7-dióxido</p>	Intermediario en la síntesis de Trusopt para el tratamiento de glaucoma. Alcohol deshidrogenasa de <i>Neurospora crassa</i> . >98%, toneladas, Zeneca Life Science Molecules, Inglaterra
 <p>Ácido (R)-2-(4'-hidroxifenoxi) propiónico</p>	Intermediario en síntesis de herbicidas. Oxidasa de <i>Beauveria bassiana</i> . >98%, reactor de 120,000 L. BASF AG, Alemania
 <p>D-aminoácido</p>	Aditivo nutricional. D-aminoácido transaminasa de <i>Bacillus</i> . 100%, toneladas. NSC Technologies, Monsanto, EU
 <p>(S)-1-Feniletilamina</p>	Intermediario para farmacéuticos y pesticidas. Lipasa de <i>Burkholderia platarii</i> >99%, >100 ton/año. BASF AG, Alemania
 <p>Acetato de (3R,4S) cis-azotidinona</p>	Intermediario en la síntesis de paclitaxel usado en el tratamiento de cáncer. Lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i> . >99.5%, kilogramos. Bristol Myers Squibb, EU

Tabla 1.1.6 (continuación)



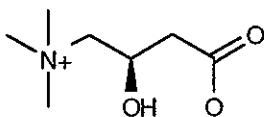
Intermediario en la síntesis de diltiazem. Lipasa de *Serratia marcescens*. **99.9%**. Tanabe Seiyaku Co. Ltd Japón y DSM, Holanda

(2R,3S)-3-(4-Metoxifenil) ácido glicídico metil éster



Endulzante bajo en calorías. Termolisina de *Bacillus proteolicus*. **>99.9%**, >2000 ton/año Holland Sweetener Company, Holanda

Aspartamo (α -L-aspartil-L-fenilalanina metil éster)



Aditivo nutricional para niños, deportistas y ancianos. Carnitina deshidratasa de *Escherichia coli*. **99.9%**, 300 ton/año. Lonza AG, Suiza

3-hidroxi-4-(trimetilamino) butanoato de (R)-L-Carnitina

ee: exceso enantiomérico

Las enzimas pueden competir con los catalizadores químicos. Las enzimas son biocatalizadores muy eficientes, son muy selectivas y son ambientalmente inocuas. Todas estas propiedades se traducen en beneficios económicos. Sin embargo las enzimas no siempre son estables bajo las condiciones de operación que requieren varios procesos industriales, lo cual limita su aplicación en este campo. Las enzimas pueden manipularse para modificar o mejorar su selectividad, estabilidad y actividad mediante la inmovilización, la modificación química o la ingeniería genética de proteínas. Es importante explorar aplicaciones novedosas y estrategias para el uso de las enzimas. En la siguiente sección se tratan algunas de las estrategias que permiten mejorar la estabilidad de las enzimas.

1.2 Estabilización de proteínas por inmovilización

La estabilidad estructural de las proteínas se debe a la suma de múltiples interacciones débiles. Las interacciones hidrofóbicas, los puentes de hidrógeno, los puentes salinos, las interacciones dipolo-dipolo y otras interacciones electrostáticas entre los grupos de átomos que conforman una proteína contribuyen a su estabilidad. A pesar de que la energía de cada una de estas interacciones es pequeña, el gran número que existe en una proteína hace que su contribución energética a la conservación de la estructura sea significativa [9]. Cuando las proteínas pierden su estructura tridimensional, es decir se desnaturalizan, pierden también su actividad biológica.

Hay varias maneras de estabilizar la estructura tridimensional de una proteína, por ejemplo manteniendo la temperatura por debajo de la temperatura fisiológica, añadiendo sustancias estabilizadoras o manipulando las propiedades de la proteína mediante ingeniería genética, modificación química e inmovilización [10]. Mientras que mantener la temperatura baja es una buena opción para almacenar enzimas, no es una alternativa práctica desde el punto de vista de un proceso ya que significa un gasto de energía y una disminución en la velocidad de reacción. La adición de sustancias estabilizadoras como polioles implica la introducción de compuestos extraños al proceso que después es necesario remover.

Los primeros métodos para modificar las propiedades de una enzima fueron métodos químicos. Actualmente con las técnicas de ingeniería genética de proteínas, es posible cambiar ciertas propiedades de una enzima y sobre todo determinar el papel que juegan residuos individuales en su función y estabilidad. Sin embargo, la modificación química sigue siendo una herramienta importante para influir en ciertas características de las enzimas [11]. Esta estrategia ofrece opciones únicas, ya que existe un gran número de agentes muy versátiles, de diferente tamaño, hidrofobicidad y reactividad que permiten realizar modificaciones químicas complejas. Se ha reportado que una de las modificaciones químicas que refuerzan la estructura compacta de la molécula de manera que no pierda su conformación es el entrecruzamiento intra e intermolecular con agentes bifuncionales. En ocasiones este entrecruzamiento químico confiere estabilidad térmica a las enzimas. [12-14]. Otro enfoque es introducir moléculas de alto peso molecular que contribuyen a la solubilización y estabilización de las enzimas en solventes orgánicos [15-17]. Generalmente estas moléculas son anfifílicas y

es posible que su efecto protector se deba a la rigidización de la estructura proteica y a la eliminación de repulsiones electrostáticas entre cargas superficiales [18].

La ingeniería de proteínas utiliza diferentes estrategias para modificar las propiedades de las enzimas [19]. El diseño racional es una de estas estrategias y requiere un conocimiento detallado de la estructura y mecanismo catalítico de la proteína para alterar sus propiedades de una manera dirigida [20]. Las interacciones dentro de la proteína regulan su estabilidad, actividad y especificidad. El conocimiento de esta compleja red de interacciones es incompleto y aún no se puede predecir confiablemente qué cambios estabilizarán a una enzima sin modificar otras propiedades [21]. En el otro extremo del abanico de estrategias se encuentra la mutación al azar. Este enfoque evolutivo no requiere mucha información sobre la enzima y se basa en la mutación y recombinación acompañada de una selección de las variantes con la propiedad deseada. Su éxito depende de la capacidad de realizar esta selección dentro de bibliotecas muy grandes de proteínas mutantes [22].

Las enzimas son catalizadores, por lo que no son consumidas durante las reacciones que involucra un proceso. Sin embargo, durante su uso pierden actividad por inactivación o desnaturalización. La inmovilización afecta la estabilidad de las enzimas, generalmente protegiéndolas contra la desnaturalización. Adicionalmente, cuando las enzimas son utilizadas en forma soluble su recuperación y reutilización no son económicamente viables. Bajo estas condiciones la enzima residual contamina al producto y su remoción involucra gastos de purificación adicionales.

Una forma de eliminar estos inconvenientes es la inmovilización de la enzima en un soporte adecuado que permita separarla del producto, recuperarla y reutilizarla. Durante la inmovilización las moléculas de proteína se fijan a un material inerte, formando otra fase sólida en el medio de reacción. Los sustratos y productos pueden difundir entre las dos fases. De esta manera, la enzima no contamina a la fase que contiene al producto y puede ser recuperada y reutilizada.

Debido a que la inmovilización supone un gasto adicional, tiene que haber una ventaja o beneficio económico para optar por la enzima inmovilizada. Generalmente este beneficio es una reducción en los gastos de purificación del producto. Algunas de las biotransformaciones industriales utilizan enzimas inmovilizadas, como se muestra en la Tabla 1.2.1.

Tabla 1.2.1 Aplicaciones industriales de enzimas inmovilizadas [23]

Enzima	Producto
Aminoacilasa	L-aminoácidos
Cianidasa	Ácido fórmico
Glucoamilasa	D-glucosa
Glucosa isomerasa	Jarabe fructosado
β -1,4-Galactosidasa	Lácteos sin lactosa
Nitrilo hidratasa	Acrilamida
Penicilina amidasa	Ácido 6-aminopenicilánico
Termolisina	Aspartamo

La inmovilización influye sobre la estabilidad y la actividad de la enzima, ya que el microambiente de la enzima inmovilizada depende de las propiedades del soporte. La inmovilización también puede generar problemas de difusión, por lo que la elección del soporte y del método de inmovilización es crítica. Dentro de las propiedades del soporte que son importantes considerar se encuentran la composición química, los grupos funcionales, la estabilidad mecánica y química, el tamaño de poro y el diámetro de partícula [24]. Los métodos de inmovilización pueden clasificarse en tres grupos (Tabla 1.2.2) dependiendo del tipo de interacción utilizada.

Tabla 1.2.2 Métodos para inmovilizar enzimas

Covalentes	No covalentes	Inclusión
Entrecruzamiento	Cristalización	Micelas
Unión a un soporte	Adsorción a un soporte	Membranas
Plásticos biocatalíticos	Secado	Polímeros
		Películas

La unión covalente de una o varias zonas de la proteína a un soporte puede compactar la estructura y estabilizar a la enzima frente a la desnaturalización [25,26]. Los llamados plásticos biocatalíticos consisten en la incorporación de moléculas de proteína a redes poliméricas, lo que rigidiza a la proteína y disminuye la modificación de su estructura tridimensional [27].

En el caso de las enzimas en solventes orgánicos puede utilizarse métodos no covalentes, aprovechando el hecho de que la mayoría de las proteínas no son solubles

en estos solventes. La cristalización de enzimas, en la que la enzima es a la vez catalizador y soporte, será discutida en la siguiente sección. Una de las alternativas más simples y efectivas cuando se utilizan solventes inmiscibles en agua es la adsorción de la proteína a un soporte [28]. Otra alternativa es la deshidratación, por ejemplo por liofilización, la cual genera un polvo enzimático seco que es insoluble en medios orgánicos y puede dispersarse y recuperarse al final de la reacción [29,30].

La inmovilización de la enzima por inclusión en una matriz polimérica, en una membrana o en micelas invertidas confina a la enzima a una fase diferente, permitiendo su separación del medio de reacción y su reutilización. Debido a la ausencia de interacciones covalentes entre la proteína y el soporte, su inclusión en una membrana no contribuye a estabilizar a la enzima. En el caso de las micelas invertidas la movilidad de las proteínas se ve restringida y puede aumentar su estabilidad [31]. La inclusión de una enzima en una película también genera un biocatalizador estable y reutilizable [32].

La mayoría de los métodos de inmovilización requiere la optimización de una serie de variables. Por ejemplo, la relación enzima/soporte, el pH, el solvente utilizado y la presencia de aditivos protectores. En condiciones no optimizadas pueden existir problemas como son el bloqueo de sitios activos, la conformación inadecuada de la enzima, la baja afinidad entre la enzima y el soporte y la desnaturalización de la enzima.

Las primeras biotransformaciones industriales se realizaron sobre sustratos solubles en agua [33]. Actualmente muchos de los compuestos orgánicos de interés para la industria química y farmacéutica son poco solubles en agua. La biocatálisis en medios orgánicos es un campo muy estudiado debido a los retos que supone [34,35]. Las proteínas son inestables y tienden a desnaturalizarse rápidamente en mezclas de agua y solvente orgánico. Sin embargo en solventes orgánicos anhidros o con bajo contenido de agua, la flexibilidad de las proteínas se ve reducida. Mientras que el agua actúa como lubricante, las moléculas de solvente orgánico no interactúan de la misma manera con la proteína ya que no tienen la misma capacidad que el agua de formar puentes de hidrógeno; además, debido a la baja constante dieléctrica de estos solventes las interacciones electrostáticas intra-proteína son más fuertes. En consecuencia, en un solvente orgánico anhidro la proteína tiene menos movilidad y su estructura es más rígida.

La disminución en la movilidad de las proteínas en presencia de solventes orgánicos ha sido detectada mediante la difracción de rayos X de cristales de incubados en algunos solventes [36,37]. Aparentemente, la movilidad y por consiguiente la

desnaturalización de las moléculas de proteína es menos favorecida en solventes orgánicos con bajo contenido de agua [38,39]. Desde el punto de vista catalítico esta falta de flexibilidad tiene sus desventajas y puede disminuir la actividad enzimática drásticamente. Sin embargo, no todos los solventes interactúan de la misma manera con las proteínas. Los solventes orgánicos polares son más perjudiciales para la actividad enzimática que los solventes más hidrofóbicos, debido a que los primeros pueden secuestrar con más facilidad las moléculas de agua fuertemente unidas a la proteína. Estas moléculas de agua son esenciales para mantener cierta movilidad y sin este mínimo contenido de agua, la estructura enzimática podría ser demasiado rígida para efectuar la catálisis [34,40].

Existen varias maneras de mejorar la estabilidad y actividad de las enzimas en solventes orgánicos [39,41]. Por ejemplo, se pierde más actividad al liofilizar a una enzima que al ponerla en contacto con un solvente orgánico. Para resolver este problema, pueden añadirse lioprotectores y análogos de sustratos para mantener mejor la estructura tridimensional original de la proteína y la integridad del sitio activo [41,42]. También pueden añadirse aditivos que favorecen la flexibilidad en el medio orgánico, como sales, agentes desnaturalizantes o macromoléculas que reducen las interacciones electrostáticas [43-45]. Es muy importante considerar que la adición de algunos solventes orgánicos puede afectar el estado de protonación de algunos residuos; estos cambios pueden desestabilizar a la enzima [46]. Se pueden seguir varias estrategias para controlar el estado de protonación de los aminoácidos cuando las proteínas se encuentran en un medio orgánico, por ejemplo adicionar amortiguadores de pH orgánicos, que son solubles en este tipo de solventes [47,48].

Recientemente se ha reportado el uso de cristales entrecruzados como una alternativa para la inmovilización de enzimas [24]. Dentro de los cristales, la desnaturalización de las moléculas de proteína es desfavorecida. Por esta razón los cristales retienen su actividad catalítica bajo condiciones que desnaturalizan a la mayoría de las proteínas, incluyendo la presencia de solventes orgánicos y alta temperatura.

La biocatálisis en solventes orgánicos expande las posibilidades del uso industrial de las enzimas. También supone vencer una serie de obstáculos, puesto que la mayoría de las enzimas evolucionaron para realizar su función en un medio acuoso y su estabilidad en presencia de solventes orgánicos no siempre es la deseada.

Aunque la presencia de solventes orgánicos afecta a las propiedades de las enzimas, es posible usarlas de una manera eficiente si se identifican los factores clave que limitan la actividad y sistemáticamente minimizar o eliminar sus efectos. En la Tabla 1.2.3 se mencionan algunos de estos factores y las soluciones que permiten mejorar la actividad enzimática en solventes orgánicos.

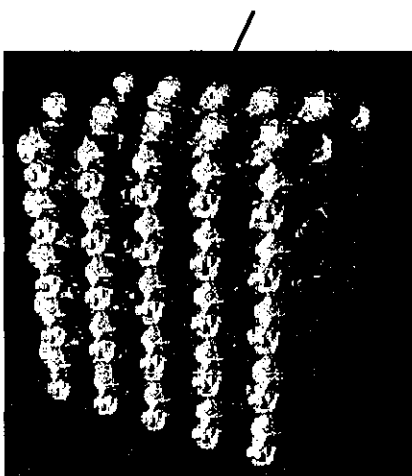
Tabla 1.2.3 Problemas de la biocatálisis en solventes orgánicos [38]

Problema	Solución
<ul style="list-style-type: none"> • Problemas de difusión • Sitios activos bloqueados • Cambios de estructura • Partición desfavorable de sustratos hidrofóbicos • Movilidad reducida • pH no óptimo 	<ul style="list-style-type: none"> • Disminuir el tamaño de partícula; usar agitación vigorosa • No utilizar partículas amorfas • Adicionar aditivos (lioprotectores, polímeros) • Seleccionar un solvente que interactúe desfavorablemente con el sustrato • Optimizar la actividad de agua; adicionar co-solventes o aditivos. • Controlar el pH de la deshidratación; usar amortiguadores de pH orgánicos

1.3 Cristales entrecruzados de enzimas

En los cristales de proteínas, las moléculas están arregladas simétricamente con una orientación definida. Estos cristales son materiales porosos que poseen canales entre las moléculas de proteína. El solvente en los canales puede ocupar entre 27% y 65% del volumen del cristal y está disponible para la difusión de moléculas [49,50]. Los canales pueden tener un diámetro de entre 20 y 100 Å, dependiendo de la proteína y del arreglo espacial del cristal [51]. La reactividad de las enzimas en su estado cristalino depende de la preservación de la estructura nativa y de la difusión de los sustratos y productos a través de los canales. Aunque algunas enzimas no retienen su actividad en el estado cristalino debido a efectos estéricos o rigidización generados por contactos intermoleculares, varias enzimas pueden cristalizar en una conformación catalíticamente activa. Los cristales de enzimas globulares pueden considerarse como arreglos abiertos de moléculas con algunos sitios de contacto intermolecular y en promedio 50% de su volumen constituido por solvente.

En la Figura 1.3.1 se muestra una imagen generada por computadora de la carboxipeptidasa (PM=110,000) en estado cristalino. Como se puede apreciar en la imagen, las moléculas de proteína en los cristales no forman una estructura impenetrable sino que existen espacios entre las moléculas a través de todo el cristal. El sustrato de esta enzima, un dipéptido (PM=208, en rojo), puede fácilmente difundir a través de los poros para llegar al sitio activo de las moléculas de enzima en el interior del cristal.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1.3.1 Representación de un cristal de carboxipeptidasa

La cristalización de proteínas es un proceso en el que participan muchos factores. La obtención de los cristales es el resultado de la precipitación controlada de una solución concentrada de proteína. Para que los cristales mantengan su integridad, la combinación de los factores que permitieron la cristalización no debe alterarse. Pequeños cambios en el pH, la temperatura y la concentración de sales u otros componentes de la solución de cristalización son suficientes para destruir estos cristales. A diferencia de los cristales de sales, los cristales de proteína son mecánicamente muy frágiles debido a la naturaleza y al menor número de contactos que existen entre las moléculas. De hecho, esta característica se utiliza para averiguar si un cristal es de sal o de proteína: la prueba consiste en tocar al cristal con una aguja y observar al microscopio si el cristal se pulveriza.

El entrecruzamiento químico de las moléculas que componen un cristal de enzima sirve para estabilizar el arreglo cristalino, de manera que aumenta la resistencia del cristal fuera de la solución de cristalización. Quiocho y Richards fueron los primeros en reportar en 1964 la estabilización de un cristal mediante el entrecruzamiento con glutaraldehído [52]. Su intención fue estabilizar mecánicamente al cristal para que resistiera por más tiempo la radiación de los rayos X y de esta manera obtener un mejor patrón de difracción. Estos investigadores encontraron que los cristales se volvían insolubles después del tratamiento y que retenían su actividad enzimática en solución acuosa [53,54]. Posteriormente, diversos autores reportaron algunas propiedades de cristales entrecruzados de otras enzimas, como las constantes catalíticas, la afinidad por sustratos, inhibición, el perfil de pH, los problemas de difusión y la resistencia a proteólisis y a agentes desnaturalizantes [55-58].

El interés por los cristales entrecruzados se renovó recientemente cuando una compañía patentó la tecnología para producir cristales entrecruzados de enzimas (CLEC) [59,60]. Los cristales entrecruzados de enzimas tienen ciertas propiedades atractivas desde el punto de vista de la biocatálisis industrial, la más obvia es su carácter de partícula macroscópica compuesta por enzima. En efecto, el cristal entrecruzado es en sí mismo un conjunto de moléculas de enzima inmovilizadas que no requiere de soportes adicionales. Las partículas que conforman este biocatalizador pueden separarse del medio de reacción mediante procedimientos convencionales, como filtración o centrifugación.

Actualmente estas preparaciones están disponibles comercialmente [61]. La Tabla 1.3.1 lista los cristales entrecruzados ofrecidos por Altus Biologics, Inc.

Tabla 1.3.1 CLEC disponibles comercialmente [61]

Enzima	Origen
Alcohol deshidrogenasas	<i>Thermobacterium brokii</i> , hígado de caballo
Asparaginasa	<i>E. coli</i>
Elastasa	Páncreas porcino
Esterasas	Hígado porcino, bacterias
Glucosa Isomerasa	<i>Streptomyces rubiginosus</i>
Glucosa Oxidasa	<i>Aspergillus niger</i>
Lipasas	Páncreas porcino, bacterias, hongos
Luciferasa	Bacterias y luciérnagas
Lisozima	Clara de huevo
Penicilina Acilasa	<i>E. coli</i>
Subtilisina	<i>Bacillus</i> sp.
Termolisina	<i>Thermoproteolyticus rokko</i>
Ureasa	Extracto de frijol

A menudo la cristalización de proteínas se concibe como un arte, debido a la dificultad metodológica que representa esta etapa en el proceso para obtener la estructura tridimensional de una proteína. Debido a la calidad que deben tener, la obtención de los cristales apropiados para obtener información estructural mediante la difracción de rayos X es un proceso laborioso que puede tomar mucho tiempo. Es importante que los cristales tengan un buen tamaño (> 0.2 mm) con el fin de producir una señal detectable, deben ser lo suficientemente resistentes para soportar la manipulación y la radiación necesarias para coleccionar los datos y es importante que no tengan defectos que impidan la interpretación del patrón de difracción. Sin embargo, para aplicaciones biocatalíticas no es necesario contar con cristales tan grandes ni tan perfectos. Más aún, se requieren microcristales con dimensiones pequeñas para evitar problemas de difusión. Los cristales con menos de $100 \mu\text{m}$ en alguna de sus dimensiones son preferidos para aplicaciones químicas porque las limitaciones de transferencia de masa son reducidas y el tamaño es adecuado para recuperarlos por filtración [24,62]. Microcristales con estas características se producen muy frecuentemente durante la cristalización de proteínas. Incluso existen procedimientos para producir cristales con estas características a gran escala [63].

La propiedad más interesante y atractiva desde el punto de vista de la biocatálisis es la sorprendente estabilidad que muestran los cristales entrecruzados. Estos cristales son entre 2 y 4 órdenes de magnitud más estables que las enzimas libres cuando son expuestos a solventes orgánicos, temperaturas altas y degradación enzimática [62,64-70]. La Tabla 1.3.2 muestra la estabilidad de los cristales entrecruzados bajo diferentes condiciones.

Tabla 1.3.2 Estabilidad de cristales entrecruzados de diferentes enzimas [62]

Enzima	Medio	$t_{1/2}$ enzima libre	$t_{1/2}$ cristal
Lipasa	Acuoso, 40°C	5 h	13 días
	50% tetrahidrofurano, T amb.	2 h	} > 5 días
	50% dimetilsulfóxido, T amb.	18 h	
	50% dimetilformamida, T amb.	20 h	
	Proteasa	< 1 h	
Termolisina	Acuoso, 60°C	6 h	} > 5 días
	50% dimetilformamida, 40°C	8 h	
	50% acetona, 40°C	3 h	
	50% tetrahidrofurano, 40°C	1.5 h	} > 18 días
	Acetato de etilo, 55°C	< 3 días	
	Proteasa	< 5 min	
Subtilisina	Acuoso, 70°C	10 min	5 h
	50% tetrahidrofurano, T amb.	45 min	170 h
Alcohol deshidrogenasa	Acuoso, 30°C	14 días	>3 meses
	25% isopropanol, 40°C	4 h	> 4 días

Los cristales entrecruzados también son estables a la agitación mecánica; experimentos realizados en pequeña escala que simulan las condiciones encontradas en un tanque agitado, sugieren que la velocidad de agitación necesaria para mantener una dispersión homogénea de los cristales no provoca su destrucción [71]. Adicionalmente los cristales entrecruzados mantienen su capacidad de catalizar reacciones con alta selectividad y pueden ser recuperados y reutilizados en varios ciclos de reacción, lo cual aumenta la productividad del proceso [72,73]. Todas estas

propiedades señalan a los cristales entrecruzados como catalizadores muy prometedores. El escalamiento a 100 L de un proceso biocatalítico para la resolución de una mezcla racémica utilizando cristales entrecruzados de lipasa indica que es una alternativa económicamente viable [73].

La aplicación de los cristales entrecruzados no se limita a la síntesis de compuestos ópticamente activos [74]. En la literatura pueden encontrarse ejemplos de otra índole. Por ejemplo, los cristales de la enzima organofósforo liasa pueden ser de utilidad en la degradación de compuestos neurotóxicos [75]. También se ha discutido el potencial uso de los cristales en la aplicación de vacunas y otros fármacos de lenta liberación [76]. Incluso se ha sugerido que su estabilidad y porosidad los convierten en mallas moleculares bioorgánicas para separar moléculas pequeñas [51].

La estabilidad de los cristales entrecruzados proviene del arreglo simétrico de las moléculas y del entrecruzamiento de este arreglo. Si el cristal no se entrecruza, no es estable y se disuelve. Para algunas enzimas se ha encontrado que cuando se entrecruza a la enzima libre o un precipitado amorfo de la misma, su estabilidad no aumenta de la misma manera que cuando se parte de la enzima en forma cristalina [62]. En la matriz cristalina en donde el empaquetamiento de las moléculas de proteína se acerca al límite teórico, existe un gran número de interacciones intermoleculares de tipo hidrofóbico y electrostático que pueden mejorar la estabilidad de la proteína y desfavorecer la desnaturalización y la agregación. Adicionalmente la estructura de las proteínas puede ser estabilizada por el entrecruzamiento de manera equivalente a una enzima inmovilizada a un soporte mediante múltiples enlaces, previniendo de esta manera la desnaturalización [77].

La actividad específica de los cristales entrecruzados puede ser igual o menor a la que exhibe la enzima libre [77,78]. Entre los factores que pueden influir sobre la actividad de manera importante se encuentran el tamaño del cristal, el tamaño del sustrato y la conformación de la enzima en el cristal. El espesor del cristal debe mantenerse dentro de un límite para evitar problemas difusionales. De la misma manera, los sustratos demasiado voluminosos tendrán problemas para difundir al interior del cristal a través de los poros. Si el espesor del cristal o el tamaño del sustrato son demasiado grandes, la enzima que se encuentra en el centro del cristal no participará en la catálisis y solamente será productiva la enzima localizada en la superficie del cristal. El efecto macroscópico derivado de esta situación es una reducción en la velocidad de la reacción. El espesor y el tamaño de los sustratos

apropiados varían según la enzima y el tipo de cristal que ésta forme. Por otro lado, la movilidad de la enzima puede estar restringida dentro del cristal y debido a la falta de flexibilidad, la velocidad de la reacción también puede verse disminuida.

Otras variables que deben cuidarse al utilizar cristales entrecruzados, sobre todo en solventes orgánicos, son el pH y la forma de deshidratar al cristal. Debido a que la concentración de proteína en los cristales es muy alta, debe utilizarse un amortiguador lo suficientemente fuerte para controlar el pH. En solventes orgánicos existe además la dificultad de mantener la protonación de los residuos en el estado óptimo para la catálisis. Esto puede resolverse utilizando amortiguadores solubles en solventes orgánicos [79]. También es importante revisar el modo en que se deshidrata un cristal antes de utilizarlo en un solvente orgánico. Esto puede afectar profundamente el contenido del agua esencial para la catálisis y la conformación de las moléculas de enzima, perjudicando la actividad catalítica [80]. La actividad de los cristales entrecruzados en solventes orgánicos puede verse afectada por los mismos factores que las enzimas libres (ver Tabla 1.2.3) y puede verse disminuida en varios órdenes de magnitud [81]. Las soluciones son similares en ambos casos: optimizar el estado de protonación de los residuos, seleccionar un solvente que minimice la partición desfavorable del sustrato y mantener la actividad de agua en un nivel apropiado para la catálisis.

La inmovilización de enzimas para su uso en un proceso biocatalítico se traduce en beneficios económicos. Permite que el catalizador sea separado del producto y recuperado y reutilizado. También representa beneficios adicionales, como la estabilización de las enzimas. Existen numerosos métodos y técnicas de inmovilización que pueden ser utilizados de acuerdo con las propiedades de la enzima y de la reacción que se desea catalizar. Los cristales entrecruzados de enzimas se presentan como una forma de inmovilización novedosa que confiere estabilidad a las moléculas de proteína, previniendo su desnaturalización e inactivación en presencia de solventes orgánicos y altas temperaturas. A diferencia de las proteínas inmovilizadas en soportes inertes, los cristales enzimáticos son catalizadores con altísima actividad específica en términos de velocidad por unidad de peso. Sin embargo, al igual que con las enzimas de uso industrial, actualmente la mayor parte de estos cristales se componen de hidrolasas, lo que limita su aplicación a otros procesos como los de óxido-reducción.

1.4 La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*

Las peroxidases son enzimas que utilizan peróxido para catalizar la oxidación de un sustrato. La mayoría contiene metales y de éstas, la mayor parte contiene un complejo hierro-porfirina llamado hemo [82]. Existe otro tipo de metalo-peroxidases que contienen vanadio o selenio en lugar de hemo. Las hemo peroxidases pueden clasificarse con base en su secuencia de aminoácidos en dos superfamilias: peroxidases de mamíferos y peroxidases de plantas [83]. La primera superfamilia incluye enzimas como la lactoperoxidasa, la mieloperoxidasa y la prostaglandina H sintasa. La segunda superfamilia se encuentra dividida en tres clases. La clase I incluye a las peroxidases intracelulares, como la citocromo c peroxidasa de levadura y la ascorbato peroxidasa de cloroplasto. La clase II comprende a las peroxidases extracelulares de hongos, como la lignino peroxidasa y la manganeso peroxidasa. La clase III incluye a las peroxidases de plantas como la peroxidasa de rábano blanco. Con base en una comparación entre las secuencias de aminoácidos, se ha propuesto que las hemo peroxidases de bacterias, hongos y plantas tienen un ancestro común [83]. En la Tabla 1.4.1 se listan algunas hemo peroxidases y su función en la naturaleza.

Tabla 1.4.1 Ejemplo de hemo peroxidases y su función biológica [84]

Peroxidasa	Origen	Función
Cloroperoxidasa	<i>Caldariomyces fumago</i>	Biosíntesis de caldariomicina
Citocromo c peroxidasa	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	Reducción de H ₂ O ₂ y oxidación de citocromo c
Peroxidasa de rábano	<i>Armoracia rusticana</i>	Biosíntesis de hormonas de plantas
Lactoperoxidasa	Leche bovina	Antimicrobiana
Lignino peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Degradación de lignina
Mieloperoxidasa	Leucocitos humanos	Antimicrobiana

Existe un tipo de peroxidases llamadas haloperoxidasas. En la naturaleza las haloperoxidasas catalizan la oxidación de haluros utilizando H₂O₂, resultando en la halogenación de compuestos orgánicos. Mientras que existen haloperoxidasas sin ningún grupo prostético en su sitio activo, también existen metalo-haloperoxidasas que

pueden tener vanadio o un grupo hemo. Las primeras son de origen bacteriano mientras que las que contienen vanadio son producidas principalmente por algas y hongos. Por otro lado, la única hemo haloperoxidasa que ha sido caracterizada bioquímicamente es la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. Otras hemo haloperoxidasas de algas y de bacterias han sido aisladas, aunque no han sido caracterizadas [85-87]. La cloroperoxidasa de *C. fumago* tiene una actividad específica de 1000 $\mu\text{mol}/\text{mg min}$, la más alta de todas las haloperoxidasas, usando como sustrato una dicetona cíclica llamada monocorodimedona [86].

Las haloperoxidasas no muestran homología entre ellas ni con las hemo peroxidases descritas anteriormente [88,89]. La cloroperoxidasa de *C. fumago* presenta un plegamiento único y es estructuralmente diferente a cualquier otra hemo peroxidasa conocida. Es decir, la cloroperoxidasa no parece estar relacionada evolutivamente con las demás hemo peroxidases. Esta es sólo una de las características que hacen de la cloroperoxidasa una proteína poco común entre las de su clase.

La cloroperoxidasa de *C. fumago* es una proteína extracelular que puede alcanzar una concentración de hasta 100 mg/L [90]. La enzima tiene un peso molecular aproximado de 42,000 Da y un grado de glicosilación de 20-35%. El patrón de glicosilación depende de la cepa y del medio de cultivo; en la enzima que se utilizó para este estudio los carbohidratos predominantes son manosa y glucosa y en menor proporción glucosamina, xilosa y galactosa [91,92]. La cloroperoxidasa es una proteína monomérica con un grupo prostético hemo IX (Figura 1.4.1). Los sitios de glicosilación son principalmente treoninas y serinas, aunque también se han detectado modificaciones en algunas asparaginas [93].

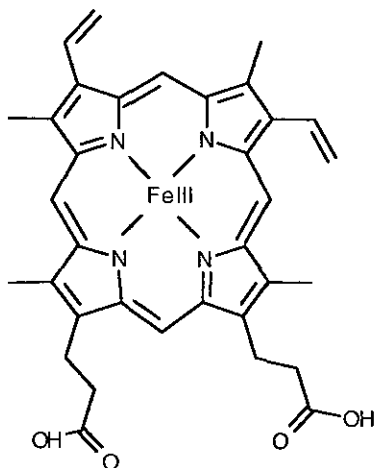


Figura 1.4.1 Hemo IX

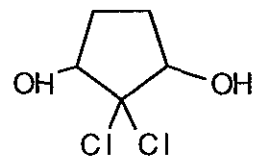


Figura 1.4.2 Caldariomicina

La cloroperoxidasa fue descubierta por el grupo de Lowell P. Hager en la década de los 60's mientras investigaba el metabolismo de un compuesto clorado llamado caldariomicina, producido por el hongo *C. fumago* (Figura 1.4.2). La investigación de Hager estaba motivada por el interés de estudiar la producción en la naturaleza de compuestos halogenados [94,95]. Al descubrir que una sola enzima era la responsable de la halogenación observada *in vivo*, Hager se dio a la tarea de purificarla y encontró a la cloroperoxidasa. Para su sorpresa Hager descubrió que además de tener capacidad de halogenar, *in vitro* esta enzima presentaba actividades similares a las de otras enzimas. La cloroperoxidasa tiene actividad de halogenasa, peroxidasa, catalasa y peroxigenasa (Tabla 1.4.2) [96]. Es la peroxidasa más versátil que se conoce y ha sido ampliamente estudiada y caracterizada.

Tabla 1.4.2 Actividades de la cloroperoxidasa de *C. fumago*

Actividad enzimática	Reacción catalizada	Sustratos
Halogenación (halogenasa)	$RH + H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow R-Cl + 2H_2O$	Dicetonas cíclicas, fenoles, ésteres fenólicos
Deshidrogenación (peroxidasa)	$2RH + H_2O_2 \rightarrow R-R + 2H_2O$	Metoxifenoles (guaiacol), anilinas, indol
Descomposición de peróxido (catalasa)	$2ROOH \rightarrow O_2 + 2ROH$	Péroxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos
Inserción de oxígeno (peroxigenasa)	$R + H_2O_2 \rightarrow R-OH + H_2O$	Tioanisoles, alquenos, bencilos

La evidencia experimental parecen indicar que la cloroperoxidasa sigue el ciclo de reacción que se muestra en la Figura 1.4.3. El ciclo catalítico de la enzima comienza con la reacción de una molécula de peróxido con el sitio activo (ruta 1). El peróxido se une al hemo y después de una transferencia de protones facilitada por los aminoácidos que rodean al sitio activo, la molécula se rompe para liberar agua y formar un intermediario enzimático conocido como Compuesto I. El rompimiento heterolítico del enlace oxígeno-oxígeno de la molécula de peróxido requiere dos electrones, por lo que debe ocurrir un rearrreglo electrónico intramolecular. En la cloroperoxidasa, así como en la mayoría de las peroxidases, un electrón proviene del hierro y el segundo electrón proviene de la porfirina. El resultado es la presencia de un radical libre deslocalizado en

la porfirina y la formación de un enlace dativo entre el átomo de hierro y un átomo de oxígeno [97].

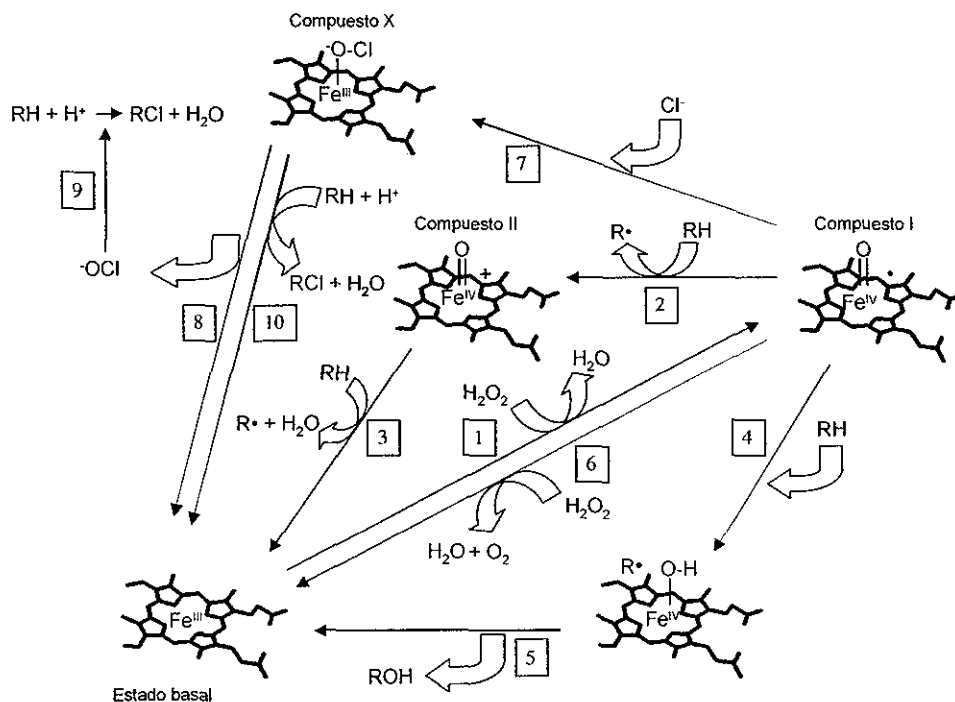


Figura 1.4.3 Ciclo catalítico de la cloroperoxidasa

El Compuesto I puede seguir tres caminos. En primer lugar puede sufrir una reducción de un electrón para formar el Compuesto II, mediante la oxidación de una molécula de un sustrato orgánico (ruta 2). Durante la formación de este intermediario, el electrón transferido desde el sustrato reduce al radical centrado en la porfirina. El Compuesto II es igual para todas las peroxidasa y sólo tiene un equivalente oxidativo que se encuentra localizado en el hierro. Este intermediario puede catalizar la oxidación de una segunda molécula de sustrato (ruta 3). De esta manera la enzima regresa a su estado basal y puede comenzar el ciclo de nuevo. Las rutas 1, 2 y 3 comprenden el ciclo clásico de las peroxidasa que utilizan peróxido para catalizar la deshidrogenación de dos moléculas de sustrato formando radicales libres, los cuales generalmente reaccionan entre sí formando un polímero. La actividad peroxidasa de la cloroperoxidasa corresponde aproximadamente al 10% de la actividad de una peroxidasa clásica cuando se mide con guaiacol, un sustrato típico de las peroxidasa [96].

Otra alternativa es que el Compuesto I reaccione con una molécula de sustrato unida en el sitio activo, cerca del fierro del grupo hemo. En este caso el átomo de oxígeno se transfiere directamente al sustrato (rutas 4 y 5). Esta reacción de transferencia de dos electrones en un paso es típica de las monooxigenasas como el citocromo P450, con la diferencia de que estas enzimas pueden utilizar O_2 como donador de oxígeno y las peroxidases no. Las peroxidases comunes no catalizan esta reacción.

En tercer lugar, el Compuesto I puede reaccionar con una segunda molécula de peróxido para formar oxígeno molecular y el alcohol correspondiente (ruta 6). Las rutas 1 y 6 corresponden a la actividad catalasa. Las peroxidases clásicas catalizan esta reacción con un 0.01% de la reactividad de una catalasa clásica. La cloroperoxidasa no es tan eficiente como una catalasa clásica, pero aún así en presencia de cloruro y peróxido de hidrógeno tiene aproximadamente 20% de la actividad detectada con una catalasa [96,98].

Por último, puede ocurrir que el Compuesto I reaccione en presencia de iones haluro para formar un intermediario halogenante (ruta 7). Existe controversia sobre la identidad de este agente en las reacciones catalizadas por la cloroperoxidasa, específicamente las de cloración y bromación. Los estudios sobre la naturaleza de los productos sugieren que la halogenación es química y favorecen las rutas 8 y 9. Esto se debe principalmente a que no se observa estereoselectividad en los productos y éstos son idénticos a los que se obtienen cuando la reacción se lleva a cabo químicamente adicionando HOCl [85, 99-101]. Por otro lado, los estudios sobre la velocidad de halogenación favorecen la ruta 10, ya que la velocidad enzimática de formación de un intermediario químico como HOCl es muy lenta en comparación con la velocidad de halogenación del sustrato [102,103]. Sin embargo, la enzima es muy compleja y es afectada por un gran número de variables, por lo que los datos cinéticos pueden ser interpretados de diferente manera [104,105]. Por otra parte, recientemente se detectó un intermediario enzimático durante la halogenación (Compuesto X) [106]; aunque esta evidencia fortalece un mecanismo de reacción como el de la ruta 10, todavía quedan dudas por resolver y no existe un consenso en la comunidad científica al respecto.

A pesar del enorme potencial de las peroxidases como biocatalizadores, su aplicación comercial es limitada. Por ejemplo, la lactoperoxidasa se usa como aditivo antimicrobiano en pastas de dientes (ZendiumTM) y la peroxidasa de soya se utiliza

como aditivo en la preparación de pan (Quest International) [84]. La aplicación comercial de las peroxidases que más se ha desarrollado es en el área de análisis clínicos [3].

Aunque las moléculas que son halogenadas por la cloroperoxidasa no son ópticamente activas, existe un número importante de reacciones catalizadas por esta enzima cuyos productos son interesantes desde el punto de vista sintético. En la Tabla 1.4.3 se muestran algunas de estas reacciones y ejemplos de las aplicaciones potenciales que tienen los productos [107,108,109].

Tabla 1.4.3 Reacciones enantioselectivas catalizadas por la cloroperoxidasa

Reacción	Producto	Aplicación potencial
Oxidación de sulfuros	Sulfóxidos quirales	Fármacos para el tratamiento de úlcera
Epoxidación de olefinas	Epóxidos quirales	Intermediarios en la síntesis de fármacos contra el VIH
Oxidación de indol	2-Oxoindol	Intermediario en la síntesis de fármacos antiinflamatorios

La cloroperoxidasa también tiene aplicaciones potenciales en el área ambiental. Por ejemplo, la enzima cataliza la formación de complejos de ADN y compuestos poliaromáticos y puede utilizarse como un modelo para determinar la genotoxicidad de estos compuestos [110]. Adicionalmente, se sabe que la cloroperoxidasa puede modificar las petroporfirinas presentes en la fracción de asfaltenos del petróleo pesado [111]. Este tratamiento podría ser eficiente para la remoción de metales de los asfaltenos.

La versatilidad catalítica de la cloroperoxidasa ha sido objeto de diversos estudios y ha sido explicada de diversas formas. En las peroxidases, el hierro está pentacoordinado con los cuatro nitrógenos pirrólicos y con un nitrógeno de una histidina. Esta histidina, llamada proximal, está muy conservada en todas las peroxidases. Del otro lado del hemo se encuentran otros tres residuos muy conservados: una histidina, llamada distal, una arginina y un ácido glutámico. Estos tres residuos forman una red de puentes de hidrógeno y en conjunto facilitan la unión y el rompimiento de la molécula de peróxido [112]. El ambiente del hemo en la cloroperoxidasa es polar, al igual que en las demás peroxidases. Sin embargo, una característica más que hace de la cloroperoxidasa una

enzima atípica entre las de su clase es que el ligando distal es un ácido glutámico y el ligando proximal es una cisteína [93].

La coordinación entre el hierro y la cisteína es una característica que la cloroperoxidasa comparte con el citocromo P450 y que le confiere a estas dos proteínas propiedades espectroscópicas muy similares [113]. Anteriormente se pensaba que el papel de la cisteína como ligando del hemo era muy importante para la catálisis de la cloroperoxidasa. Se sugirió que la cisteína actuaba como un fuerte donador de electrones, promoviendo el rompimiento de la molécula de peróxido y permitiendo la formación del Compuesto I de una manera muy eficiente [113]. También se propuso que la presencia de la cisteína podría explicar la asombrosa capacidad oxidativa de la enzima, dado que otras peroxidases pueden oxidar yoduro y bromuro pero la cloroperoxidasa es la única que puede oxidar al cloruro. La mejor manera de explorar estas posibilidades es mediante mutagénesis sitio dirigida. Durante muchos años se intentó tener un sistema de expresión para la cloroperoxidasa recombinante y sólo recientemente se tuvo éxito [114,115]. Obviamente, lo primero que se intentó fue cambiar la cisteína por histidina [114]. Esta mutación no alteró drásticamente las propiedades catalíticas de la enzima y demostró que el papel de la cisteína no es tan crítico como se pensaba. Es posible que el inusual ligando distal establezca al Compuesto I y sea el responsable del gran poder oxidativo de la cloroperoxidasa [116]. Esta hipótesis aún no se ha comprobado.

Las características atípicas del sitio activo de la cloroperoxidasa no terminan aquí. Por un lado, la mayoría de las peroxidases abstrae un electrón del sustrato, sin transferirle oxígeno. Por otro lado, a pesar de que también forman un intermediario tipo Compuesto I, las monooxigenasas como el citocromo P450 transfieren directamente un átomo de oxígeno a su sustrato. Se ha propuesto que en las peroxidases solamente el borde del hemo es accesible al solvente, mientras que el acceso al hierro del hemo está restringido [117]. Esta propuesta se analizó utilizando un sustrato suicida, la fenilhidrazina, que en todas las peroxidases forma un aducto con el grupo fenilo unido a uno de los carbonos del hemo. Sin embargo, en otras hemo proteínas como la mioglobina, la hemoglobina y el citocromo P450 en las que se sabe que el hierro se encuentra en un sitio activo abierto, se demostró la formación de un complejo con el fenilo unido al hierro.

Una alineación de las secuencias de aminoácidos de las peroxidases de plantas y hongos sugiere que en todas ellas existe un residuo aromático adyacente a la histidina

distal [83]. En el caso de la peroxidasa de rábano blanco, este residuo es una fenilalanina. Se realizaron mutaciones puntuales para reemplazar a la fenilalanina por un residuo menos voluminoso como la alanina. Las mutantes mostraron una mayor velocidad de formación del Compuesto I y una velocidad de transferencia de oxígeno a un sustrato azufrado 10 veces mayor que la enzima nativa [118].

En el caso de la cloroperoxidasa, se sabe que el borde del hemo y el fierro son accesibles desde el solvente. Tanto el complejo fenilo-fierro como el aducto fenilo-hemo han sido detectados [119], lo que sustenta que la topología del sitio activo de la cloroperoxidasa es una especie de híbrido, compartiendo características de las peroxidases comunes y de las monooxigenasas como el citocromo P450. La cloroperoxidasa también tiene un residuo aromático, una fenilalanina, en el túnel de acceso al fierro del hemo. Este residuo está cerca del ácido glutámico catalítico y es flexible. Su función parece ser acomodar pequeños sustratos hidrofóbicos en la vecindad del hemo [116]. Será interesante analizar los resultados de una mutación puntual en este aminoácido para cambiarlo por un grupo más pequeño.

En resumen, las peroxidases suprimen la transferencia de oxígeno al sustrato bloqueando el acceso al fierro con una barrera de aminoácidos y de esta manera favorecen la transferencia de electrones a través de la porfirina. Por otro lado, en enzimas como el citocromo P450 la estructura del sitio activo permite la entrada del sustrato para reaccionar directamente con el fierro. La cloroperoxidasa cuenta con el acceso al borde del hemo y también con el acceso al fierro del hemo, lo que explica su capacidad de catalizar reacciones tanto de peroxidación como de peroxigenación. La Tabla 1.4.4. resume las propiedades del sitio activo de algunas hemo proteínas.

Tabla 1.4.4 Propiedades del sitio activo de algunas hemo proteínas

Proteína	Ambiente del hemo	Ligando axial	Acceso al borde del hemo	Acceso al Fe del hemo
Cloroperoxidasa	Polar	Cisteína	Sí	Sí
Peroxidasa de rábano	Polar	Histidina	Sí	Limitado
Citocromo P450	No polar	Cisteína	No	Sí
Citocromo c peroxidasa	Polar	Histidina	Sí	Sí
Mioglobina	No polar	Histidina	Sí	Sí
Catalasa	Polar	Tirosina	No	No

Como todas las peroxidasas, la cloroperoxidasa es inactivada por el peróxido durante el proceso catalítico. En ausencia de un sustrato reductor o en presencia de un exceso de peróxido, la proteína actúa como reductor. De esta manera, los equivalentes oxidativos son transferidos a la cadena peptídica o a la porfirina ocasionando modificaciones que provocan la inactivación de las enzimas. En la Tabla 1.4.5 se muestra el tiempo de vida media de la cloroperoxidasa en presencia de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y a diferentes valores de pH. Esta inactivación de las peroxidasas se traduce en una estabilidad operacional baja y limita su aplicación industrial.

Tabla 1.4.5 Estabilidad de la cloroperoxidasa en presencia de H₂O₂ [120]

pH	H ₂ O ₂ (μ M)	t _{1/2} (h)
5	30	1.1
5	200	1.0
5	1000	0.5
4	1000	0.5
6.2	1000	0.1

Se ha propuesto un mecanismo de inactivación general para las hemo peroxidasas (Figura 1.4.4) [121] (ver Apéndice 7.5). En presencia de un exceso de peróxido y en ausencia de un sustrato reductor, puede formarse un intermediario enzimático con un radical superóxido llamado Compuesto III (ruta 1). Este intermediario es sumamente reactivo y puede inactivar a la proteína de varias maneras. Una posibilidad es que el radical oxide a la porfirina, con la consecuente destrucción del grupo hemo y la liberación del fierro de la porfirina (ruta 2). Otra posibilidad es que los residuos que conforman el sitio activo se oxiden al actuar como reductores donando electrones (ruta 3). Los radicales libres que se formen pueden desplazarse a través de la cadena peptídica hasta llegar al residuo con menor potencial de reducción. Por último, el Compuesto III puede liberar al radical superóxido, que no es estable en solución y se descompone para formar radicales hidroxilo (ruta 4). Estos radicales son especies oxidantes muy poderosas y pueden atacar varios sitios de la proteína, incluyendo el sitio activo. En la literatura existe evidencia que soporta la existencia de estas tres rutas para la inactivación suicida de las hemo peroxidasas. Debido a la rapidez con que ocurre la oxidación de la proteína, es difícil discernir cuál es la secuencia de estas reacciones.

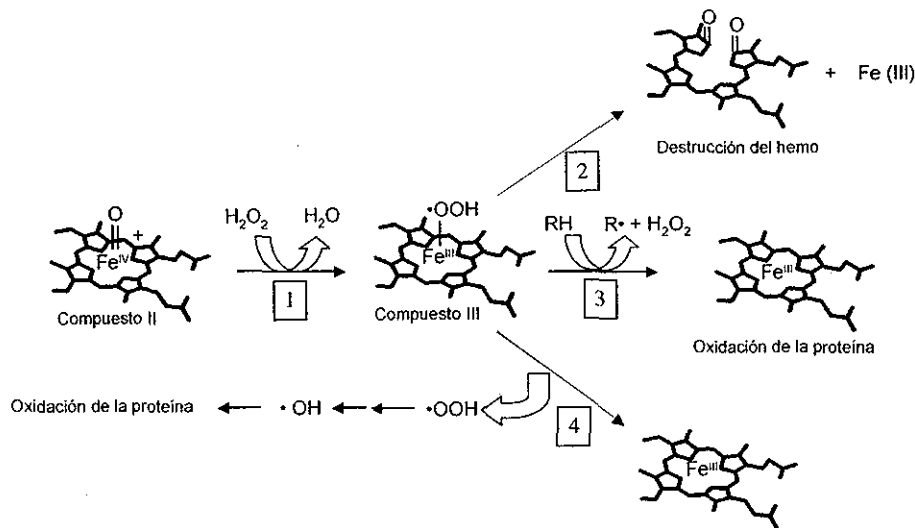


Figura 1.4.4 Mecanismo propuesto de inactivación suicida de las peroxididasas

Debido a que no existe un sistema eficiente de expresión para la cloroperoxidasa recombinante, no ha sido posible utilizar la ingeniería genética de proteínas para reducir la velocidad de la inactivación por peróxido. Sin embargo, existen otras alternativas para incrementar el tiempo de vida media de la enzima en presencia de peróxido. Una de las estrategias consiste en mantener la concentración de peróxido en niveles bajos, de tal manera que todos los equivalentes oxidativos se transfieran al sustrato y no a la proteína. Para mantener estas condiciones, se han ensayado diferentes maneras de adicionar el peróxido: continuamente, en adiciones sucesivas y alimentando según el progreso de la reacción, utilizando un sensor para peróxido [122]. También se ha intentado generar *in situ* el peróxido mediante la generación electrolítica del mismo [123] o la co-inmovilización de una glucosa oxidasa. En presencia de glucosa y O₂, la glucosa oxidasa produce peróxido de hidrógeno que puede ser utilizado por la cloroperoxidasa para oxidar al sustrato [124]. Como resultado de estos esfuerzos se ha incrementado el número de recambio (número de moléculas de producto generadas por una molécula de enzima) hasta 860,000 [122].

Además de la estabilidad al peróxido, es importante mejorar otras propiedades de la cloroperoxidasa tales como la estabilidad en presencia de solventes orgánicos y la termoestabilidad. Estas propiedades se vuelven indispensables al pensar en cualquier proceso biocatalítico. Como se mencionó anteriormente, una opción es la ingeniería de

proteínas [125]. Debido a que esta opción ha surgido recientemente, todavía no existen resultados en este sentido. Una manera de estabilizar a las enzimas es mediante su inmovilización en un soporte inerte. En la literatura se encuentra poca información sobre la inmovilización de cloroperoxidasa. La mayoría de las estrategias de inmovilización se basa en la adsorción de la enzima a soportes como perlas de vidrio, talco y celita [126-128]. Solamente existe un reporte en el que la enzima es covalentemente unida a un polímero, presumiblemente mediante los grupos hidroxilo de los carbohidratos expuestos en la superficie de la proteína [129]. Algunas de estas preparaciones muestran ventajas sobre la cloroperoxidasa soluble tales como su aplicación en solventes orgánicos y el reuso en varios ciclos de reacción [124,126,130]. Sin embargo ninguna incrementa su termoestabilidad. La cloroperoxidasa en solución es inactivada rápidamente cuando se incuba a temperaturas mayores de 50°C [92].

La cloroperoxidasa de *C. fumago* es un catalizador muy versátil con aplicación en varios campos. El mayor reto consiste en obtener un biocatalizador que retenga su actividad enzimática bajo las condiciones que usualmente se encuentran en un proceso como altas temperaturas, agitación mecánica y presencia de solventes orgánicos.

1.5 Biodesulfurización

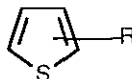
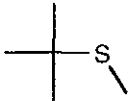
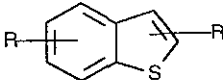
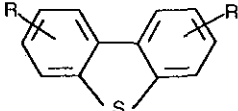
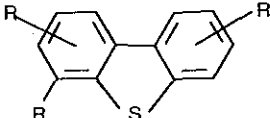
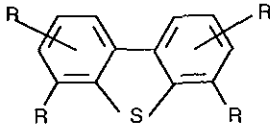
La biotecnología tiene un nicho de aplicación potencial en la industria petrolera. Se han identificado varios organismos capaces de oxidar o reducir azufre, remover nitrógeno, eliminar metales y efectuar biocraqueo del petróleo. Con estos tratamientos la calidad del petróleo puede mejorar al modificarse algunas de sus propiedades tales como el contenido de azufre y la viscosidad. Estos cambios permiten reducir costos e incrementar el valor del petróleo [131].

Hoy en día, cerca de 80 millones de barriles de petróleo se extraen diariamente. Los estimados de las reservas de combustibles fósiles indican que podemos seguir a este ritmo por 70 años [132]. La mayor parte de estos combustibles están contaminados con azufre, y al ser quemados liberan grandes cantidades de óxidos de azufre a la atmósfera. Estos óxidos son los responsables de la lluvia ácida. Adicionalmente, estos óxidos envenenan a los convertidores de los automóviles, los cuales hacen más eficiente la combustión de la gasolina. Cuando los convertidores son envenenados, los hidrocarburos sin quemar llegan a la atmósfera, contribuyendo a la contaminación del aire. Por estos motivos la legislación es cada vez más severa en cuanto al contenido de azufre en los combustibles. La concentración de azufre en el petróleo crudo varía entre 1,000 y 30,000 ppm. Actualmente el contenido de azufre en las gasolinas es de 500 ppm en Estados Unidos y Japón. Para el 2005 se legislará el uso de combustible con 50 ppm de azufre en Japón y Europa. Para el 2006, Estados Unidos restringirá el contenido de azufre en combustibles a 15 ppm [133].

La hidrodesulfurización (HDS) es el proceso químico que se utiliza en las refinerías para remover el azufre de los combustibles derivados del petróleo. Actualmente existen más de 35 unidades de HDS en el mundo con una capacidad total de 1.5 millones de barriles al día [134]. En este proceso se utiliza un catalizador inorgánico para convertir el azufre orgánico en ácido sulfhídrico. Para lograrlo se hace reaccionar al petróleo crudo con hidrógeno a altas presiones (10-200 atm) y temperaturas entre 290 y 455°C. El azufre orgánico en las fracciones ligeras de petróleo (p.e. la gasolina) se encuentra en forma de tioles, sulfuros y tiofenos. Estos compuestos son eficientemente removidos por la HDS. Sin embargo, en las fracciones más pesadas (p.e. el diesel) el azufre forma parte de heterociclos poliaromáticos como benzotiofenos, dibenzotiofenos y dibenzotiofenos sustituidos cerca del azufre (Tabla 1.5.1). Estos compuestos son difíciles de remover mediante la HDS. La biodesulfurización (BDS) se presenta

actualmente como una alternativa complementaria a la HDS, capaz de modificar los compuestos recalcitrantes para el proceso químico.

Tabla 1.5.1 Compuestos organoazufrados presentes en combustibles fósiles [131]

Tipo de combustible	Compuesto azufrado	Estructura química	Temperatura de destilación
Gasolina Jet Diesel	Sulfuros	R-S-R, R-S-S-R	84°C
	Tiofenos		99°C
	Metil- tert butil sulfuros		135°C
	Metil etil sulfuros	C-S-S-C-C	219°C
	Benzotiofenos		293°C
	Dibenzotiofenos		
	Dibenzotiofenos β-sustituidos		
	Dibenzotiofenos β-disustituidos		

Existen varias opciones para la BDS. Estas pueden resumirse en cuatro tipos de procesos:

1.- La remoción por reducción del azufre.

Una alternativa para la BDS es el uso de bacterias reductoras de sulfato. Estas bacterias obtienen energía al reducir el sulfato a H_2S . Una ventaja de esta opción es la fácil remoción y recuperación del H_2S en las refinerías actuales. Adicionalmente la

ausencia de oxígeno previene la oxidación de hidrocarburos a polímeros o compuestos coloridos. Aunque se ha reportado que algunas bacterias son capaces de desulfurizar combustibles fósiles, bajo condiciones anaerobias bien controladas no se ha observado una disminución en el contenido de compuestos azufrados [131].

2.- La degradación microbiana inespecífica.

Algunos microorganismos son capaces de secuestrar el azufre presente en compuestos orgánicos [131]. El metabolismo de estos microorganismos incluye la oxidación de compuestos azufrados como el dibenzotiofeno. La posición de las oxidaciones es en el anillo aromático y no en el átomo de azufre. Aunque estos microorganismos reducen el contenido de azufre en el medio, el hidrocarburo es utilizado como fuente de carbono y es mineralizado. Este proceso es indeseable ya que reduce el poder energético del combustible.

3.- La remoción microbiana específica para azufre.

El microorganismo más estudiado capaz de desulfurizar selectivamente al benzotiofeno o al dibenzotiofeno es *Rhodococcus erythropolis*, patentado por el Institute of Gas Technology y comercializado por Energy Biosystems Corporation en 1991. Esta bacteria desulfuriza el dibenzotiofeno en cuatro reacciones secuenciales catalizadas por tres enzimas diferentes: dos monooxigenasas dependientes de flavin mononucleótido y una sulfinaasa. La primera monooxigenasa (DszC) cataliza consecutivamente la oxidación de dibenzotiofeno al sulfóxido y después a la sulfona. Otra monooxigenasa (DszA) cataliza la conversión de la sulfona a 2'-hidroxibifenil 2-sulfonato. La desulfinaasa (DszB) cataliza el paso final para producir 2-hidroxibifenilo y sulfito [135]. Esta última reacción es el paso limitante del proceso.

Este proceso tiene la ventaja de que el hidrocarburo es una fuente de azufre pero no de carbono, así que no se mineraliza. El 2-hidroxibifenilo es muy soluble en el petróleo, por lo que particiona hacia el combustible. De esta manera el combustible no pierde poder energético. El azufre inorgánico que se produce es asimilado por otras rutas metabólicas. Para que los compuestos azufrados interactúen con las células se requiere la dispersión del combustible en una fase acuosa. Un factor limitante en este proceso es la transferencia de los compuestos azufrados desde la fase orgánica a la fase acuosa y a la bacteria [136].

La velocidad de desulfurización ha sido mejorada a través de una serie de estrategias, incluyendo optimización del medio de cultivo y manipulación genética, como duplicación de genes, alteración de promotores y eliminación de la enzima DszB que

cataliza el paso limitante. Entre 1990 y 1998 la actividad de este biocatalizador recombinante ha aumentado 200 veces [131].

Un estudio reciente comparó la energía consumida y el CO₂ generado para un proceso de HDS y un proceso de BDS utilizando *R. erythropoli* [137]. Se consideraron dos casos:

- a) desulfurización de diesel de 0.2% a 0.005% de azufre, que representa una refinería sin hidrot ratamiento
- b) desulfurización de diesel de 0.05% a 0.005% que representa el uso de la BDS después de una HDS.

Los resultados de esta comparación y el ahorro esperado se muestran en la Tabla 1.5.2. El proceso de HDS está dominado por el consumo de energía y producción de CO₂ asociado a la planta de hidrógeno y al combustible necesario para calentar el diesel a la temperatura que requiere el proceso. Estos datos justifican el uso de un proceso biológico para sustituir o complementar a la HDS.

Tabla 1.5.2 Generación de CO₂ y consumo de energía [137]

Tecnología	Desulfurización de 0.2% a 0.005%		Desulfurización de 0.05% a 0.005%	
	Energía x10 ⁶ kcal/m ³	CO ₂ kg/m ³	Energía x10 ⁶ kcal/m ³	CO ₂ kg/m ³
HDS	412.1	85.3	218.7	45.1
BDS	88.7	17.4	58.6	12.2
BDS/HDS	21.5%	20.4%	26.9%	26.9%

4.- La remoción por oxidación del azufre

Otra opción para la BDS es la oxidación de los compuestos azufrados para formar sulfóxidos o sulfonas. Una vez oxidados, estos compuestos pueden ser removidos por adsorción o extracción con solventes [134]. Las monooxigenasas de *R. erythropoli* responsables de la oxidación del dibenzotiofeno han sido purificadas y caracterizadas recientemente [138]. La monooxigenasa DszC, que cataliza la oxidación secuencial del dibenzotiofeno hasta la sulfona, también es capaz de catalizar la oxidación de dibenzotiofenos sustituidos. Estos compuestos son los más difíciles de remover por el proceso químico de HDS.

La oxidación enzimática de los compuestos azufrados se presenta como una alternativa con ciertas ventajas sobre la remoción microbiana. Una de ellas es que se elimina la necesidad de trabajar con células completas. Esto cancela la necesidad de una fuente de carbono y otros nutrientes para mantener a la maquinaria celular. Además, la concentración de los sustratos y productos pueden alcanzar niveles que resultarían tóxicos para las células. Adicionalmente, los problemas de transferencia de masa pueden ser aliviados escogiendo los soportes adecuados para la inmovilización de la enzima. Por último, la enzima puede ser mejorada mediante ingeniería de proteínas para aumentar el número de sustratos, la termoestabilidad y la estabilidad en solventes orgánicos. *Rhodococcus* está entre las bacterias con menos tolerancia a solventes orgánicos.

A diferencia de la monooxigenasa DszC de *Rhodococcus*, la cloroperoxidasa de *C. fumago* no requiere cofactores costosos que necesitan regenerarse. La cloroperoxidasa cataliza la oxidación de varios compuestos azufrados, incluyendo sulfuros alquilados y sulfuros aromáticos [139-141]. Aunque estos estudios se realizaron en el contexto de transformaciones selectivas con aplicación en la síntesis orgánica, es importante notar que la enzima es el catalizador más eficiente de esta reacción cuando se compara con otras peroxidases. El número de recambio (mol producto/mol enzima) es entre dos y cuatro órdenes de magnitud mayor que para otras enzimas (Tabla 1.5.3).

Tabla 1.5.3 Oxidación de metil fenil sulfuro catalizada por peroxidases [107]

Enzima	Tiempo de reacción (min)	Rendimiento (%)	ee (%)	Número de recambio
Cloroperoxidasa	60	100	98 [R]	63,000
Peroxidasa de rábano blanco	60	95	46 [S]	29
Lactoperoxidasa	105	40	52 [R]	57
Citocromo c peroxidasa	No reportado	No reportado	2 [S]	< 300
Microperoxidasa	45	45	3 [S]	3

ee = exceso enantiomérico

Por lo anterior, resulta interesante la idea de ensayar el potencial de esta enzima dentro la industria petrolera. La cloroperoxidasa se presenta como el mejor candidato dentro del grupo de las hemo peroxidases para participar en procesos de biodesulfurización.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La cloroperoxidasa es una enzima que cataliza la oxidación de compuestos azufrados, por lo que tiene potencial aplicación en procesos de biodesulfurización. Este tipo de industria requiere un catalizador que sea estable y activo en presencia de solventes orgánicos y altas temperaturas.

Este trabajo se basa en la hipótesis de que los cristales entrecruzados de cloroperoxidasa mostrarán propiedades catalíticas mejoradas respecto a las de la enzima libre. Para demostrar esta hipótesis, se planteó el objetivo general de obtener y caracterizar cristales catalíticos de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*.

Adicionalmente se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1) Identificar las transformaciones químicas que la cloroperoxidasa cataliza sobre compuestos modelo presentes en los combustibles derivados del petróleo.
- 2) Obtener microcristales catalíticamente activos de cloroperoxidasa.
- 3) Determinar el efecto del estado físico de la enzima sobre su comportamiento catalítico.
- 4) Establecer el efecto de las propiedades físicas y químicas de diversos agentes entrecruzantes sobre la actividad y estabilidad de los cristales.
- 5) Determinar la localización del entrecruzamiento y el impacto de esta variable en la actividad enzimática y en la estabilidad del cristal.

3. PROTOCOLLO EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos

SIGMA-ALDRICH

1,6-Hexandiamina, etilendiamina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, monoclorodimedona, guaiacol, o-ftaldialdehído, ácido cacodílico, glutaraldehído 50%, peróxido de hidrógeno, cloruro de adipoil, diisocianato de hexametileno, compuestos organoazufrados, compuestos poliaromáticos.

FLUKA

Acetato de zinc.

J.T. BAKER

Fosfato monobásico de sodio, fosfato dibásico de sodio, cloruro de potasio, acetato de sodio, hidróxido de sodio, sulfato de zinc, sulfato de cobre, solventes orgánicos.

HAMPTON RESEARCH

Polietilenglicol 8000, Crystal Screen 1 & 2.

3.2 Equipo

Los ensayos espectrofotométricos se realizaron en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-650 con control de temperatura.

La cromatografía de líquidos (HPLC) se llevó a cabo en un sistema Perkin Elmer serie 200. Para las reacciones con compuestos organoazufrados y poliaromáticos se usó una columna de fase reversa hypersyl 5 μm de Hewlett-Packard. Para el análisis de aminoácidos se utilizó un columna C₁₈ ultrasphere 5 μm de Beckman.

Las reacciones enzimáticas se analizaron en un cromatógrafo de gases equipado con una columna SPB-20 (30 m x 0.25 mm, Supelco). El cromatógrafo contaba con un detector de ionización de flama (FID, general) y un detector fotométrico de flama (FPD, específico para azufre).

La identificación de compuestos se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (Hewlett-Packard modelo 6890-5972).

Para la cuantificación de aminos por fluorescencia se utilizó un espectrómetro luminiscente de Perkin Elmer modelo LS50.

3.3 Métodos

A. Obtención y purificación de la cloroperoxidasa

La cloroperoxidasa utilizada en este trabajo fue generosamente donada por el profesor Michael Pickard de la Universidad de Alberta en Canadá. La cloroperoxidasa fue producida por la cepa CMI 89362 del hongo *Caldariomyces fumago* y purificada por el Dr. Michael Pickard hasta un R_z de entre 1 y 1.3 [142]. El valor $A_{403\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ se conoce como el coeficiente de Reinheitszahl (R_z) y se utiliza como un índice de pureza. La cloroperoxidasa pura tiene un $R_z= 1.44$ [143]. Para la cristalización de la enzima se incrementó el R_z hasta 1.42 utilizando cromatografía de intercambio iónico, a través de una resina catiónica de DEAE con un gradiente de 10-200 mM fosfatos pH 6. Las fracciones con un R_z mayor a 1.36 se lavaron y concentraron en una celda de ultrafiltración (Amicon, Inc.) utilizando una membrana con un tamaño de poro de 30,000 Da.

B. Cristalización de la cloroperoxidasa

Para encontrar las condiciones iniciales de cristalización de la enzima se realizó un barrido de soluciones con un "kit" comercial llamado Crystal Screen 1 & 2 de Hampton Research que combina en 98 soluciones diferentes el uso de varios agentes precipitantes. En esta prueba se utilizó 1 μL de cloroperoxidasa con una concentración de 13 mg/mL en 10 mM fosfatos pH 4.5 y 1 μL de cada solución. La cristalización se llevó a cabo mediante el método de difusión de vapor utilizando gotas apoyadas. Las condiciones iniciales se escalaron hasta gotas de 60 μL (50% de proteína y 50% precipitante) con 1 mL de solución en el pozo. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada y fueron filtradas utilizando una membrana de 0.45 μm .

Para sembrar las gotas, se dejó equilibrar la gota por 15 días y se sembró con 1 μL de una solución con cristales en forma de agujas lavados y molidos en la solución inicial de cristalización. Para determinar el porcentaje de cristalización, los cristales se recuperaron de las gotas y se separaron centrifugando a bajas velocidades. La absorbancia a 398 nm del sobrenadante se utilizó para calcular la cantidad de proteína en solución utilizando un coeficiente de extinción molar de 85,000 $\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [144]. La diferencia entre la cantidad de cloroperoxidasa inicial y la cantidad de cloroperoxidasa en el sobrenadante se tomó como la cantidad de enzima en cristales.

C. Modificación química de cristales

La modificación química de los cristales se realizó en una solución de 25% polietilenglicol 8000, 0.075 M sulfato de zinc y 0.1 M cacodilato de sodio pH 5.5. Los cristales fueron lavados en esta solución para eliminar el acetato presente en la solución de cristalización, ya que los grupos carboxilos interfieren con la reacción de modificación. La carbodiimida y la hexandiamina se prepararon en la solución sin acetato por separado, ajustando el valor de pH de la solución de hexandiamina con ácido sulfúrico diluido. Se agregó a los cristales el volumen correspondiente de las soluciones de carbodiimida y hexandiamina y se dejó agitar suavemente por 2 horas a temperatura ambiente. Los cristales fueron recuperados por centrifugación y lavados con una solución de 25% polietilenglicol 8000, 0.1 M acetato de zinc y 0.1 M cacodilato de sodio pH 5.5.

D. Entrecruzamiento de cristales

El entrecruzamiento con glutaraldehído se realizó en una solución de 25% polietilenglicol 8000, 0.1 M acetato de zinc y 0.1 M cacodilato de sodio pH 6.5. Los cristales fueron lavados en esta solución y se añadió el volumen correspondiente de glutaraldehído. La condición de los cristales fue monitoreada tomando una muestra de la reacción y observando en un microscopio la polarización de los cristales, su estabilidad a la disolución y su actividad. Para probar la estabilidad a la disolución se tomó un cristal y se transfirió a una solución 60 mM fosfatos pH 6. Para probar la actividad, se añadió un exceso de peróxido de hidrógeno y se observó la producción de oxígeno. Al finalizar la reacción, los cristales fueron lavados con una solución de 25% polietilenglicol 8000, 0.1 M acetato de zinc y 0.1 M cacodilato de sodio pH 5.5.

E. Reacciones enzimáticas en medio acuoso

La velocidad inicial de las diferentes reacciones catalizadas por la cloroperoxidasa en medio acuoso se midió siguiendo espectrofotométricamente la aparición del producto de la reacción o la desaparición del sustrato. La longitud de onda (λ) y los coeficientes de extinción molar (ϵ) utilizados se muestran en la Tabla 3.3.1.

Para la actividad de halogenasa se utilizó 1 mL de reacción conteniendo 60 mM acetatos pH 3, 0.1 mM monoclorodimedona, 20 mM KCl y 0.25 mM H_2O_2 . Para la actividad de peroxidasa se utilizó 1 mL de reacción conteniendo 60 mM fosfatos pH 6, 5 mM guaiacol y 1 mM H_2O_2 .

Las constantes cinéticas para la actividad de catalasa se midieron en 1 mL de reacción conteniendo 60 mM fosfatos pH 4 y diferentes concentraciones de H₂O₂. Las constantes cinéticas para la actividad de peroxigenasa con tioanisol y tiantreno se midieron en 1 mL de reacción conteniendo 20% *tert*-butanol, 60 mM acetatos pH 3, 20 mM KCl y 1 mM H₂O₂.

La actividad de los cristales con tioanisol, tiantreno y monoclorodimedona se midió de manera discontinua. La reacción se detuvo añadiendo un exceso de Na₂SO₃ y la velocidad inicial se calculó utilizando la diferencia entre la absorbancia inicial y final. Los controles realizados mostraron que el agente reductor no revierte la reacción de sulfoxidación o halogenación y los productos eran estables bajo estas condiciones.

Tabla 3.3.1 Detección espectrofotométrica de la actividad de la cloroperoxidasa

Sustrato	Actividad	λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Observación	Referencia
Monocloro-dimedona	Halogenasa	278	12,200	Desaparición de sustrato	145
Guaiacol	Peroxidasa	407	26,600	Aparición de producto	119
H ₂ O ₂	Catalasa	240	43.6	Desaparición de sustrato	146
Tiantreno	Peroxigenasa	254	35,000	Desaparición de sustrato	Este trabajo
Tioanisol	Peroxigenasa	250	8,050	Desaparición de sustrato	Este trabajo

F. Reacciones enzimáticas con compuestos organoazufrados y poliaromáticos

Las reacciones se realizaron en 1 mL de una solución conteniendo 15 % acetonitrilo, 60 mM acetatos pH 3, 20 mM KCl y 20 μ M del sustrato. Los sustratos utilizados se mencionan en las Tablas 4.1.2 y 4.1.3. La reacción se inició añadiendo cloroperoxidasa y 1 mM H₂O₂. La reacción fue monitoreada por HPLC y eluida por una mezcla de acetonitrilo y agua (generalmente 70:30 v/v). La velocidad inicial de la reacción se estimó mediante la diferencia entre el área de la señal del sustrato al tiempo cero y el área de la señal del sustrato después de 10 minutos de reacción. Para identificar a los productos, se realizaron reacciones de 10 mL; después de 1 hr de reacción, se acidificó el medio y se extrajo con diclorometano pasando por Na₂SO₄ anhidro para eliminar

trazas de agua. La muestra se concentró eliminando el solvente con nitrógeno antes de ser analizada en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

G. Cuantificación de aminos primarios

La determinación de grupos aminos se realizó utilizando o-ftaldialdehído (OPA). El reactivo reacciona con los grupos aminos en medio alcalino y en presencia de un agente reductor para producir un compuesto que fluoresce con intensidad. A 90 mL de 50 mM boratos pH 10 se agregó 1.5 mL de una solución conteniendo 5 μ L 2-mercaptoetanol/mL etanol y 1.5 mL de una solución conteniendo 10mg OPA/mL etanol. Se tomó 1 mL de esta mezcla y se añadió a 100 μ L de la muestra en 60 mM fosfatos pH 6 conteniendo 1 g/L Brij 35 [147]. Después de 3 min, se leyó la intensidad de fluorescencia usando una longitud de onda de excitación de 335 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm.

H. Medición de estabilidad

La medición de la estabilidad a la temperatura de los cristales y de la cloroperoxidasa soluble se realizó incubando en 60 mM fosfatos pH 5 a diferentes temperaturas por 1 h. Después de enfriar la muestra, se midió la actividad residual utilizando como sustrato a la monoclorodimedona. Para medir la estabilidad en solventes orgánicos, se añadió el volumen correspondiente de 60 mM acetatos pH 6 a 100 μ L de *tert*-butanol y se tomó una muestra a diferentes intervalos de tiempo para medir la actividad residual de la enzima con monoclorodimedona.

I. Cuantificación de proteína

La determinación de proteína soluble se realizó con el método espectrofotométrico de Bradford utilizando el reactivo de BioRad. Brevemente, se preparó la muestra en 800 μ L de 60mM fosfatos pH 6 y se añadió 200 μ L del reactivo. Después de 15 min, se leyó la absorbancia a 595 nm. También se determinó la concentración de la cloroperoxidasa utilizando el coeficiente molar de extinción a 398 nm [144], como se describe en B.

La determinación de proteína en los cristales entrecruzados se realizó utilizando el método espectrofotométrico de Lowry modificado. Los cristales se solubilizaron calentando en 0.1 M NaOH a 80°C por 6 h [57]. Se dejó enfriar el hidrolizado y se añadió 100 μ L de NaOH 0.5 % y 400 μ L del reactivo C. El reactivo C se preparó con 50 partes de 2% Na₂CO₃ en 0.1 M NaOH, 0.5 partes de 1% CuSO₄ y 0.5 partes de 2%

tartrato de potasio. Después de 10 min se añadió 1 mL del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu [148]. La mezcla se conservó en la oscuridad por 30 min y se leyó la absorbancia a 750 nm. La curva estándar se construyó utilizando cloroperoxidasa soluble hidrolizada de la misma manera que los cristales.

J. Análisis de aminoácidos.

Las muestras de proteína fueron hidrolizadas con HCL a 110°C por 20 hr. Posteriormente fueron derivatizadas con fenil isotiocianato y analizadas por HPLC.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Biodesulfurización

Algunas enzimas como el citocromo P450 [112], la lignino peroxidasa [149], la lactoperoxidasa [150], la peroxidasa de rábano blanco [151] y la cloroperoxidasa [140] y algunas proteínas como la hemoglobina [152] y el citocromo c [153] catalizan la oxidación de compuestos organoazufrados para formar los respectivos sulfóxidos.

Estudios previos demostraron que la cloroperoxidasa de *C. fumago* oxida la fracción azufrada de un diesel primario con 1.6% de azufre [154] (ver Apéndice 7.1). La oxidación incrementa el tiempo de retención de los compuestos azufrados, ya que los productos son menos volátiles. En consecuencia los compuestos azufrados oxidados pueden removerse eficientemente del diesel mediante un proceso de destilación. Mientras que una destilación del diesel primario hasta una temperatura final de destilación de 325°C produce un destilado con 1.27% de azufre, el mismo procedimiento para el diesel primario previamente tratado con cloroperoxidasa produce un destilado con sólo 0.27% de azufre. De esta manera, el tratamiento enzimático del diesel reduciría el contenido del azufre en un 80% (Tabla 4.1.1) [154].

Tabla 4.1.1 % Azufre en diesel primario después de un tratamiento enzimático

	Destilación		Biooxidación + Destilación	
	Hidrocarburos Totales (%)	Azufre (%)	Hidrocarburos Totales (%)	Azufre (%)
Destilado	83	1.27	71	0.27
Residuo	17	3.21	29	5.51

Con el objetivo de investigar las transformaciones que se producen en el diesel después de un tratamiento enzimático con cloroperoxidasa, en este trabajo seleccionamos un grupo modelo de compuestos organoazufrados (Figura 4.1.1) y compuestos poliaromáticos (Figura 4.1.2) que representan a los compuestos presentes en una mezcla compleja como el diesel. La velocidad inicial de la transformación catalizada por la cloroperoxidasa fue medida de manera independiente en un medio conteniendo solvente orgánico, debido a la naturaleza hidrofóbica de los sustratos y a su baja solubilidad en agua. La longitud de onda de detección y los valores de velocidad inicial obtenidos para los compuestos organoazufrados y los compuestos poliaromáticos se muestran en las Tablas 4.1.2 y 4.1.3, respectivamente.

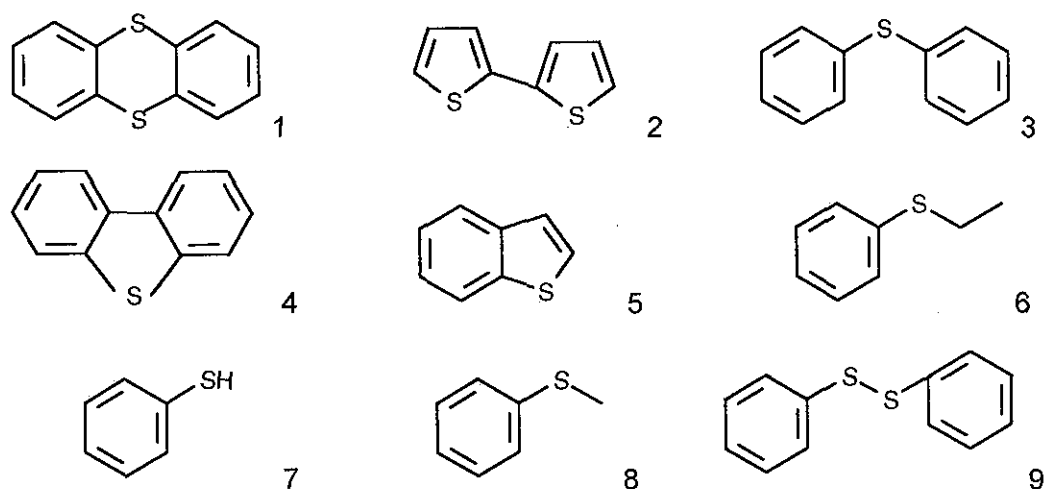


Figura 4.1.1 Estructura química de los compuestos organosulfurados (los números corresponden con la Tabla 4.1.2)

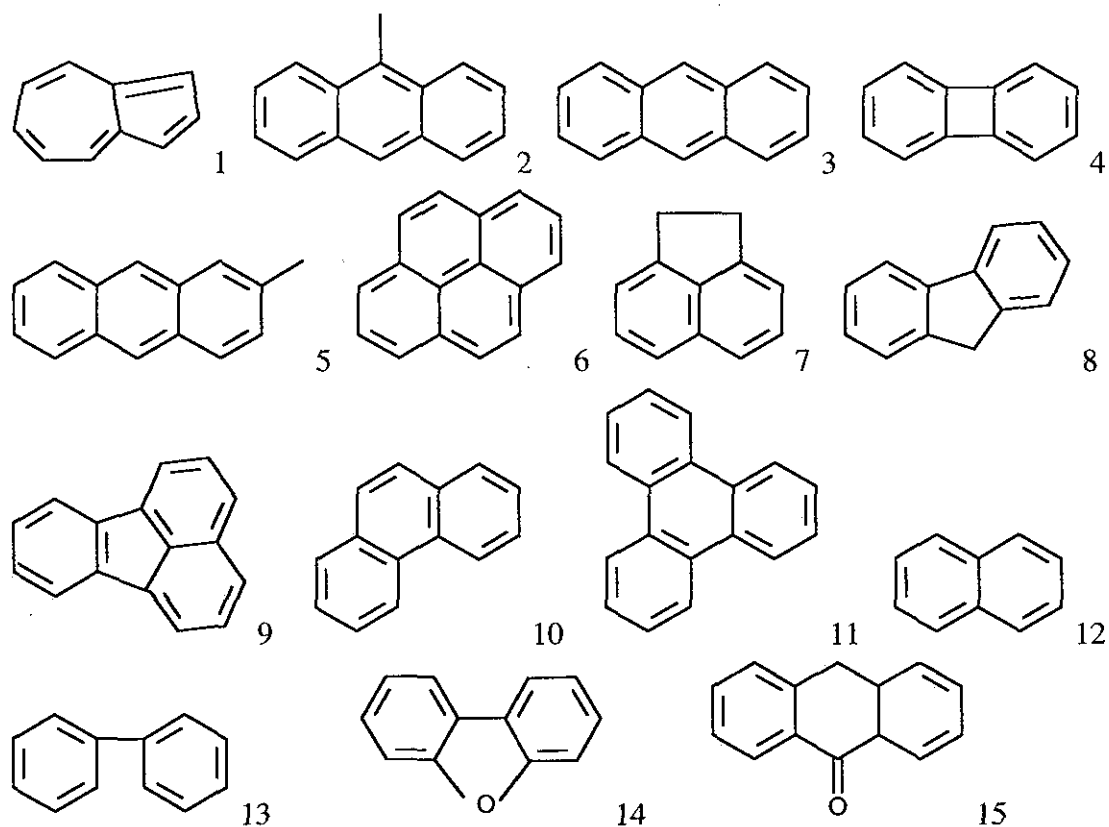


Figura 4.2.2 Estructura química de los compuestos poliaromáticos (los números corresponden con la Tabla 4.1.3)

Tabla 4.1.2 Actividad de la cloroperoxidasa con compuestos organoazufrados

Sustrato	λ (nm)	Potencial de ionización (eV) ^a	Velocidad inicial (min ⁻¹)
1. Tiantreno	254	7.80	1310 (\pm 132)
2. Bitiofeno	300	7.83*	840 (\pm 8)
3. Sulfuro de difenilo	248	7.88	831 (\pm 32)
4. Dibenzotiofeno	232	8.39	126 (\pm 9)
5. Benzotiofeno	226	8.73	557 (\pm 42)
6. Sulfuro de etil fenilo	254	8.80	1725 (\pm 145)
7. Bencenotiol	238	8.90	116 (\pm 5)
8. Tioanisol	256	8.95	2917 (\pm 58)
9. Disulfuro de difenilo	240	9.40	52 (\pm 10)

^a Potencial de ionización medido por impacto de electrones

* Potencial de ionización medido por transferencia de carga

Tabla 4.1.3 Actividad de la cloroperoxidasa con compuestos poliaromáticos

Sustrato	λ (nm)	Potencial de ionización (eV) ^a	Velocidad inicial (min ⁻¹)
1. Azuleno	270	7.43*	676 (\pm 34)
2. 9-Metilantraceno	254	7.46	758 (\pm 27)
3. Antraceno	250	7.51	134 (\pm 14)
4. Bifenileno	248	7.56*	10 (\pm 0.5)
5. 2-Metilantraceno	248	7.70	107 (\pm 8)
6. Pireno	236	7.72	53 (\pm 6)
7. Acenafteno	226	7.73*	65 (\pm 8)
8. Fluoreno	260	7.91	1.9 (\pm 0.13)
9. Fluoranteno	236	7.95*	3 (\pm 0.2)
10. Fenantreno	250	8.07	7 (\pm 0.1)
11. Trifenileno	256	8.10	0.8 (\pm .09)
12. Naftaleno	220	8.18	0.6 (\pm 0.01)
13. Bifenilo	250	8.64	No hay reacción
14. Dibenzofurano	280	8.77	No hay reacción
15. Antrona	260	9.43	No hay reacción

^a Potencial de ionización medido por impacto de electrones

* Potencial de ionización medido por espectroscopía fotoelectrónica

En las Tablas 4.1.4 y 4.1.5 se muestran algunos de los productos identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se observó que en presencia de 1 mM H₂O₂ y 20 mM KCl, la cloroperoxidasa cataliza la oxidación de los compuestos organoazufrados a sus respectivos sulfonas y sulfóxidos, excepto por el bitiofeno que se convirtió en derivados clorados. Todos los compuestos organoazufrados ensayados fueron sustratos para la cloroperoxidasa. Las sulfonas son el producto final de la reacción catalizada por la cloroperoxidasa, ya que adiciones sucesivas de peróxido y enzima no modificaron la naturaleza de los productos.

Tabla 4.1.4 Productos derivados de los compuestos organoazufrados

Sustrato	Producto	iones espectrales (<i>m/z</i>)
Benzotiofeno	Benzotiofeno sulfona	166 (42) [M ⁺], 138 (9), 137 (100), 118 (15), 109 (48), 90 (14), 89 (16), 76 (15), 75 (15), 74 (14), 65 (9), 63 (13)
Difenil sulfuro	Difenil sulfona	218 (27) [M ⁺], 125 (100), 97 (26), 77 (53), 51 (47), 50 (16)
Dibenzotiofeno	Dibenzotiofeno sulfona	216 (100) [M ⁺], 187 (46), 160 (31), 150 (16), 139 (30)
Tiantreno	5-óxido de tiantreno	232 (16) [M ⁺], 184 (100), 171 (15), 139 (14), 69 (14)
	5,10-dióxido de tiantreno	248 (77) [M ⁺], 200 (86), 184 (84), 171 (100), 168 (23), 139 (30), 108 (24), 69 (36)
Bitiofeno	Diclorobitiofeno	238 (15), 236 (72) [M ⁺], 234 (100), 201 (36), 164 (45), 157 (28), 155 (76), 142 (10), 119 (21), 93 (17), 82 (19), 79 (14), 69 (30)
	Triclorobitiofeno	272 (37), 271 (11), 270 (100) [M ⁺], 233 (58), 198 (81), 191 (53), 189 (82), 163 (15), 154 (33), 135 (18), 119 (37), 103 (19), 93 (39), 81 (46), 79 (58), 69 (36), 58 (12)
	Tetraclorobitiofeno	308 (13), 306 (49), 304 (96) [M ⁺], 302 (71), 267 (52), 232 (44), 223 (39), 197 (22), 188 (30), 162 (12), 153 (76), 117 (72), 98 (11), 93 (36), 81 (74), 79 (100), 69 (26)

Por otra parte, doce de los quince compuestos poliaromáticos seleccionados fueron sustratos para la cloroperoxidasa, transformándose en derivados clorados (Tabla 4.1.5). En ausencia de cloruro no se pudo detectar reacción, observando que ninguno de estos compuestos fue modificado bajo estas condiciones.

Tabla 4.1.5 Productos derivados de los compuestos poliaromáticos

Sustrato	Producto	iones espectrales (<i>m/z</i>)
Acenafteno	Dicloroacenafteno	224 (39), 222 (64) [M^+], 187 (100), 152 (95), 93 (17), 75 (24)
	Tricloroacenafteno	258 (57), 256 (81) [M^+], 221 (66), 186 (100), 150 (50), 110 (27), 98 (18), 75 (23)
Antraceno	9,10-dicloroantraceno	248 (68), 246 (100) [M^+], 176 (43), 87 (10)
Bifenileno	Diclorobifenileno	222 (64), 220 (100) [M^+], 185 (17), 150 (45), 75 (11)
	Triclorobifenileno	258 (30), 256 (93), 254 (100) [M^+], 219 (13), 184 (49), 149 (14), 74 (10)
Fluoreno	Diclorofluoreno	238 (25), 237 (7), 236 (40) [M^+], 201 (31), 199 (18), 166 (63), 165 (100), 164 (17), 163 (24), 100 (11), 82 (35)
Fenantreno	Clorofenantreno	214 (32), 213 (16) [M^+], 212 (100), 177 (20), 176 (55), 175 (11), 174 (10), 151 (14), 150 (14), 106 (17), 88 (33), 87 (11), 75 (13)
Pireno	Cloropireno	238 (31), 236 (100) [M^+], 200 (34), 100 (12)
	Dicloropireno	272 (62), 270 (100) [M^+], 235 (11), 200 (53), 135 (12), 100 (23)
Trifenileno	Clorotrifenileno	265 (7), 264 (34), 263 (21) [M^+], 262 (100), 227 (14), 226 (63), 225 (16), 224 (23), 200 (11), 132 (9), 131 (20), 113 (56), 112 (43), 100 (21), 99 (12), 87 (9)

El potencial de ionización es la energía necesaria para remover un electrón de una molécula. El potencial de ionización de una molécula en estado gaseoso puede medirse utilizando la técnica de impacto de electrones. Bajo estas condiciones se elimina el efecto de la interacción entre la molécula y el solvente sobre el valor del potencial de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ionización y el valor obtenido depende únicamente de las propiedades de la molécula. En las Tablas 4.1.2 y 4.1.3 se muestran los valores encontrados en la literatura del potencial de ionización de los sustratos usados en este trabajo medido por impacto de electrones, excepto para el azuleno, bifenileno, acenafteno, fluoranteno y bitiofeno. Para estos compuestos se muestra el potencial de ionización medido por otras técnicas [155].

La Figura 4.1.3 muestra la correlación entre la velocidad inicial de la reacción y el valor del potencial de ionización de los compuestos organoazufrados (panel superior) y de los compuestos poliaromáticos (panel inferior) [156] (ver Apéndice 7.2). La tendencia para los compuestos poliaromáticos indica que a mayor valor de potencial de ionización del sustrato, menor es la velocidad de la reacción enzimática.

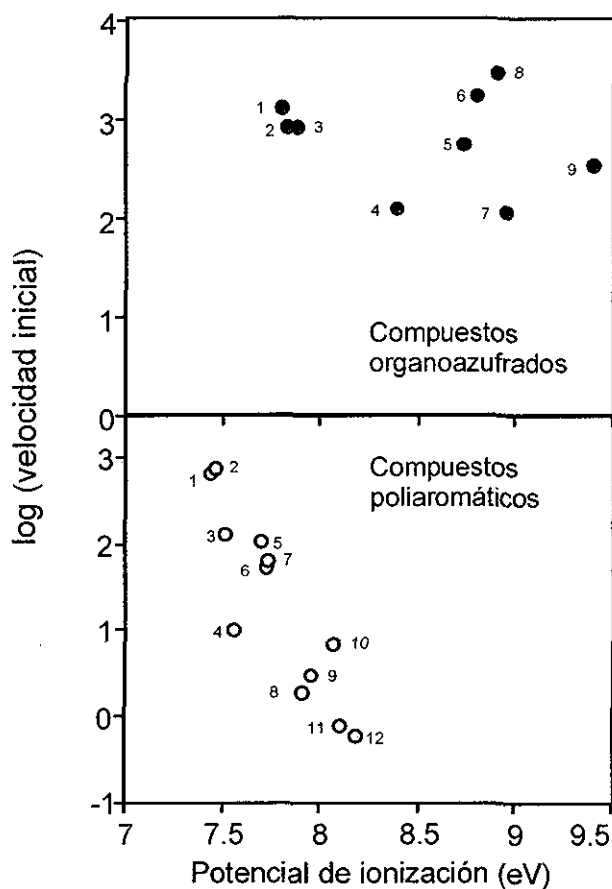


Figura 4.1.3 Influencia del potencial de ionización del sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción catalizada por la cloroperoxidasa. Los números en el panel superior y inferior corresponden con los números en las Tablas 4.1.2 y 4.1.3, respectivamente.

La correlación ha sido observada para otras peroxidasa y sugiere que durante la reacción se forman radicales libres. La lignino peroxidasa cataliza la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos con potencial de ionización menor que 7.55 eV, así como compuestos alquilaromáticos y heteroaromáticos policíclicos con potencial de ionización menor que 8 eV [149]. La manganeso peroxidasa también cataliza la oxidación de una serie de hidrocarburos poliaromáticos con potencial de ionización menor que 7.6 eV [157,158]. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo la cloroperoxidasa cataliza la transformación de compuestos poliaromáticos con un potencial de ionización menor que 8.18 eV. Este límite es ligeramente mayor que el encontrado para otras peroxidasa, lo que posiblemente refleja el mayor poder oxidativo de la cloroperoxidasa. Aunque otras peroxidasa catalizan la oxidación de estos compuestos para formar quinonas, la cloroperoxidasa cataliza la formación de derivados clorados (Figura 4.1.4).

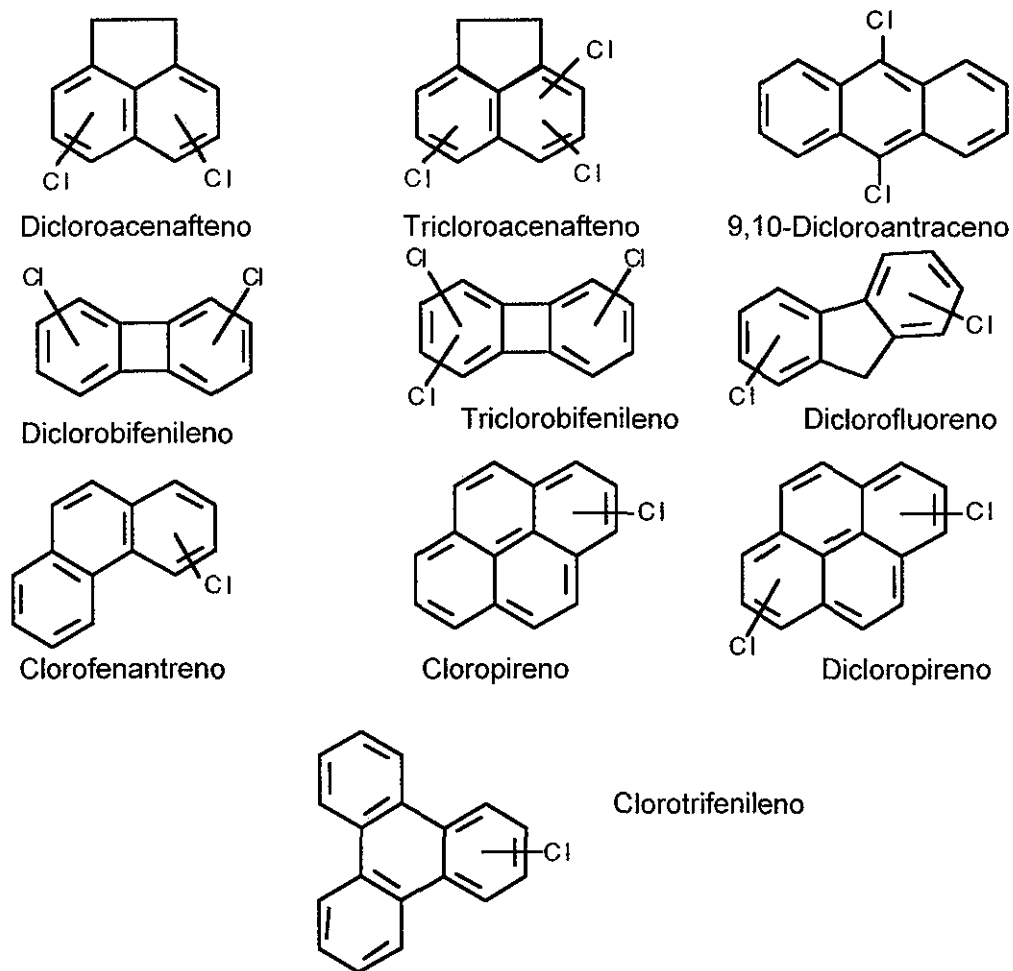


Figura 4.1.4 Productos halogenados de la transformación de los compuestos poliaromáticos catalizada por la cloroperoxidasa

A pesar de que la cloroperoxidasa es más activa en presencia de cloruro y su presencia acelera la oxidación de los sustratos, la formación de compuestos poliaromáticos halogenados es indeseable desde el punto de vista ambiental. Los compuestos poliaromáticos son nocivos para la salud por su actividad carcinogénica y mutagénica. Los derivados halogenados de estos compuestos son mutagénicos, incluso más que los compuestos parentales [159] (ver Apéndice 7.3).

Con respecto a la transformación de los compuestos organoazufrados, se observó que no existe una correlación entre la actividad enzimática de la cloroperoxidasa y su potencial de ionización (Figura 4.1.3, panel superior). Estos resultados permiten suponer que el mecanismo de reacción no involucra la formación de radicales libres. Se sabe que el mecanismo de oxidación de sulfuros es el mismo para la cloroperoxidasa y el citocromo P450 y se lleva a cabo mediante la transferencia directa de un átomo de oxígeno desde el Compuesto I hacia el sustrato (Figura 1.4.3, rutas 1,4 y 5).

La Figura 4.1.5 muestra cinéticas de competencia entre un sustrato azufrado que se oxida (tiantreno) y el sustrato típico de la cloroperoxidasa, que se halogena (monoclorodimedona, MCDM) (panel A) y entre dos sustratos que se halogenan (pireno y MCDM) (panel B). La velocidad inicial para la halogenación de la MCDM es 3480 min^{-1} y en presencia de tiantreno disminuye hasta 2830 min^{-1} . El tiantreno se oxida lentamente en presencia de MCDM con una velocidad inicial de 300 min^{-1} . Una vez que la MCDM es totalmente convertida y desaparece del medio de reacción, la velocidad de oxidación del tiantreno aumenta. Por otra parte, la presencia del pireno no afecta de manera importante la velocidad de halogenación de la MCDM (3200 min^{-1}) lo que indica una diferencia muy grande en la afinidad de la enzima por cada uno de estos sustratos.

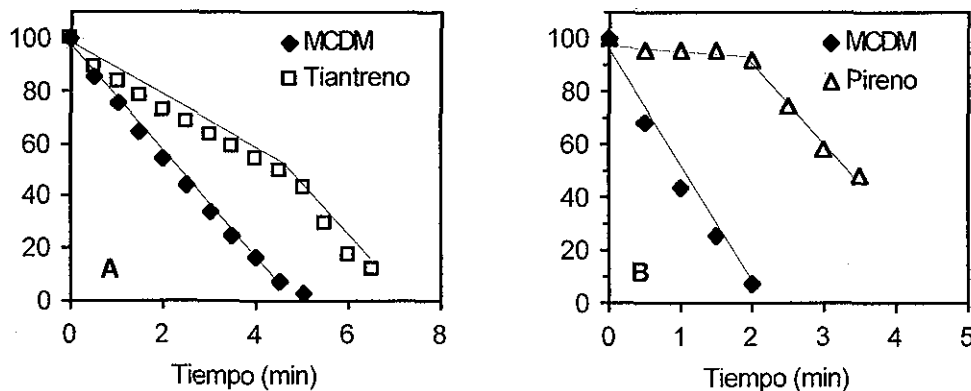


Figura 4.1.5 Competencia entre sustratos de la cloroperoxidasa

Estos resultados sugieren que los sustratos que se oxidan compiten fuertemente con los que se halogenan. Es decir, la cloroperoxidasa reconoce y transforma eficientemente sustratos no naturales, como los compuestos azufrados. En una mezcla compleja los sustratos presentes compiten por los sitios activos de la enzima. Dependiendo de la afinidad entre la enzima y los sustratos y de la concentración de éstos es posible que algunos sustratos sean transformados más rápidamente que otros. La Tabla 4.1.6 contiene los valores de las constantes cinéticas para la monoclorodimedona, el tiantreno y el pireno. La afinidad de la enzima por el compuesto azufrado (K_M) es 10 veces mayor que la afinidad por el compuesto poliaromático. La eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) para la halogenación del pireno es un orden de magnitud menor que para la oxidación del tiantreno. Por otro lado, la halogenación de la monoclorodimedona procede con una eficiencia similar a la oxidación del tiantreno. Es posible que en un medio complejo como el diesel la oxidación de los compuestos organoazufrados ocurra a una velocidad mayor que la halogenación de los compuestos poliaromáticos, lo que resultaría benéfico durante la biodesulfurización de derivados del petróleo.

Tabla 4.1.6 Constantes cinéticas para la oxidación del tiantreno y la halogenación del pireno y la monoclorodimedona

Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)
Monoclorodimedona	94	1.4	6.7×10^7
Tiantreno	64	1.5	4.4×10^7
Pireno	37	32	1.2×10^6

Debido a que la actividad de la cloroperoxidasa se ve disminuida en un medio de reacción conteniendo solventes orgánicos, es esencial el uso de cloruro como activador de la enzima. Sin embargo, bajo estas condiciones de reacción se forman compuestos halogenados nocivos para el ambiente. Con el fin de resolver este problema es necesario combinar varias estrategias, como la ingeniería genética de la cloroperoxidasa para mejorar la afinidad hacia los sustratos azufrados o la ingeniería de solventes para favorecer la oxidación sobre la halogenación de los sustratos.

4.2 Cristalización de la cloroperoxidasa

El R_z es un índice de pureza para las hemoproteínas y relaciona la absorbancia del grupo hemo (banda Soret, ≈ 400 nm) con la absorbancia de los grupos aromáticos de las proteínas (280 nm). Cada hemoproteína tiene un R_z específico. La cloroperoxidasa pura tiene un R_z de 1.44 [143]. La cloroperoxidasa utilizada en este trabajo tiene un R_z mayor a 1.42 y consiste en una especie predominante con un componente menor que representa menos del 5% de la proteína total [91].

Inicialmente la obtención de microcristales de cloroperoxidasa se ensayó utilizando sulfato de amonio como agente precipitante. Este procedimiento fue reportado hace varios años como parte de un protocolo de purificación de la enzima [143]. Sin embargo al implementar esta metodología en este trabajo, no fue posible obtener cristales de cloroperoxidasa mediante este procedimiento. Las razones que pueden explicar este comportamiento son que en el citado reporte, la enzima provenía de un medio de cultivo para *Caldariomyces fumago* ATCC 16373 con glucosa como fuente de carbono. La cloroperoxidasa utilizada en este trabajo se produjo a partir de la cepa de *Caldariomyces fumago* CMI 89362 en un medio de cultivo optimizado que facilita la purificación de la enzima debido a una menor producción de exopolisacáridos coloridos [90]; en este medio de cultivo la fructosa actúa como la fuente de carbono ya que se sabe que induce la producción de cloroperoxidasa, mientras que la glucosa la reprime [160]. La fuente de carbono también determina el grado y tipo de glicosilación de la enzima [92]. Así, la enzima utilizada en este trabajo proviene del cultivo de una cepa con una fuente de carbono distintas a la enzima cristalizada con sulfato de amonio. Por lo tanto es probable que el patrón de glicosilación de la enzima utilizada en este trabajo sea otro. Esta diferencia es suficiente para que cambien las condiciones bajo las cuales cristaliza una proteína. Por este motivo fue necesario buscar otras condiciones de cristalización que produjeran microcristales de cloroperoxidasa.

El proceso general de cristalización se divide en dos fases: la nucleación y el crecimiento [161]. La aparición de cristales macroscópicos comienza con la asociación de moléculas de proteína cuyos contactos intermoleculares son similares a los que se encuentran en el cristal. Cuando estos agregados alcanzan un tamaño crítico, el crecimiento procede mediante la adición de moléculas al arreglo cristalino. Tanto la nucleación como el crecimiento ocurren en soluciones supersaturadas en donde la concentración de la proteína excede su solubilidad. La supersaturación es un estado

fuera del equilibrio caracterizado por una tendencia a formar una fase sólida e incrementar la cantidad de material en esa fase hasta que se recupera el balance y se alcanza la concentración de equilibrio. En condiciones de supersaturación las moléculas encuentran un estado de menor energía dentro de una fase sólida. En la Figura 4.2.1 se muestra un diagrama de fases en donde la región de supersaturación se divide en una zona de supersaturación alta, en donde puede ocurrir tanto la nucleación como el crecimiento y una zona de baja supersaturación en donde sólo el crecimiento de los cristales se ve favorecido. La región de supersaturación debe alcanzarse gradualmente para impedir que las moléculas se agreguen en una fase sólida amorfa y favorecer la formación de una fase sólida ordenada o cristalina. Existen varios factores que pueden afectar la solubilidad de una proteína, entre ellos la temperatura, el pH y la concentración y tipo de sales y aditivos (polímeros, detergentes o solventes orgánicos) [162]. Estos aditivos son llamados precipitantes, aunque la precipitación es sólo uno de los resultados que su presencia en el medio puede ocasionar.

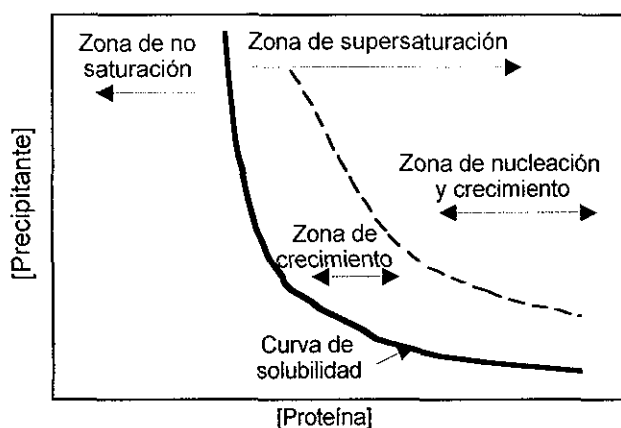


Figura 4.2.1 Diagrama de fases para una proteína

La búsqueda de condiciones de cristalización para la cloroperoxidasa se realizó utilizando el "kit" Crystal Screen que combina en 98 soluciones diferentes el uso de varios agentes precipitantes. Una de estas soluciones produjo microcristales de cloroperoxidasa en forma de agujas mezclados con precipitado. La solución de cristalización contenía 18% polietilenglicol 8000, 0.2 M acetato de zinc y 0.1 M cacodilato de sodio pH 6.5. Las pruebas se realizaron a una escala de 2 μ L utilizando difusión de vapor en gota apoyada. Todo el procedimiento de cristalización se llevó a cabo a una temperatura controlada de 18°C.

En la cristalización por difusión de vapor se mezclan volúmenes iguales de una solución de proteína y de la solución de cristalización y la gota resultante se coloca sobre un reservorio conteniendo solamente la solución de cristalización. El sistema se sella y la concentración de la proteína y del agente precipitante en la gota aumentan gradualmente al transferirse agua mediante difusión a través de la fase gaseosa desde la gota hacia la solución más higroscópica del reservorio, hasta llegar al equilibrio (Figura 4.2.2).

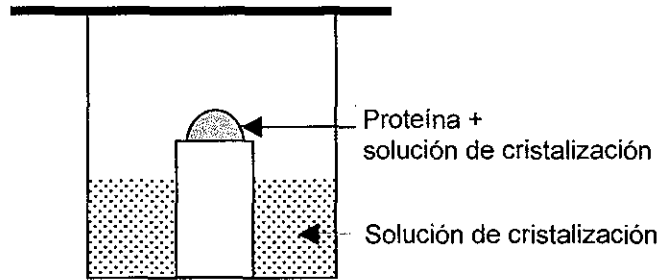


Figura 4.2.2 Cristalización de proteínas en gota apoyada por difusión de vapor

De esta manera puede alcanzarse una zona de supersaturación en donde compiten la nucleación y el crecimiento. A medida que los cristales van creciendo, la concentración de proteína en el sobrenadante disminuye hasta una zona en la que solamente se favorece el crecimiento (Figura 4.2.3). Siguiendo este procedimiento se obtienen aglomerados de agujas de cloroperoxidasa con un espesor de 10-20 μm y hasta 1 mm de longitud.

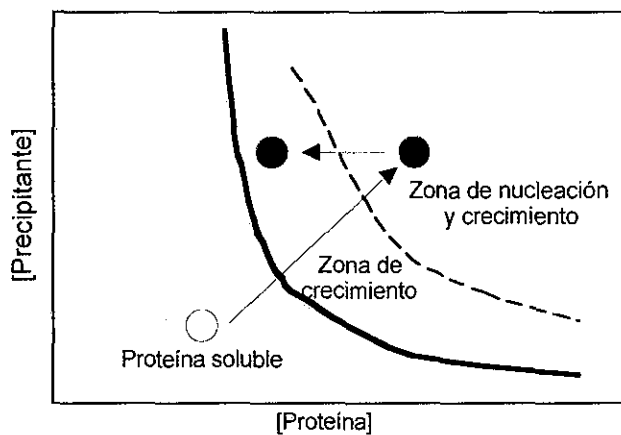


Figura 4.2.3 Diagrama de fases para la cristalización por difusión de vapor

La cristalización fue escalada hasta un volumen de 60 μL . Con el fin de minimizar el precipitado y mejorar la cristalización de la cloroperoxidasa se realizó una serie de cambios a la estrategia de cristalización:

- disminuir la concentración de la proteína de 13 mg/mL a 10 mg/mL,
- disminuir el pH de la solución y
- reducir la concentración del acetato de zinc.

La solución de cristalización quedó conformada por 18% polietilenglicol 8000, 0.1 M acetato de zinc y 0.1 M cacodilato de sodio pH 5.5. Estos cambios redujeron la velocidad de nucleación, favoreciendo el crecimiento de agujas individuales y menor cantidad de precipitado en la gota. Los microcristales obtenidos de esta manera fueron sembrados en soluciones con diferentes concentraciones de agente precipitante. Estas soluciones se equilibraron durante dos semanas antes del sembrado. Con esta estrategia se redujo aún más el precipitado y se obtuvieron agujas más anchas (20-40 μm). En la cristalización por sembrado los cristales son molidos e incubados en una solución con baja concentración de precipitante. De esta manera se disuelven las capas exteriores del cristal y se eliminan las imperfecciones que detienen el crecimiento. A continuación se siembran en condiciones de baja supersaturación, en donde la nucleación no se ve favorecida y solamente ocurre el crecimiento de los cristales (Figura 4.2.4).

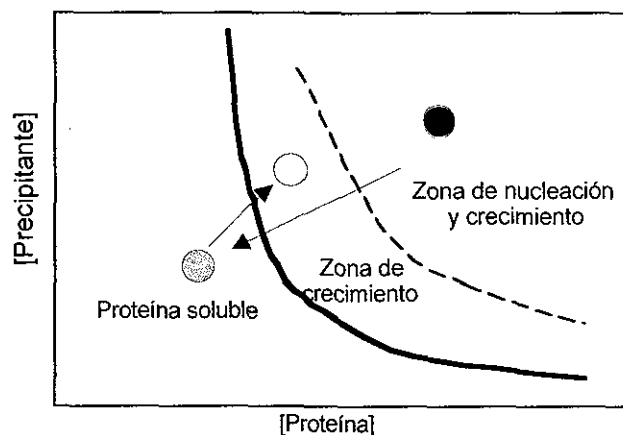


Figura 4.2.4 Diagrama de fases para la cristalización por sembrado

Las mejores condiciones de cristalización se encontraron cuando los cristales fueron sembrados en una solución con 14% polietilenglicol 8000, 0.1 M acetato de zinc y 0.1 M cacodilato de sodio pH 5.5, obteniendo hasta un 70% de la proteína inicial en forma de

crisales. La Figura 4.2.5 muestra los crisales obtenidos inicialmente con la solución del "kit" (panel A) y los crisales obtenidos por seeding después de optimizar la solución de cristalización (panel B). Los paneles C y D muestran dos micrografías de los crisales de cloroperoxidasa obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

Los crisales fueron recuperados de la solución de cristalización y conservados en una solución compuesta por 25% polietilenglicol 8000, 0.1 M acetato de zinc y 0.1 M cacodilato de sodio pH 5.5. Una concentración alta del agente precipitante impide que los crisales se disuelvan debido a la baja solubilidad de la proteína. Las reacciones de entrecruzamiento y de modificación química se llevaron a cabo bajo estas condiciones para asegurar la estabilidad de los crisales.

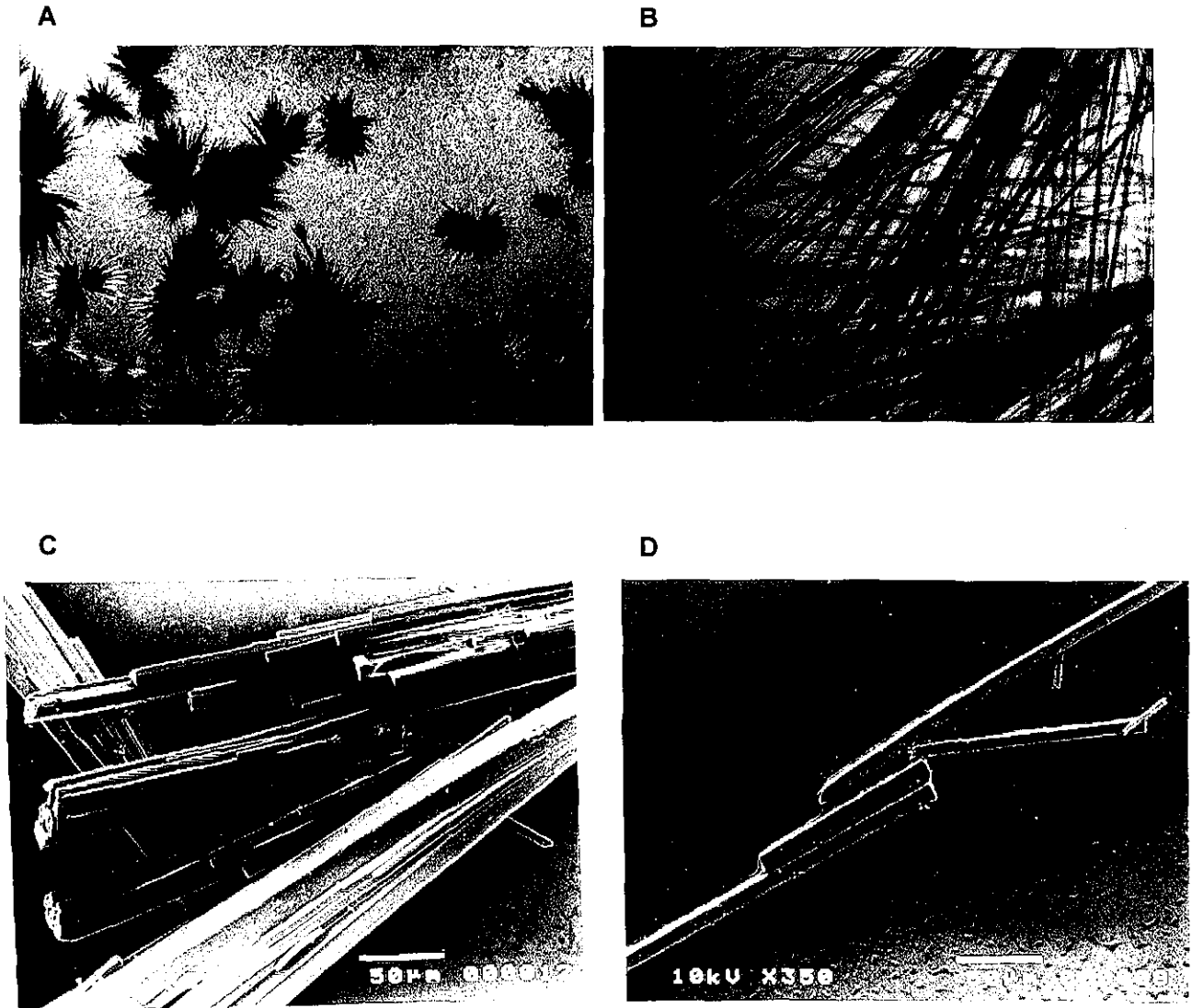


Figura 4.2.5 Imágenes de los microcristales de cloroperoxidasa
Panel A y B: microscopio óptico
Panel C y D: microscopía electrónica de barrido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3 Entrecruzamiento de cristales de cloroperoxidasa

A) Glutaraldehído

Para determinar la factibilidad del entrecruzamiento de los cristales de cloroperoxidasa se realizaron pruebas con la enzima soluble. El glutaraldehído es un agente entrecruzante bifuncional que reacciona eficientemente con la mayoría de las proteínas y ha sido utilizado exitosamente en la obtención de cristales catalíticos, proporcionando un grado de entrecruzamiento tal que se mantiene la integridad de los cristales, sin destruirse el arreglo ni la conformación de las moléculas de proteína [36,55,58].

Los grupos carbonilos como los aldehídos reaccionan rápidamente con los grupos aminos para formar bases de Schiff [25]. La reacción involucra un ataque nucleofílico y los mejores resultados se obtienen en un medio de reacción básico. Las bases de Schiff son inestables y su formación es reversible en solución acuosa, así que los complejos formados generalmente se estabilizan reduciendo la base de Schiff para formar una amina (Figura 4.3.1).

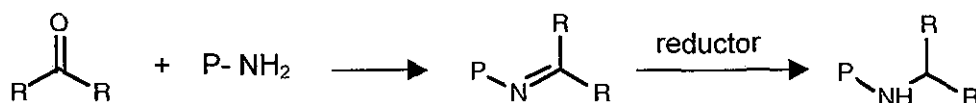


Figura 4.3.1 Reacción entre grupos aminos y aldehídos

Sin embargo la química entre el glutaraldehído y las proteínas se aparta de lo esperado para los aldehídos, ya que los complejos formados entre las dos especies son muy estables. Existe evidencia de que el mecanismo de reacción no involucra la formación de una base de Schiff. Por ejemplo, un análisis de aminoácidos mediante la hidrólisis ácida de una proteína modificada con glutaraldehído no muestra regeneración de las lisinas. Debido a que una base de Schiff no sobreviviría en las condiciones utilizadas para realizar este análisis, estas observaciones sugieren que se está formando otro tipo de enlace. Además, la adición de un agente reductor no mejora la estabilidad del complejo. De hecho, la formación del aducto es irreversible y el aducto es suficientemente estable en presencia de una amina exógena. Por otro lado, el comportamiento químico del glutaraldehído puede ser racionalizado mediante la existencia de las diferentes estructuras que puede adoptar dependiendo de las condiciones del medio [163].

Las soluciones acuosas de glutaraldehído son mezclas multicomponentes. En la Figura 4.3.2 se muestran las estructuras que el glutaraldehído puede adoptar a pH ácido o neutro: monohidratos (II), dihidratos (III), hemiacetales cíclicos (IV) y oligómeros (V). A medida que aumenta la temperatura las estructuras cíclicas se descomponen para formar glutaraldehído libre (I). En soluciones concentradas o en condiciones ácida predominan los multímeros cíclicos (V). Es posible que bajo estas condiciones el mecanismo de reacción entre la proteína y el glutaraldehído sea como el que se muestra en la Figura 4.3.2, produciendo aductos (IVa o Va) que a diferencia de una base de Schiff no necesitan de un paso de reducción para ser estables [163].

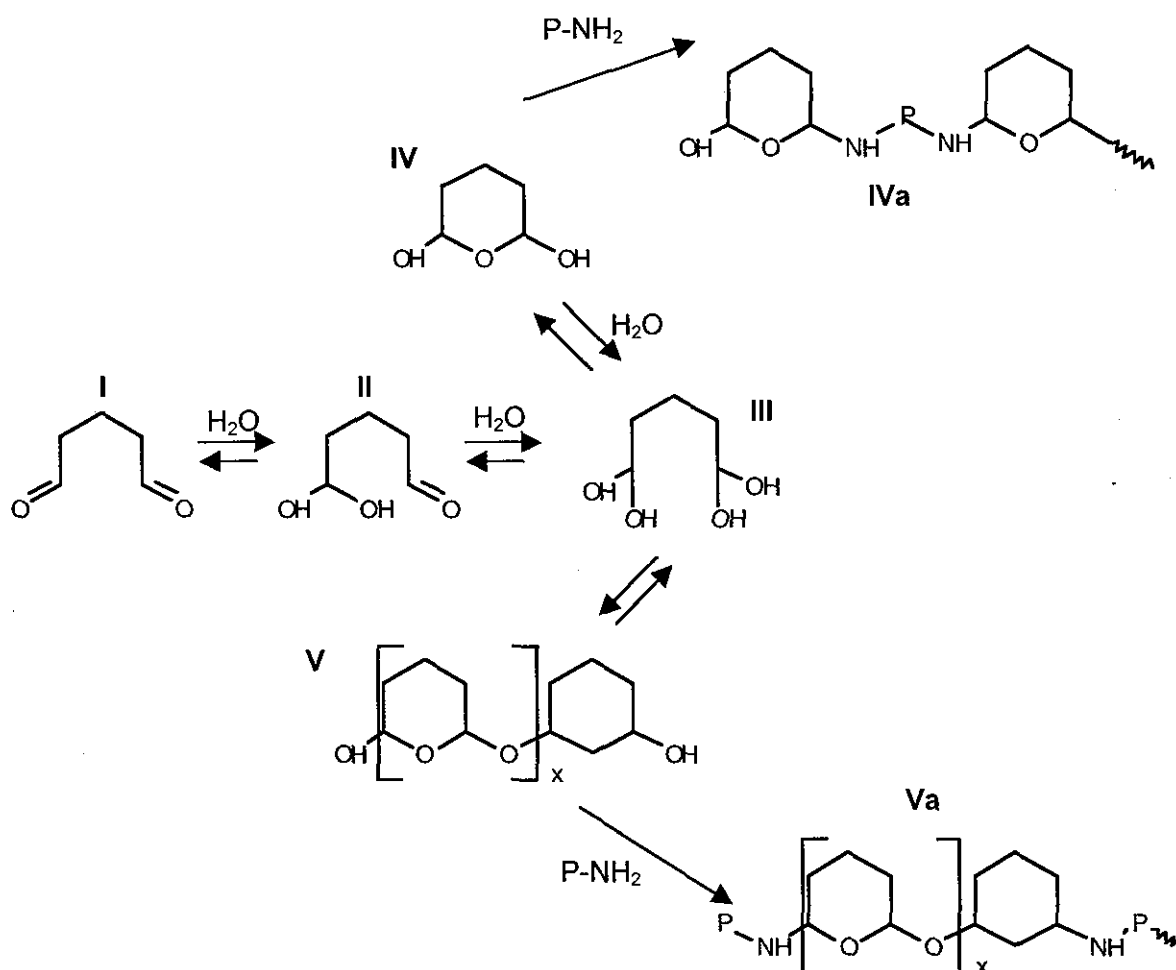


Figura 4.3.2 Estructuras del glutaraldehído y mecanismo de reacción en solución acuosa ácida o neutra ($\text{P-NH}_2 = \text{proteína}$)

Por otro lado, en condiciones alcalinas el glutaraldehído sufre una condensación aldólica intermolecular que produce oligómeros de aldehídos α,β -insaturados (VI) como se muestra en la Figura 4.3.3. Al reaccionar con los grupos aminos de una proteína podrían formarse bases de Schiff que son estabilizadas por la resonancia del doble enlace adyacente (VII) [164]. Esto explicaría la estabilidad de los aductos formados. Adicionalmente puede ocurrir una adición de Michael al doble enlace (VIII) [165]. Ambos productos son estables a la hidrólisis ácida. La capacidad de formar oligómeros de diferente tamaño le confiere al glutaraldehído una ventaja como entrecruzante. Al existir polímeros de diferente longitud, aumenta la probabilidad del entrecruzamiento intermolecular dentro del cristal de proteína.

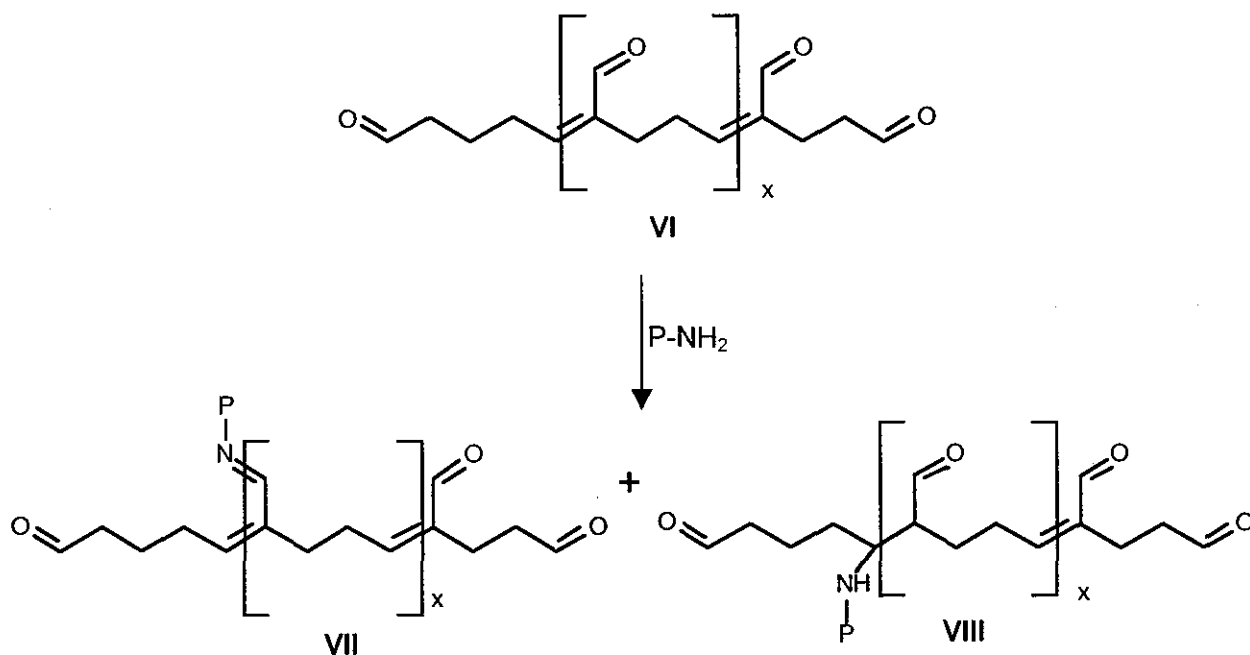


Figura 4.3.3 Mecanismo de reacción del glutaraldehído en soluciones alcalinas

Considerando lo anterior, se realizaron pruebas de entrecruzamiento con la cloroperoxidasa libre. Cuando la cloroperoxidasa libre se puso en contacto con glutaraldehído a pH 5, no se detectó ningún cambio en el perfil de migración electroforético de la enzima en presencia o ausencia de un agente reductor (Figura 4.3.4, carriles 5 y 6). Esto se debe probablemente al reducido número de lisinas superficiales de la enzima. Adicionalmente, bajo estas condiciones las lisinas están

protonadas y son nucleófilos pobres. Por otro lado, al realizar la reacción de entrecruzamiento a pH 9 se observaron especies de mayor peso molecular que sugieren entrecruzamiento intermolecular de la proteína (carril 4). La adición de un agente reductor no modifica este perfil (carril 3).

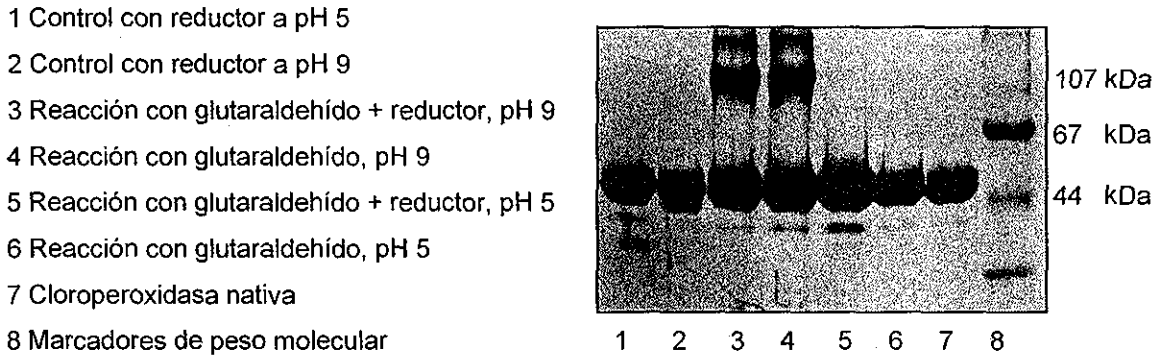
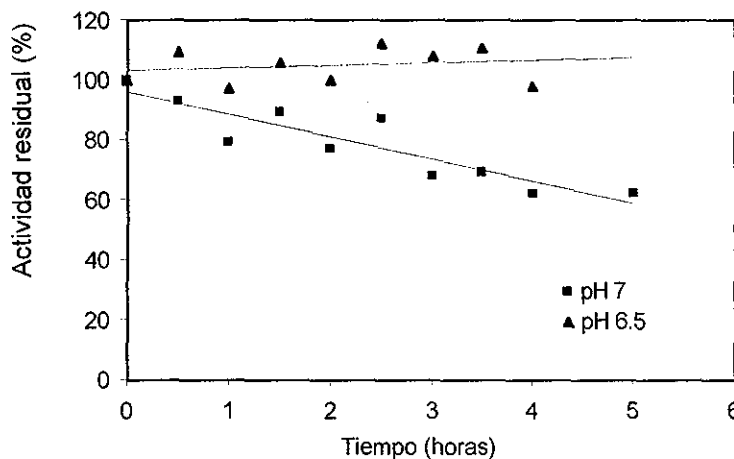


Figura 4.3.4 SDS-PAGE de la reacción entre el glutaraldehído y la cloroperoxidasa libre

Aunque un pH alcalino favorece la reacción con glutaraldehído, es imposible usar estas condiciones con la cloroperoxidasa debido a que ésta sufre una inactivación rápida e irreversible cuando el pH es mayor que 7.5 [166]. La Figura 4.3.5 muestra la actividad residual de la enzima después de incubarla durante diferentes intervalos de tiempo en soluciones con diferente pH a temperatura ambiente.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 4.3.5 Estabilidad al pH de la cloroperoxidasa libre

Para el caso de los cristales, se variaron algunos parámetros de la reacción con glutaraldehído. El pH se modificó entre 5.5 y 6.5, la reacción se realizó a 4°C o 25°C y se utilizó un exceso molar de glutaraldehído sobre la proteína de entre 10 a 350,000 moles de glutaraldehído por moles de proteína. Todas las reacciones se monitorearon hasta 6 horas. En ningún caso se encontraron cristales que resistieran a la disolución y que conservaran su actividad. Después de reaccionar con el glutaraldehído los cristales ya no polarizaban, eran flexibles, se disolvían y presentaban baja o nula actividad. Es probable que el grado de entrecruzamiento no sea suficiente para mantener al cristal estable y activo al mismo tiempo, por las razones de baja disponibilidad de aminos primarios descritas arriba para la cloroperoxidasa soluble. La situación puede agravarse en los cristales, en donde las moléculas de proteína tienen una orientación espacial definida que puede afectar la probabilidad del entrecruzamiento.

La Figura 4.3.6 muestra la distribución de las lisinas y de los grupos carboxilos de la cloroperoxidasa. La enzima libre en solución tiene 37 grupos carboxilos distribuidos homogéneamente, de los cuales alrededor de 25 están expuestos al solvente. Por otro lado, la enzima tiene cinco lisinas concentradas en una región de la proteína; solamente tres de ellas están expuestas al solvente.

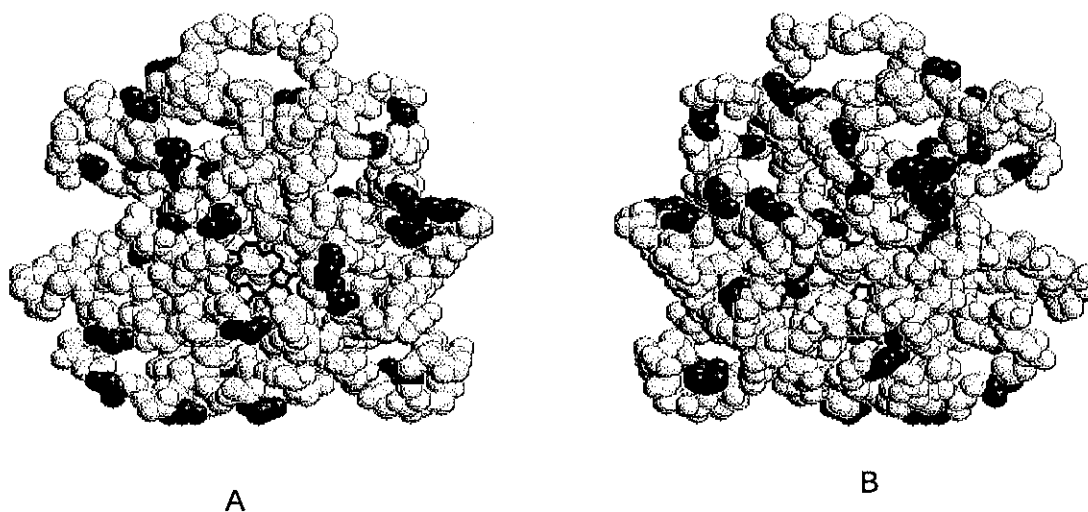


Figura 4.3.6 Grupos carboxilos y lisinas de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (carboxilos en azul, lisinas en magenta, hemo en rojo)
B es la rotación de 180° de A

Con la intención de favorecer la reacción de entrecruzamiento a un pH en que la cloroperoxidasa sea estable, se incrementaron los grupos aminos de la enzima libre utilizando una modificación química con carbodiimida sobre los grupos carboxilos superficiales. En presencia de una amina u otro nucleófilo, la carbodiimida promueve la formación de una amida en dos pasos (Figura 4.3.7) [25]. Inicialmente la carbodiimida reacciona con el carboxilo para formar un intermediario reactivo (O-acil-isourea). Posteriormente el intermediario reacciona con la amina para formar la amida correspondiente.

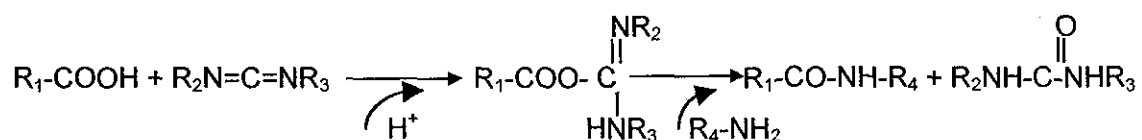


Figura 4.3.7 Mecanismo de reacción de las carbodiimidas

Para modificar a la cloroperoxidasa se utilizó la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, que es soluble en agua, y una diamina como nucleófilo. De esta manera, cada grupo carboxilo modificado se convertiría en una amina primaria. Se encontró que la modificación química con hexandiamina en los carboxilos superficiales favorece el entrecruzamiento por glutaraldehído de la enzima soluble (Figura 4.3.8). La cloroperoxidasa libre modificada tiene una migración electroforética diferente a la cloroperoxidasa sin modificar (carriles 3 y 2, respectivamente). Mientras que la cloroperoxidasa sin modificar es ligeramente entrecruzada a pH 8 (carril 6), la reacción con glutaraldehído a pH 5 y 8 produce especies de mayor peso molecular con la cloroperoxidasa modificada químicamente (carriles 4 y 5, respectivamente).

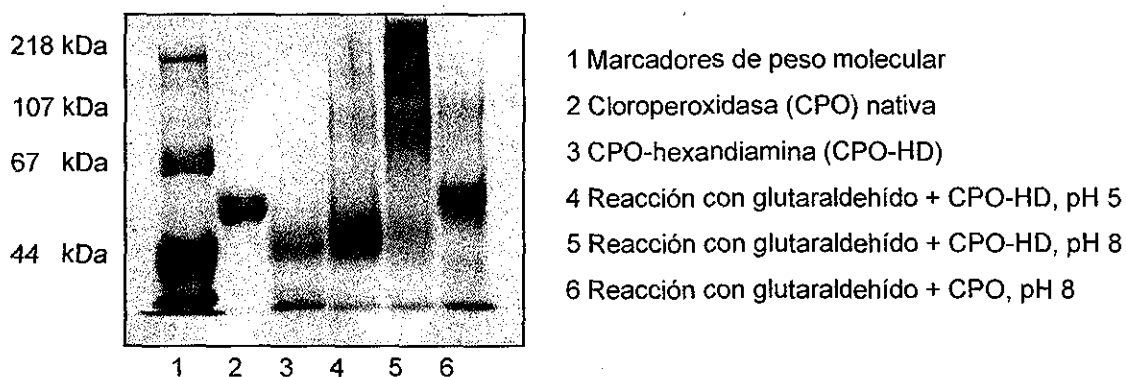


Figura 4.3.8 SDS-PAGE de la reacción entre el glutaraldehído y la cloroperoxidasa libre modificada químicamente

Para comprobar si la modificación química también favorecería el entrecruzamiento de los cristales, éstos se pusieron en contacto con carbodiimida y hexandiamina. Cualquier solución conteniendo compuestos con grupos aminos o carboxilos interferiría con la reacción de modificación. La solución de cristalización contenía acetato de zinc 0.1 M por lo que fue necesario modificarla sin perjudicar la integridad de los cristales para poder realizar la modificación química. En la Tabla 4.3.1 se muestran los compuestos que se probaron como sustitutos del acetato de zinc, tratando de reemplazarlo con compuestos que pudieran sustituir las interacciones del acetato (sulfatos) y manteniendo la fuerza iónica constante. El sulfato de zinc fue el único que permitió preparar una solución que mantuviera estables a los cristales durante el tiempo que dura la reacción de modificación.

Tabla 4.3.1 Modificación de la solución de reacción

Sal	Concentración (M)
Acetato de zinc	0.1
MES	0.3
Sulfato de amonio	0.1
Sulfato de zinc	0.075
Cloruro de sodio	0.3

Para comprobar que los cristales fueron realmente modificados químicamente con carbodiimida, se disolvió una parte de ellos antes de entrecruzarlos con glutaraldehído y se corrió una muestra en un SDS-PAGE. Se observó una migración aberrante como la obtenida para la cloroperoxidasa libre (Figura 4.3.8, carril 3). Adicionalmente se comparó el perfil de elución en una cromatografía de intercambio aniónico de la cloroperoxidasa nativa y modificada libre o en cristales; la proteína modificada se retiene menos en la columna, indicando una disminución en las cargas negativas. Sin embargo, esta información es sólo cualitativa y no permite determinar con precisión el grado de modificación química.

Como alternativa se utilizó un método fluorométrico cuantitativo para determinar el grado de modificación de la proteína. Mientras que los grupos aminos primarios de la cloroperoxidasa libre aumentaron de 5 a 15 por molécula, para los cristales se detectaron hasta 10 grupos aminos primarios por molécula en promedio. Esta diferencia puede deberse a que la concentración de reactivos que se utiliza para modificar a los

cristales es menor a la concentración que puede utilizarse para modificar a la enzima libre. Debido a que la composición del medio afecta la estabilidad de los cristales, concentraciones altas de los reactivos los destruyen. Adicionalmente es posible que la modificación química de las moléculas dentro del cristal no sea homogénea ni ocurra en las mismas posiciones que para la cloroperoxidasa libre, ya que dentro del cristal existen impedimentos estéricos que no se encuentran en solución. Después de la modificación química los cristales siguen polarizando la luz, lo cual indica que el arreglo del cristal no ha sido afectado seriamente. Adicionalmente, al disolver los cristales modificados químicamente se observó que la actividad de la enzima no fue afectada por la modificación.

Después de realizar la modificación química sobre los cristales, éstos fueron entrecruzados con diferentes cantidades de glutaraldehído. La Figura 4.3.9 compara el perfil de solubilidad y actividad de los cristales sin (panel A) y con (panel B) modificación química después del entrecruzamiento. Es evidente que la modificación química favorece el entrecruzamiento, de tal manera que la cantidad de glutaraldehído necesaria para obtener cristales entrecruzados estables es menor. Sin embargo, los cristales todavía siguen perdiendo la mayor parte de su actividad. Aún en presencia de imidazol que actúa como ligando del fierro y puede proteger la integridad del sitio activo, los cristales siguen perdiendo actividad después del entrecruzamiento. Aunque los cristales no polarizan la luz, retienen actividad catalítica y son estables a la disolución y a la temperatura. Las propiedades cinéticas de estos cristales entrecruzados se discuten más adelante.

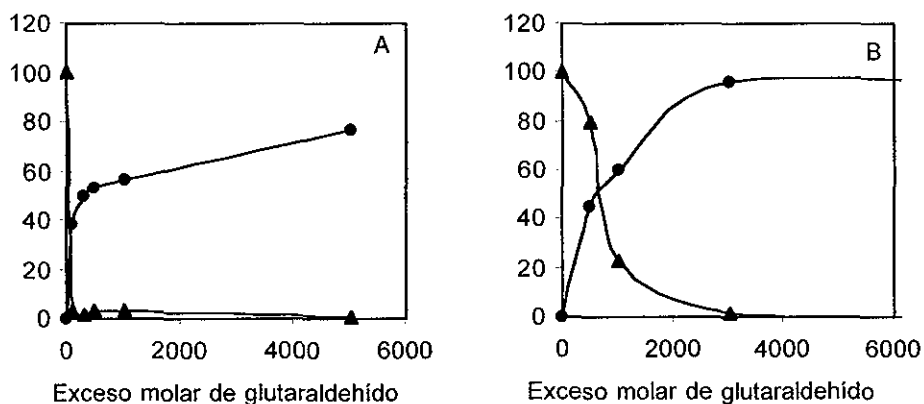


Figura 4.3.9 % proteína en cristal (●) y % actividad (▲) de cristales entrecruzados (A) sin y (B) con modificación química

Un análisis de aminoácidos de los cristales entrecruzados utilizando este procedimiento muestra que el número de lisinas disminuye, lo que indica que durante el entrecruzamiento con glutaraldehído estos residuos reaccionan aunque su participación no es suficiente para estabilizar al cristal. El análisis no muestra el incremento de grupos aminos primarios debido a la modificación química con carbodiimida, ya que el enlace formado es de tipo amida y se hidroliza como un enlace peptídico. Además de las lisinas, también disminuye el número de argininas y serinas (Figura 4.3.10). El glutaraldehído no es un reactivo específico para las lisinas, sino que reacciona con cualquier nucleófilo. Aunque a pH alcalino las lisinas son los nucleófilos más potentes, bajo las condiciones de reacción descritas para obtener cristales entrecruzados de cloroperoxidasa las lisinas están protonadas y no son muy reactivas. Es posible que el glutaraldehído, al reaccionar con otros aminoácidos como las argininas y las serinas, modifique grupos o zonas importantes para la catálisis. La cloroperoxidasa cuenta con 27 serinas, de las cuales 3 están localizadas cerca de la entrada al sitio activo. Estos resultados permiten suponer que estas modificaciones inespecíficas pueden afectar la catálisis al obstaculizar la unión de los sustratos al sitio activo o al rigidizar la estructura de la proteína mediante la formación de enlaces intramoleculares. En consecuencia, es posible que estas modificaciones sean responsables en parte por la baja actividad observada para los cristales.

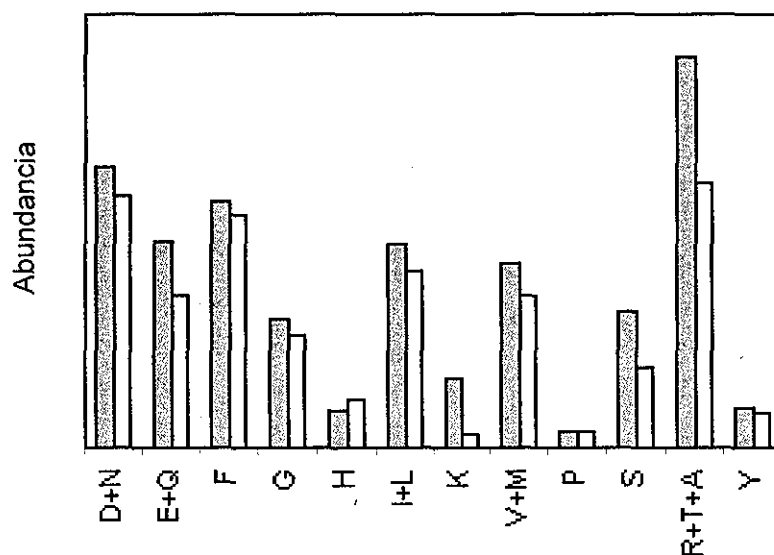


Figura 4.3.10 Análisis de aminoácidos de la cloroperoxidasa (■) y de los cristales entrecruzados (□)

B) Otros entrecruzantes

1) Carbodiimida-diamina/Cloruro de adipoilo

El cloruro de adipoilo y la hexandiamina en proporción 1:1 se utilizan para producir Nylon 66. Los cristales de cloroperoxidasa modificados químicamente con hexandiamina fueron puestos en contacto con hexandiamina y cloruro de adipoilo 0.5:1 para formar redes que intercalaran cristales. Esta estrategia produciría un plástico biocatalítico con cristales inmovilizados. Aunque los cristales se incorporan al polímero, éste tiene una estructura granulosa que lo hace muy frágil. Al poner en solución acuosa este polímero, los cristales se disuelven. Probablemente el entrecruzamiento debe ser no sólo superficial sino también interno para que los cristales sean estables fuera de la solución de cristalización.

2) Periodato de sodio/Dihidrazida

La idea detrás de esta estrategia era formar grupos aldehídos a partir de los carbohidratos superficiales de la cloroperoxidasa mediante su oxidación con periodato. Posteriormente se podrían formar enlaces intermoleculares con una diamina. La dihidrazida del ácido adípico resultaba un buen candidato para esta estrategia ya que posee dos grupos aminos en sus extremos y se comporta como un nucleófilo a pH neutro, debido a que tiene un pKa de 2.45. La reacción formaría una base de Schiff que podría ser estabilizada por reducción. Sin embargo, los cristales no soportaron la presencia del periodato, que es un oxidante muy fuerte y agresivo con las proteínas.

3) Carbodiimida-dihidrazida/Glutaraldehído

Al modificar los carboxilos de la proteína con dihidrazida, se obtendrían grupos aminos superficiales desprotonados a pH neutro. Esto se traduciría en nucleófilos más poderosos y posiblemente la reacción de entrecruzamiento con glutaraldehído sería más favorable. Desafortunadamente la modificación química con esta diamina no pudo realizarse porque los cristales son extremadamente sensibles a la presencia de dihidrazida en el medio de reacción y se destruyen.

4.4 Propiedades de los cristales entrecruzados de cloroperoxidasa

Las fuerzas involucradas en el empaquetamiento cristalino de las macromoléculas son débiles en comparación con las que mantienen la cohesión en cristales de moléculas pequeñas. Las fuerzas involucradas son puentes salinos, puentes de hidrógeno, van der Waals, dipolo-dipolo e hidrofóbicas. La débil cohesión entre las macromoléculas dentro del cristal se debe a que sólo una pequeña parte de la superficie participa en contactos intermoleculares, mientras que el resto permanece en contacto con el solvente.

El estado cristalino mejora notablemente la estabilidad de la cloroperoxidasa en presencia de un solvente orgánico, como se muestra en la Tabla 4.4.1 para los cristales sin entrecruzar [167] (ver Apéndice 7.6). La inactivación por desnaturalización es más rápida para la enzima libre que para la enzima en estado cristalino, donde las moléculas están ordenadas y estabilizadas por las interacciones que existen entre ellas. La estabilidad que confiere el estado cristalino ha sido observada también para otras proteínas [168]. Esta estabilidad se debe a que dentro del cristal las moléculas de proteína conservan mejor su estructura secundaria y tienen menos tendencia a agregarse.

Tabla 4.4.1 Actividad residual de la cloroperoxidasa después de una hora de incubación en 99% t-butanol

Temperatura (°C)	Enzima libre (% actividad residual)	Enzima cristalina sin entrecruzar (% actividad residual)
30	31	50
40	28	51
50	7	38

La mayor estabilidad del estado cristalino se ve reflejada también en una mayor resistencia a la exposición a temperaturas altas, como se muestra en la Figura 4.4.1 para los cristales entrecruzados. La cloroperoxidasa libre se inactiva rápidamente a temperaturas mayores que 50°C [92]. La actividad de los cristales entrecruzados se mantiene prácticamente sin cambio aún después de una hora de incubación a 70°C. La termoestabilidad de los cristales entrecruzados es consecuencia tanto del arreglo ordenado de las moléculas como de la rigidez de la estructura tridimensional que

ocasiona el entrecruzamiento con glutaraldehído. Por otro lado, en solución y en ausencia de estos contactos estabilizadores la conformación nativa de las moléculas de proteína puede destruirse más fácilmente.

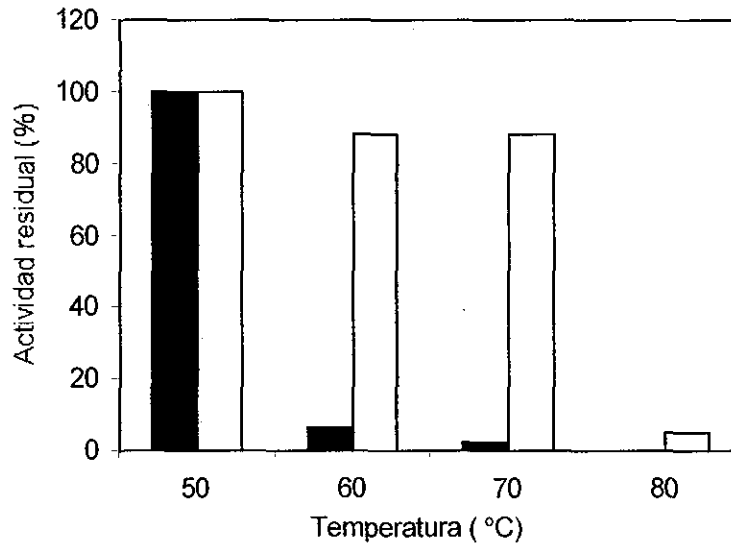


Figura 4.4.1 Actividad residual de cristales entrecruzados de cloroperoxidasa (□) y enzima libre (■) después de una hora de incubación a diferentes temperaturas en solución acuosa

El estado físico de la proteína tiene un efecto negativo sobre la actividad. La Tabla 4.4.2 muestra la actividad de la cloroperoxidasa en dimetilformamida con un contenido de agua de 1%. El cambio de fase reduce a un tercio la actividad. Adicionalmente, la actividad observada para los cristales entrecruzados es todavía un orden de magnitud menor. Esta reducción ha sido documentada para otras enzimas y la actividad enzimática de los cristales puede ser entre uno y tres órdenes de magnitud menor que la actividad de la enzima en solución [24,53,55,56,57,169,170].

Tabla 4.4.2 Actividad enzimática para la oxidación del pinacianol

	Velocidad inicial (min^{-1})
Cloroperoxidasa soluble	11
Cloroperoxidasa cristalina	3.15
Cristales entrecruzados	0.34

Los factores más importantes que influyen sobre la actividad de los cristales son el tamaño del cristal, el tamaño del sustrato y la conformación de la enzima dentro del cristal [62]. Es poco probable que la baja actividad enzimática de los cristales entrecruzados de cloroperoxidasa se deba a una conformación incorrecta de la enzima dentro del cristal, debido a que esta enzima no sufre cambios conformacionales importantes durante la catálisis. El tamaño de los cristales utilizados en este trabajo está dentro del intervalo adecuado para evitar problemas de difusión [24,62,169,170]. Para desechar la presencia de problemas difusionales en los cristales, se determinó la velocidad inicial para la oxidación del guaiacol a una $[S] \ll K_M$. En estas condiciones, una relación lineal entre la velocidad y la cantidad de enzima indica la ausencia de problemas de difusión al interior del cristal. En presencia de problemas difusionales, esta relación no es lineal y la velocidad inicial correlaciona con la raíz cuadrada de la cantidad de enzima. En la Figura 4.4.2 se presentan las dos correlaciones. La relación entre la velocidad inicial y la concentración de enzima es lineal (panel A), mientras que la relación entre la velocidad y la raíz cuadrada de la concentración de enzima no lo es (panel B). En cristales de este tamaño aparentemente la difusión de los sustratos no es una limitante para la actividad.

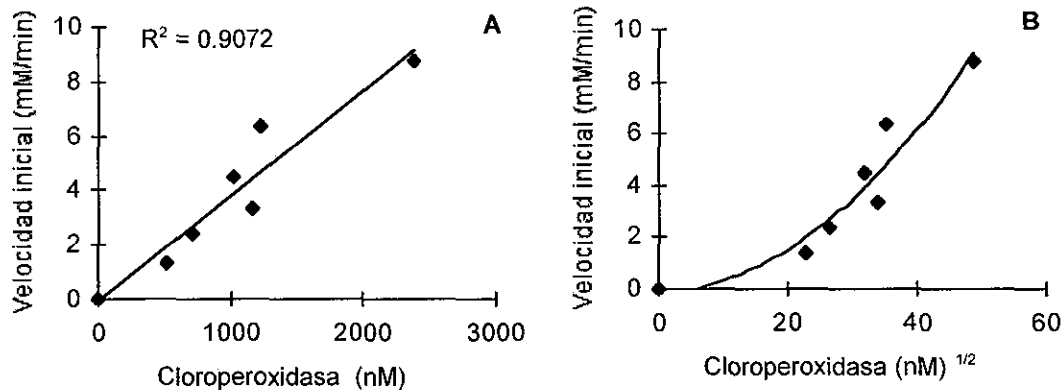


Figura 4.4.2 Relación entre la velocidad inicial para la oxidación del guaiacol y la concentración de cloroperoxidasa

La Tabla 4.4.3 contiene las constantes cinéticas de la cloroperoxidasa libre y de los cristales entrecruzados para la oxidación de dos sustratos azufrados y para la dismutación de H_2O_2 . La reducción en la actividad de los cristales se debe principalmente a una disminución en la constante catalítica, pues la constante de

afinidad de los sustratos es del mismo orden de magnitud tanto para la enzima libre como para los cristales entrecruzados.

Tabla 4.4.3 Constantes cinéticas de la cloroperoxidasa para la oxidación del tiantreno y tioanisol, y para la dismutación de H₂O₂

Sustrato	Enzima libre			Cristales entrecruzados		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
Tiantreno	555	0.0033	1.6x10 ⁸	0.85	0.0073	1.1x10 ⁵
Tioanisol	4170	1.75	2.3x10 ⁶	28	2.2	1.2x10 ⁴
H ₂ O ₂	1670	10	1.6x10 ⁵	55	4.6	1.2x10 ⁴

En los tres casos la actividad de los cristales entrecruzados es menor que la actividad de la enzima libre. Sin embargo, la actividad es menor para el sustrato más grande y a medida que el tamaño del sustrato disminuye, la actividad aumenta (Figura 4.4.3). La eficiencia catalítica de los cristales entrecruzados es tres, dos y un orden de magnitud menor que la de la enzima libre para el tiantreno, tioanisol y H₂O₂, respectivamente. Estos resultados hacen suponer que los sustratos voluminosos tienen un acceso limitado a los sitios activos dentro del cristal. La accesibilidad de los sustratos está limitada por el tamaño de los poros dentro del cristal. Este tamaño varía con la proteína y con el tipo de arreglo espacial, por lo que no es una variable fácil de controlar.

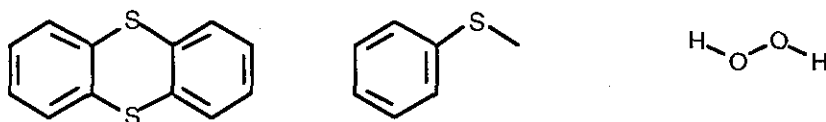


Figura 4.4.3 Estructura química del tiantreno, tioanisol y H₂O₂

Por otro lado, el perfil de pH y de temperatura de los cristales entrecruzados se muestran en la Figura 4.4.4. El pH óptimo es similar al de la cloroperoxidasa libre. Por otra parte, la temperatura óptima para la actividad de los cristales entrecruzados es ligeramente mayor. Esta diferencia probablemente refleja la estabilidad de la

estructura tridimensional de las moléculas dentro del cristal que retarda el proceso de desnaturalización térmica.

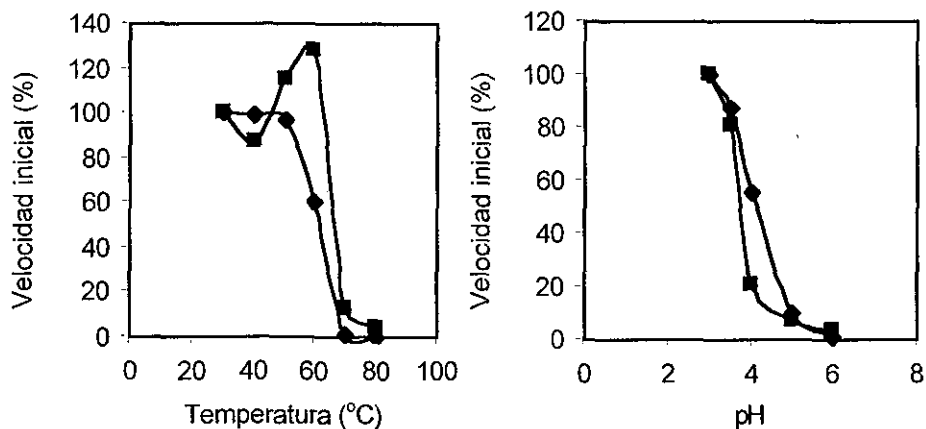


Figura 4.4.4 Perfil de temperatura y de pH para los cristales entrecruzados (■) y la cloroperoxidasa libre (◆)

La Tabla 4.4.4 muestra que los cristales de cloroperoxidasa son más activos en solvente orgánico cuando la actividad de agua aumenta. Este es un factor importante para la catálisis en solventes anhidros, pues se sabe que la actividad enzimática se ve afectada por el contenido de agua presente en el medio.

Tabla 4.4.4 Velocidad inicial para la oxidación del pinacianol en dimetilformamida

% H ₂ O	a _w	Cristales entrecruzados (min ⁻¹)	Cloroperoxidasa libre (min ⁻¹)
1	0.0469	0.18	11
2	0.0911	1.16	96
5	0.2089	13	123
10	0.3635	26	157

Los cristales también se probaron en presencia de diferentes solventes orgánicos para determinar su capacidad de oxidar compuestos organoazufrados. Se hicieron pruebas en presencia de 15% tetrahidrofurano utilizando tiantreno y diesel primario como sustratos. En ambos casos los cristales entrecruzados son capaces

de oxidar a los compuestos azufrados, al igual que la enzima libre. Sin embargo, al ensayar esta reacción de oxidación en medios más hidrofóbicos (sistema ternario tolueno-isopropanol-agua o solventes anhidros o con bajos porcentajes de agua) se encontró que no hay actividad. A pesar de que la actividad de agua se ajustó a niveles similares en los diferentes solventes, al parecer existen otros factores que afectan la actividad catalítica de los cristales en solventes con bajo contenido de agua. Por un lado, se sabe que la partición de un sustrato hidrofóbico entre el solvente y el sitio activo de una enzima se ve desfavorecida en medios no polares [171,172]. Al igual que otras peroxidases, en el sitio activo de la cloroperoxidasa existen residuos cargados que forman una cavidad polar alrededor del hemo. De hecho, se ha observado que las constantes de afinidad entre la cloroperoxidasa libre y algunos sustratos aromáticos son más grandes a medida que aumenta el contenido de solvente orgánico en el medio de reacción [173]. Adicionalmente, es razonable suponer que también existe un fenómeno de partición desfavorable del sustrato hacia el interior de los cristales entrecruzados, debido a que el microambiente dentro de los mismos exhibe una alta concentración de residuos polares y cargados que forman parte de las moléculas de proteína. Por otro lado, la estructura de las moléculas probablemente es más rígida en los cristales que en solución reduciendo la flexibilidad de la enzima en solventes orgánicos con bajo contenido de agua.

En resumen, a pesar de que su actividad se ve afectada por el entrecruzamiento los cristales entrecruzados de cloroperoxidasa son una preparación superior que la enzima libre en términos de estabilidad. Otras propiedades de los cristales como el perfil de actividad a diferente pH o las constantes de afinidad por algunos sustratos son muy similares a los de la enzima libre.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se demostró que la cloroperoxidasa es una enzima con aplicación potencial en la industria petrolera, específicamente en la biodesulfurización de combustibles derivados del petróleo. La cloroperoxidasa reconoce a un gran número de sustratos azufrados y cataliza eficientemente la oxidación de los mismos, lo que facilita su remoción. La industria petrolera requiere un biocatalizador estable y activo a altas temperaturas y en presencia de solventes orgánicos. Por esta razón, este proyecto planteó el objetivo general de obtener cristales entrecruzados de cloroperoxidasa, con el fin de desarrollar un biocatalizador con estas características. Se demostró que es posible obtener cristales catalíticos de cloroperoxidasa, los cuales fueron entrecruzados y caracterizados cinéticamente. Los resultados encontrados muestran que la principal ventaja de los cristales sobre la enzima libre es su mayor estabilidad al ser expuestos a solventes orgánicos y altas temperaturas.

Algunas propiedades intrínsecas de la cloroperoxidasa obstaculizaron la obtención de los cristales entrecruzados. Por ejemplo, la inestabilidad de la enzima en condiciones alcalinas, el bajo número de residuos reactivos y la concentración de los mismos en una zona de la superficie de la proteína. Estos problemas fueron parcialmente resueltos al incrementar el número de aminos primarios en las moléculas dentro del cristal, de tal manera que disminuyó la cantidad de entrecruzante necesaria para mantener estable a los cristales. Sin embargo, la actividad específica observada de los cristales entrecruzados es menor que la actividad de la enzima libre. Una de las razones que puede explicar este comportamiento es la modificación con glutaraldehído de algunos residuos cercanos al sitio activo. Posiblemente estas modificaciones afectan la movilidad de la proteína o la funcionalidad del sitio activo. Una estrategia para determinar el número efectivo de sitios activos en un catalizador es la titulación de los mismos. Sin embargo para las peroxidasas no existe un procedimiento similar. A pesar de esto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la menor actividad de los cristales entrecruzados se debe en parte a problemas de accesibilidad de sustratos voluminosos al interior del cristal.

A pesar de que los cristales entrecruzados de cloroperoxidasa son más estables que la enzima libre en presencia de solventes orgánicos y también resisten altas temperaturas, no cumplen con la propiedad de catalizar la transformación de sustratos hidrofóbicos bajo estas condiciones. Probablemente en un medio no polar la partición de un sustrato hidrofóbico hacia un sitio activo polar se ve desfavorecida y por consiguiente la velocidad de la reacción disminuye. Por otra parte, es probable que el

tamaño de los poros internos del cristal impida el acceso de los sustratos de interés. Estas limitaciones podrían superarse aplicando estrategias de ingeniería de solventes e ingeniería de proteínas para controlar la partición desfavorable del sustrato; y analizando el tamaño de los poros internos de cristales obtenidos bajo diferentes condiciones de cristalización, lo cual en ocasiones permite producir diferentes arreglos tridimensionales.

Otras estrategias de entrecruzamiento requieren un mayor conocimiento sobre el arreglo tridimensional de las moléculas dentro del cristal. La difracción de rayos X de estos cristales de cloroperoxidasa puede proveer información sobre la orientación de la proteína en el cristal y la localización de los contactos intermoleculares. Con estos datos sería posible diseñar un entrecruzante bifuncional del tamaño adecuado para formar enlaces covalentes intermoleculares lejos del sitio activo. Por ejemplo, la cloroperoxidasa tiene más de 20 grupos carboxilos distribuidos homogéneamente en su superficie. Es posible que pueda diseñarse una diamina o una mezcla de diaminas con la longitud apropiada para entrecruzar a las moléculas a través de los grupos carboxilos, evitando el bloqueo de los sitios activos o de los poros a través de los cuales difunde el sustrato.

Los resultados de este trabajo sugieren que los cristales entrecruzados de cloroperoxidasa son un biocatalizador potencial para procesos que involucren altas temperaturas, sustratos pequeños de mediana hidrofobicidad y medios de reacción con bajo contenido de solventes orgánicos miscibles en agua.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1 A. Liese y M.V. Filho, Production of fine chemicals using biocatalysis. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 10 (1999) 595-603.
- 2 J.D. Rozzell, Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorg.Med.Chem.*, 7 (1999) 2253-2261.
- 3 W.Gerhartz (ed.), *Enzymes in industry: production and applications*, VCH, Germany, 1990.
- 4 A.L. Demain, Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnol.Adv.*, 18 (2000) 499-514.
- 5 B. Schulze y M.G. Wubbolts, Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 10 (1999) 609-615.
- 6 S.C. Stinson, Chiral Chemistry. *Chem.Eng.News*, May 14 (2001) 45-56.
- 7 R.N. Patel, Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 12 (2001) 587-604.
- 8 K.E. Jaeger, T. Eggert, A. Eipper y M.T. Reetz, Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 55 (2001) 519-530.
- 9 R. Jaenicke, Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J.Biotechnol.*, 79 (2000) 193-203.
- 10 J.S. Dordick, Y.L. Khmelnsky y M.V. Sergeeva, The evolution of biotransformation technologies. *Curr.Opin.Microbiol.*, 1 (1998) 311-318.
- 11 R.E. Feeney, Chemical modification of proteins: comments and perspectives. *Int.J.Peptide Protein Res.*, 29 (1987) 145-161.
- 12 S.S. Wong y L.C. Wong, Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microb.Technol.*, 14 (1992) 866-874.
- 13 D. Kazan, H. Ertan y A. Erarslan, Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 48 (1997) 191-197.
- 14 L. Cao, F. van Rantwijk y R.A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org.Lett.*, 2 (2000) 1361-1364.
- 15 R. Vazquez-Duhalt, P.M. Fedorak y D.W.S. Westlake, Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents. *Enzyme Microb.Technol.*, 14 (1992) 837-841.
- 16 R. Vankatesh y P.V. Sundaram, Modulation of stability properties of bovine trypsin after in vitro structural changes with variety of chemical modifiers. *Protein Engng.*, 11 (1998) 691-698.

- 17 R. Tinoco y R. Vazquez-Duhalt, Chemical modification of cytochrome c improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme Microb. Technol.*, 22 (1998) 8-12.
- 18 G. DeSantis y J.B. Jones, Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 10 (1999) 324-330.
- 19 U.T. Bornscheuer y M. Pohl, Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 5 (2001) 137-143.
- 20 J.L. Harris y C.S. Craig, Engineering enzyme specificity. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 2 (1998) 127-132.
- 21 F.H. Arnold, P.L. Wintrode, K. Miyazaki y A. Gershenson, How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem.Sci.*, 26 (2001) 100-106.
- 22 F.H. Arnold y A.A. Volkov, Directed evolution of biocatalysis. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 3 (1999) 54-59.
- 23 M.F. Chaplin y C. Bucke, *Enzyme Technology*, University of Cambridge, Cambridge, 1990.
- 24 W. Tischer y V. Kasche, Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol.*, 17 (1999) 326-335.
- 25 S.S. Wong, *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993.
- 26 P. Wang, S. Dai, S.D. Waezsada, A.Y. Tsao y B.H. Davison, Enzyme stabilization by covalent binding in nanoporous sol-gel glass for nonaqueous biocatalysis. *Biotechnol.Bioeng.*, 74 (2001) 249-255.
- 27 S.J. Novick and J.S. Dordick, Investigating the effects of polymer chemistry on activity of biocatalytic plastic materials. *Biotechnol.Bioeng.*, 68 (2000) 665-671.
- 28 A.M. Azevedo, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral y L.P. Fonseca, Stability of free and immobilized peroxidase in aqueous-organic solvents mixtures. *J.Mol.Cat.B Enzymatic*, 15 (2001) 147-153.
- 29 L. Dai y A.M. Klibanov, Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 96 (1999) 9475-9478.
- 30 K. Griebenow, M. Vidal, C. Vaez, A.M. Santos y G. Barletta, Nativelike enzyme properties are important for optimum activity in neat organic solvents. *J.Am.Chem.Soc.*, 123 (2001) 5380-5381.
- 31 M. Tuena de Gómez-Poyou y A. Gómez-Poyou, Enzymes in low water systems. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.*, 33 (1998) 53-89.
- 32 S.J. Novick y J.S. Dordick, Protein-containing hydrophobic coatings and films. *Biomaterials*, 23 (2002) 441-448.

- 33 M.D. Lilly, Biotransformations using immobilized biocatalysts: past, present and future. *Adv.Mol.Cell Biol.*, 15A (1996) 141-149.
- 34 G. Bell, P.J. Halling, B.D. Moore, J. Partridge y D.G. Ress, Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends Biotechnol.*, 13 (1995) 468-473.
- 35 P.J. Halling, Biocatalysis in low-water media: understanding effects of reaction conditions. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 4 (2000) 74-80.
- 36 P.A. Fitzpatrick, D. Ringe y A.M. Klibanov, X-ray crystal structure of cross-linked subtilisin Carlsberg in water vs. acetonitrile. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 198 (1994) 675-681.
- 37 Z. Wang, G. Zhu, Q. Huang, M. Qian, M. Shao, Y. Jia y Y. Tang, X-ray studies on cross-linked lysozyme crystals in acetonitrile-water mixture. *Biochim.Biophys.Acta*, 1384 (1998) 335-344.
- 38 A.M. Klibanov, Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol.*, 15 (1997) 97-101.
- 39 A.M. Klibanov, Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409 (2001) 241-246.
- 40 J.A. Rupley y G. Careri, Protein hydration and function. *Adv.Protein Chem.*, 41 (1991) 37-172.
- 41 G. Carrea y S. Riva, Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew.Chem.Int.Ed.*, 39 (2000) 2226-2254.
- 42 Y.L. Khmel'nitsky y J.O. Rich, Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 3 (1999) 47-53.
- 43 M.T. Ru, K.C. Wu, J.P. Lindsay, J.S. Dordick, J.A. Reimer y D.S. Clark, Towards more active biocatalysts in organic media: increasing the activity of salt activated enzymes. *Biotechnol.Bioeng.*, 75 (2001) 187-196.
- 44 Y. Guo y D.S. Clark, Activation of enzymes for nonaqueous biocatalysis by denaturing concentrations of urea. *Biochim.Biophys.Acta*, 1546 (2001) 406-411.
- 45 D. van Unen, J.F.J. Engelsbersen y D.N. Reinhoudt, Why do crown ethers activate enzymes in organic solvents? *Biotechnol.Bioeng.*, 77 (2002) 248-255.
- 46 S. Shubhada y P.V. Sundaram, The role of pH change caused by the addition of water-miscible organic solvents in the destabilization of an enzyme. *Enzyme Microb.Technol.*, 17 (1995) 330-335.
- 47 E. Zacharis, B.D. Morre y P.J. Halling, Control of enzyme activity in organic media by solid-state acid-base buffers. *J.Am.Chem.Soc.*, 119 (1997) 12396-12397.

- 48 E. Zacharis, P.J. Halling y D.G. Rees, Volatile buffers can override the pH memory of subtilisin catalysis in organic media. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 96 (1999) 1201-1205.
- 49 W.H. Bishop and F.M. Richards, Properties of liquids in small pores. *J.Mol.Biol.*, 38 (1968) 315-328.
- 50 B.W. Matthews, Solvent content of protein crystals. *J.Mol.Biol.*, 33 (1968) 491-497.
- 51 L.Z. Vilenchik, J.P. Griffith, N.L. St.Clair, M.A. Navia y A.L. Margolin, Protein crystals as novel microporous materials. *J.Am.Chem.Soc.*, 120 (1998) 4290-4294.
- 52 F.A. Quijochó y F.M. Richards, Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: Carboxipeptidase A. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 52 (1964) 833-839.
- 53 F.A. Quijochó y F.M. Richards, The enzymic behavior of carboxipeptidase A in the solid state. *Biochemistry*, 5 (1966) 4062-4076.
- 54 F.A. Quijochó, W.H. Bishop y F.M. Richards, Effects of changes in some solvent parameters of carboxipeptidase A in solution and in cross-linked crystals. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 57 (1967) 525-537.
- 55 P.J. Kavinsky y N.B. Madsen, Activity of glycogen phosphorylase in the crystalline state. *J.Biol.Chem.*, 251 (1976) 6852-6859.
- 56 G.M. Alter, D.L. Leussing, H. Neurath y B.L. Vallee, Kinetic properties of carboxipeptidase B in solution and crystals. *Biochemistry*, 16 (1977) 3663-3668.
- 57 C.A. Spilburg, J.L. Bethune y B.L. Vallee, Kinetic properties of crystalline enzymes. Carboxipeptidase A. *Biochemistry*, 16 (1977) 1142-1150.
- 58 A. Yonath, A. Sielecki, J. Moulton, A. Podjarny y W. Traub, Crystallographic studies of protein denaturation and renaturation. *Biochemistry*, 16 (1977) 1413-1417.
- 59 M.A. Navia, N.L. St.Clair y J.P. Griffith, Crosslinked enzyme crystals as immobilized enzyme particles. En W.J.J. van den Tweel, A. Harder y R.M. Buitelaar (eds.), *Stability and Stabilization of enzymes.*, Elsevier Science Publishers B.V., Maastricht, The Netherlands, 1992, pp. 63-73.
- 60 M.A. Navia y N.L. St.Clair, Crosslinked enzyme crystals. *U.S.Patent*, 5,618,710 (1997)
- 61 Altus Biologics Inc. (En línea). (<http://www.altus.com>). Último acceso: Mayo 2002.
- 62 A.L. Margolin, Novel crystalline catalysts. *Trends Biotechnol.*, 14 (1996) 223-230.
- 63 T.S. Lee, J.D. Vaghjani, G.J. Lye y M.K. Turner, A systematic approach to the large-scale production of protein crystals. *Enzyme Microb. Technol.*, 26 (2000) 582-592.
- 64 N.L. St.Clair y M.A. Navia, Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J.Am.Chem.Soc.*, 114 (1992) 7314-7316.

- 65 R.A. Persichetti, N.L. St.Clair, J.P. Griffith, M.A. Navia y A.L. Margolin, Cross-linked enzyme crystals (CLEC) of thermolysin in the synthesis of peptides. *J.Am.Chem.Soc.*, 117 (1995) 2732-2737.
- 66 J.J. Lalonde, C. Govardhan, N. Khalaf, A.G. Martinez, K. Visuri y A.L. Margolin, Cross-linked crystals of *Candida rugosa* lipase: highly efficient catalysts for the resolution of chiral esters. *J.Am.Chem.Soc.*, 117 (1995) 6845-6852.
- 67 N. Khalaf, C. Govardhan, J.J. Lalonde, R.A. Persichetti, Y. Wang y A.L. Margolin, Cross-linked enzyme crystals as highly active catalysts in organic solvents. *J.Am.Chem.Soc.*, 118 (1996) 5494-5495.
- 68 Y. Wang, K. Yakovlevsky y A.L. Margolin, An efficient synthesis of chiral amino acid and peptide alkylamides via CLEC-subtilisin catalyzed coupling and *in situ* resolution. *Tetrahedron Lett.*, 37 (1996) 5317-5320.
- 69 N.L. St.Clair, Y. Wang y A.L. Margolin, Cofactor-bound cross-linked enzyme crystals (CLEC) of alcohol dehydrogenase. *Angew.Chem.Int.Ed.*, 39 (2000) 380-383.
- 70 D. Costes, E. Wehtje y P. Adlercreutz, Cross-linked crystals of hydroxynitrile lyase as catalyst for the synthesis of optically active cyanohydrins. *J.Mol.Cat.B Enzymatic*, 11 (2001) 607-612.
- 71 T.S. Lee, M.K. Turner y G.J. Lye, Mechanical stability of immobilized biocatalysts (CLECs) in dilute agitated suspensions. *Biotechnol.Prog.*, (2001)
- 72 P. Pepin y R. Lortie, Influence of water activity on the enantioselective esterification of (R,S)-ibuprofen by crosslinked crystals of *Candida antarctica* lipase B in organic solvent media. *Biotechnol.Bioeng.*, 75 (2001) 559-562.
- 73 A.M. Collins, C. Maslin y R.J. Davies, Scale-up of a chiral resolution using cross-linked enzyme crystals. *Org.Proc.Res.Dev.*, 2 (1998) 400-406.
- 74 D. Haring y P. Schreier, Cross-linked enzyme crystals. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 3 (1999) 35-38.
- 75 F.C.G. Hoskin, J.E. Walker y R. Stote, Degradation of nerve gases by CLECS and cells: kinetics of heterogenous systems. *Chem.Biol.Interact.*, 119-120 (1999) 439-444.
- 76 N.L. St.Clair, B. Shenoy, L.D. Jacob y A.L. Margolin, Cross-linked protein crystals for vaccine delivery. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 96 (1999) 9469-9474.
- 77 C. Govardhan, Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 10 (1999) 331-335.
- 78 F. Secundo, S. Spadaro, G. Carrea y P.L.A. Overbeeke, Optimization of *Pseudomonas cepacia* lipase preparations for catalysis in organic solvents. *Biotechnol.Bioeng.*, 62 (1999) 554-561.

- 79 K. Xu y A.M. Klibanov, pH control of the catalytic activity of cross-linked enzyme crystals in organic solvents. *J.Am.Chem.Soc.*, 118 (1996) 9815-9819.
- 80 J. Partridge, G.A. Hutcheon, B.D. Morre y P.J. Halling, Exploiting hydration hysteresis for high activity of cross-linked subtilisin crystals in acetonitrile. *J.Am.Chem.Soc.*, 118 (1996) 12873-12877.
- 81 J.L. Schmitke, C.R. Wescott y A.M. Klibanov, The mechanistic dissection of the plunge in enzymatic activity upon transition from water to anhydrous solvents. *J.Am.Chem.Soc.*, 118 (1996) 3360-3365.
- 82 S.K. Chapman, S. Daff y A.W. Munro, Heme: the most versatile redox centre in biology? En *Structure and Bonding*, Vo. 88, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1997, pp. 39-70.
- 83 K.G. Welinder, Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Topics in Structural Biology*, 2 (1992) 388-393.
- 84 F. van de Velde, F. van Rantwijk y R.A. Sheldon, Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. *Trends Biotechnol.*, 19 (2001) 73-80.
- 85 M.C.R. Franssen y H.C. van der Plas, Haloperoxidases: their properties and their use in organic synthesis. En S.L. Neidleman y A.I. Laskin (eds.), *Advances in Applied Microbiology Vol. 37*, Academic Press, Inc., 1992,
- 86 M.C.R. Franssen, Halogenation and oxidation reactions with haloperoxidases. *Biocatal.*, 10 (1994) 87-111.
- 87 J. Littlechild, Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 3 (1999) 28-34.
- 88 A.T. Smith y N.C. Veitch, Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 2 (1998) 269-278.
- 89 A. Conesa, P.J. Punt y C.A.M.J.J. van den Hondel, Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J.Biotechnol.*, 93 (2002) 143-158.
- 90 M.A. Pickard, A defined growth medium for the production of chloroperoxidase by *Caldariomyces fumago*. *Can.J.Microbiol.*, 27 (1981) 1298-1305.
- 91 M.A. Pickard y A. Hashimoto, Isoenzymes of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Can.J.Microbiol.*, 28 (1982) 1382-1388.
- 92 M.A. Pickard y A. Hashimoto, Stability and carbohydrate composition of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in a fructose-salts medium. *Can.J.Microbiol.*, 34 (1988) 998-1002.
- 93 M. Sundaramoorthy, J. Turner y T.L. Poulos, The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure*, 3 (1995) 1367-1377.

- 94 K.A. Beckwith, R. Clark y L.P. Hager, VII. Studies on the biosynthesis of caldariomycin. *J.Biol.Chem.*, 238 (1963) 3086-3090.
- 95 S.L. Neidleman y J. Geigert, *Biohalogenation. Principles, basic roles and applications.*, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 1986.
- 96 J.A. Thomas, D.R. Morris y L.P. Hager, Chloroperoxidase VII: classical peroxidatic, catalatic and halogenating forms of the enzyme. *J.Biol.Chem.*, 245 (1970) 3129-3134.
- 97 J. Everse, The structure of heme proteins Compound I and II: some misconceptions. *Free Rad.Biol.Med.*, 24 (1998) 1338-1346.
- 98 K. Murali y L.P. Hager, Utilization of peroxide and its relevance in oxygen insertion reactions catalyzed by chloroperoxidase. *Biochim.Biophys.Acta*, 1547 (2001) 408-417.
- 99 H. Yamada, N. Itoh y Y. Izumi, Chloroperoxidase-catalyzed halogenation of *trans*-cinnamic acid and its derivatives. *J.Biol.Chem.*, 260 (1985) 11962-11969.
- 100 P.A. Cohen y G.H.N. Towers, Chlorination of anthraquinones by lichen and fungal enzymes. *Phytochemistry*, 44 (1997) 271-274.
- 101 I. Malnar y C.J. Sih, Chloroperoxidase-catalyzed chlorination of didechloroaglucovancomycin and vancomycin. *J.Mol.Cat.B Enzymatic*, 10 (2000) 545-549.
- 102 H.B. Dunford, A.M. Lambeir, M.A. Kashem y M.A. Pickard, On the mechanism of chlorination by chloroperoxidase. *Arch.Biochem.Biophys.*, 252 (1987) 292-302.
- 103 H.B. Dunford, Peroxidase-catalyzed halide ion oxidation. *Redox Rep*, 5 (2001) 169-171.
- 104 R.D. Libby, A.L. Shedd, A.K. Phipps, T.M. Beachy y S.M. Gerstberger, Defining the involvement of HOCl or Cl₂ as enzyme-generated intermediates in chloroperoxidase-catalyzed reactions. *J.Biol.Chem.*, 267 (1992) 1769-1775.
- 105 D.R. Libby, T.M. Beachy y A.K. Phipps, Quantitating direct chlorine transfer from enzyme to substrate in chloroperoxidase-catalyzed reactions. *J.Biol.Chem.*, 271 (1996) 21820-21827.
- 106 H. Wagenknecht y W. Woggon, Identification of intermediates in the catalytic cycle of chloroperoxidase. *Chem.Biol.*, 4 (1997) 367-372.
- 107 M.P.J. van Deurzen, F. van Rantwijk y R.A. Sheldon, Selective oxidations catalyzed by peroxidases. *Tetrahedron*, 53 (1997) 13183-13220.
- 108 S. Colonna, N. Gaggero, C. Richelmi y P. Pasta, Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *Trends Biotechnol.*, 17 (1999) 163-168.

- 109 L.P. Hager, F.J. Lakner y A. Basavapathruni, Chiral synthons via chloroperoxidase catalysis. *J.Mol.Cat.B Enzymatic*, 5 (1998) 95-101.
- 110 F.J. Marquez-Rocha, Y. Pica-Granados, A.M. Sandoval-Villasana y R. Vazquez-Duhalt, Determination of genotoxicity using chloroperoxidase-mediated model of PAH-DNA adduct formation. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.*, 59 (1997) 788-795.
- 111 P.M. Fedorak, K.M. Semple, R. Vazquez-Duhalt y D.W.S. Westlake, Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb. Technol.*, 15 (1993) 429-437.
- 112 L. Banci, Structural properties of peroxidases. *J.Biotechnol.*, 53 (1997) 253-263.
- 113 J.H. Dawson y M. Sono, Cytochrome P450 and chloroperoxidase: thiolate-ligated heme enzymes. Spectroscopic determination on their active site structures and mechanistic implications of thiolate ligation. *Chem.Rev.*, 87 (1987) 1255-1276.
- 114 M. Yi, M. Mroczko, K.M. Manoj, X. Wang y L.P. Hager, Replacement of the proximal heme thiolate ligand in chloroperoxidase with a histidine residue. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 96 (1999) 12412-12417.
- 115 A. Conesa, F. van de Velde, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, C.A.M.J.J. van den Hondel y P.J. Punt, Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *J.Biol.Chem.*, 276 (2001) 17635-17640.
- 116 M. Sundaramoorthy, J. Terner y T.L. Poulos, Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies. *Chem.Biol.*, 5 (1998) 461-473.
- 117 P.R. Ortiz de Montellano, Catalytic sites of hemoprotein peroxidases. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 32 (1992) 89-107.
- 118 S.L. Newmyer y P.R. Ortiz de Montellano, Horseradish peroxidase His42-Ala, His42-Val and Phe41-Ala mutants. *J.Biol.Chem.*, 270 (1995) 19430-19438.
- 119 V.M. Samokyszyn y P.R. Ortiz de Montellano, Topology of the chloroperoxidase active site: regiospecificity of heme modification by phenylhydrazine and sodium azide. *Biochemistry*, 30 (1991) 11646-11653.
- 120 M.P.J. van Deurzen, *Selective oxidations catalyzed by chloroperoxidase*, Delft University of Technology, Delft, 1996, PhD Thesis.
- 121 B. Valderrama, M. Ayala y R. Vazquez-Duhalt, Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem.Biol.*, 9 (2002) 555-565.
- 122 K. Seelbach, M.P.J. van Deurzen, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon y U. Kragl, Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed oxidation. *Biotechnol.Bioeng.*, 55 (1997) 283-288.

- 123 L. Stephan, W. Christian, S. Eberhard, L. Andreas, Verfahren zur enzymatischen oxidation van substraten mit H₂O₂. Patente alemana DE10054082 A, 16 de mayo, 2002.
- 124 F. van de Velde, N.D. Lourenco, M. Bakker, F. van Rantwijk y R.A. Sheldon, Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase. *Biotechnol.Bioeng.*, 69 (2000) 286-291.
- 125 F. van de Velde, M. Bakker, F. van Rantwijk, G.P. Raj, L.P. Hager y R.A. Sheldon, Engineering chloroperoxidase for activity and stability. *J.Mol.Cat.B Enzymatic*, 11 (2001) 765-769.
- 126 T.A. Kadima y M.A. Pickard, Immobilization of chloroperoxidase on aminopropyl-glass. *Appl.Environ.Microbiol.*, 56 (1990) 3473-3477.
- 127 S. Aoun, C. Chebli y M. Baboulene, Noncovalent immobilization of chloroperoxidase onto talc: catalytic properties of a new biocatalyst. *Enzyme Microb.Technol.*, 23 (1998) 380-385.
- 128 M. Andersson, B.K. Samra, H. Holmberg y P. Adlercreutz, Use of celite-immobilised chloroperoxidase in predominantly organic media. *Biocatal.Biotrans.*, 17 (1999) 293-303.
- 129 M. Bakker, F. van de Velde, F. van Rantwijk y R.A. Sheldon, Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams. *Biotechnol.Bioeng.*, 70 (2000) 342-348.
- 130 F. van de Velde, M. Bakker, F. van Rantwijk y R.A. Sheldon, Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidations in hydrophobic organic media. *Biotechnol.Bioeng.*, 72 (2001) 523-529.
- 131 B.L. McFarland, Biodesulfurization. *Curr.Opin.Microbiol.*, 2 (1999) 257-264.
- 132 D.J. Monticello, Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 11 (2000) 540-546.
- 133 K. Yazu, Y. Yamamoto, T. Furuya, K. Miki y K. Ukegawa, Oxidation of dibenzothiophenes in an organic biphasic system and its application to oxidative desulfurization of light oil. *Biotechnol.Prog.*, (2002)
- 134 A.M. Aitani, M.F. Ali y H.H. Al-Ali, A review of non-conventional methods for the desulfurization of residual fuel oil. *Petroleum Science and Technology*, 18 (2000) 537-553.
- 135 K.A. Gray, O.S. Pogrebinsky, G.T. Mrachko, L. Xi, D.J. Monticello y C.H. Squires, Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nature Biotechnol.*, 14 (1996) 1705-1709.
- 136 M.J. Grossman, M.K. Lee, R.C. Prince, K.K. Garrett, G.N. George y I.J. Pickering, Microbial desulfurization of a crude oil middle-distillate fraction: analysis of the

- extent of sulfur removal on remaining sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (1999) 181-188.
- 137 L. Linguist y M. Pachecho, Enzyme-based diesel desulfurization process offers energy, CO₂ advantages. *Oil and Gas Journal*, February 22 (1999) 46-48.
- 138 Y. Izumi y T. Ohshiro, Purification and characterization of enzymes involved in desulfurization of dibenzothiophene in fossil fuels. *J. Mol. Cat. B Enzymatic*, 11 (2001) 1061-1064.
- 139 L. Casella, M. Gullotti, R. Ghezzi, S. Poli, T. Beringhelli, S. Colonna y G. Carrea, Mechanism of enantioselective oxygenation of sulfides catalyzed by chloroperoxidase and horseradish peroxidase. Spectral studies and characterization of enzyme-substrate complexes. *Biochemistry*, 31 (1992) 9451-9459.
- 140 S. Colonna, N. Gaggero, L. Casella, G. Carrea y P. Pasta, Chloroperoxidase and hydrogen peroxide: an efficient system for enzymatic enantioselective sulfoxidations. *Tetrahedron: Asymm.*, 3 (1992) 95-106.
- 141 P. Pasta, G. Carrea, E. Monzani, N. Gaggero y S. Colonna, Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidation of methyl phenyl sulfide with dihydroxyfumaric acid/oxygen or ascorbic acid/oxygen as oxidants. *Biotechnol. Bioeng.*, 62 (1999) 489-493.
- 142 M.A. Pickard, T.A. Kadima y R.D. Carmichael, Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. *J. Ind. Microbiol.*, 7 (1991) 235-242.
- 143 D.R. Morris y L.P. Hager, Chloroperoxidase I: Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 1763-1768.
- 144 R.D. Libby, N.S. Rotberg, J.T. Emerson, T.C. White, G.M. Yen, S.H. Friedman, N.S. Sun y R. Goldowski, The chloride-activated peroxidation of catechol as a mechanistic probe of chloroperoxidase reactions. *J. Biol. Chem.*, 264 (1989) 15284-15292.
- 145 P.F. Hollenberg y L.P. Hager, Purification of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Methods Enzymol.*, 52 (1978) 521-529.
- 146 M.B. Arnao, M. Acosta, J.A. del Río, R. Varón y F. García-Cánovas, A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*. 1041 (1990) 43-47.
- 147 J.R. Benson y P.E. Hare, *o*-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72 (1975) 619-622.
- 148 O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.

- 149 R. Vazquez-Duhalt, D.W.S. Westlake y P.M. Fedorak, Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (1994) 459-466.
- 150 A. Tuynman, M.K.S. Vink, H.L. Dekker, H.E. Schemaker y R. Wever, The sulphoxidation of thianisole catalysed by lactoperoxidase and *Coprinus cinereus* peroxidase: evidence for an oxygen-rebound mechanism. *Eur. J. Biochem.*, 258 (1998) 906-913.
- 151 S. Kobayashi, M. Nakano, T. Kimura y A.P. Schaap, On the mechanism of the peroxidase-catalyzed oxygen transfer reaction. *Biochemistry*, 26 (1987) 5019-5022.
- 152 M. Ortiz-Leon, L. Velasco y R. Vazquez-Duhalt, Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by hemoglobin and hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215 (1995) 968-973.
- 153 R. Vazquez-Duhalt, Cytochrome c as a biocatalyst. *J. Mol. Cat. B Enzymatic*, 7 (1999) 241-249.
- 154 M. Ayala, R. Tinoco, V. Hernandez, P. Bremauntz y R. Vazquez-Duhalt, Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel Process. Technol.*, 57 (1998) 101-111.
- 155 Ion energetics data. Mallard, W. G. y Linstrom, P. J. *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69* (En línea). 1998. National Institute of Standards and Technology (<http://webbook.nist.gov>) Ultimo acceso: Mayo 2002.
- 156 B.W. Bogan y R.T. Lamar, One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (1995) 2631-2635.
- 157 M. Ayala, N.R. Robledo, A. Lopez-Munguia y R. Vazquez-Duhalt, Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase-catalyzed oxidation of diesel fuel. *Environ. Sci. Technol.*, 34 (2000) 2804-2809.
- 158 B.W. Bogan, R.T. Lamar y K.E. Hammel, Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (1996) 1788-1792.
- 159 R. Vazquez-Duhalt, M. Ayala y F.J. Marquez-Rocha, Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago*. *Phytochemistry*, 58 (2001) 929-933.
- 160 M.J. Axley, P. Kenigsberg y L.P. Hager, Fructose induces and glucose represses chloroperoxidase mRNA levels. *J. Biol. Chem.*, 261 (1986) 15058-15061.
- 161 P.C. Weber, Overview of protein crystallization methods. *Methods Enzymol.*, 276 (1997) 13-22.

- 162 A. Ducruix y R. Giegé (eds.), *Crystallization of Nucleic Acids and proteins. A practical approach*, Oxford University Press, 1992.
- 163 D.R. Walt y V.I. Agayn, The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends Anal.Chem.*, 13 (1994) 425-430.
- 164 P. Monsan, Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. *J.Mol.Cat.*, 3 (1978) 371-384.
- 165 F.M. Richards y J.R. Knowles, Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. *J.Mol.Biol.*, 37 (1968) 231-233.
- 171 A.M. Lambeir y H.B. Dunford, A kinetic and spectral study of the alkaline transitions of chloroperoxidase. *Arch.Biochem.Biophys.*, 220 (1983) 549-556.
- 172 M. Ayala, E. Horjales, M.A. Pickard y R. Vázquez-Duhalt, Cross-linked crystals of chloroperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295 (2002) 828-831.
- 168 B. Shenoy, Y. Wang, W. Shan y A.L. Margolin, Stability of crystalline proteins. *Biotechnol.Bioeng.*, 73 (2001) 358-369.
- 169 M.S. Doscher y F.M. Richards, The activity of an enzyme in the crystalline state: Ribonuclease S. *J.Biol.Chem.*, 238 (1963) 2399-2406.
- 170 M.W. Makinen y A.L. Fink, Reactivity and cryoenzymology of enzymes in the crystalline state. *Ann.Rev.Biophys.Bioeng*, 6 (1977) 301-343.
- 171 E. Torres, R. Tinoco y R. Vazquez-Duhalt, Solvent hydrophobicity predicts biocatalytic behaviour of lignin peroxidase and cytochrome *c* in aqueous solution of water-miscible organic solvents. *J. Biotechnol*, 49 (1996) 59-67.
- 172 E. Torres, B. Siminovich, E. Barzana y R. Vazquez-Duhalt, Thermodynamic hydrophobicity of aqueous mixtures of water-miscible organic solvents predicts peroxidase activity. *J.Mol.Cat.B Enzymatic*, 4 (1998) 155-159.
- 173 M.P.J. van Deurzen, I.J. Remkes, F. van Rantwijk y R.A. Sheldon, Chloroperoxidase catalyzed oxidations in *tert*-butyl alcohol/water mixtures. *J.Mol.Cat.A Chemical*, 117 (1997) 329-337.

7. APÉNDICES



ELSEVIER

Fuel Processing Technology 57 (1998) 101–111

FUEL
PROCESSING
TECHNOLOGY

Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization

Marcela Ayala ^a, Raunel Tinoco ^a, Veronica Hernandez ^a,
Pilar Bremauntz ^b, Rafael Vazquez-Duhalt ^{a,*}

^a Instituto de Biotecnología, UNAM. Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62250 Mexico

^b Instituto Mexicano del Petróleo, Mexico

Received 26 November 1997; revised 23 July 1998; accepted 23 July 1998

Abstract

A biotechnological method for fuel desulfurization is described. The method includes the steps of biocatalytic oxidation of organosulfides and thiophenes, contained in the fuel, with hemo-proteins to form sulfoxides and sulfones, followed by a distillation step in which these oxidized compounds are removed from the fuel. Straight-run diesel fuel containing 1.6% sulfur was biocatalytically oxidized with chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in the presence of 0.25 mM hydrogen peroxide. The reaction was carried out at room temperature and the organosulfur compounds were effectively transformed to their respective sulfoxides and sulfones which were then removed by distillation. The resulting fraction after distillation contained only 0.27% sulfur. Biocatalytic oxidation of fuels appears as an interesting alternative to biodesulfurization. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Biocatalytic oxidation; Fuel; Biodesulfurization

1. Introduction

The use of fossil fuels for power generation and in the petrochemical industry is expected to increase in the first decades of the next century. The demand for low-sulfur fossil fuels has been intensified by the increasing regulatory standards for reduced levels of sulfur-oxides in atmospheric emissions, by the decline of easily accessible sources of conventional and light crude oils, and by the high cost of physicochemical processes of

* Corresponding author. Tel.: +52-5-6227600; fax: +52-73-172388; e-mail: vazqduh@ibt.unam.mx

hydrodesulfurization (HDS). It can be estimated that in the next decades 30% of oil should be desulfurized.

The use of microorganisms for the biodesulfurization of high sulfur coals and oil has been proposed as an interesting alternative for the reduction of the organosulfur content of fossil fuels [1–3]. The number of laboratories involved in biodesulfurization research is rising rapidly. Different strains of aerobic microorganisms have been reported to non-selectively remove sulfur by a naphthalene degradative pathway, such as in *Pseudomonas* sp. [4,5] and *Arthrobacter* sp. [6,7].

Selective sulfur removal has also been reported by a pathway involving the conversion of dibenzothiophene (DBT) to 2-hydroxybiphenyl (2-HBP) and sulfate, as in the case of *Corynebacterium* sp. [8], *Rhodococcus erythropolis* [9–12], and *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 [3,13]. *Rhodococcus* strain IGTS8 has, doubtless, been the most extensively studied and it is the basis of the commercial biodesulfurization program of Energy Biosystems [14]. In addition to DBT, this strain is able to metabolize other thiophenes, sulfides, thianthrene, sulfoxides and sulfones [13], and also to carry out a selective desulfurization of sterically hindered analogs of DBT [7]. Identification, cloning, characterization and overexpression of the genes involved in the specific desulfurization have been completed [15–19]. The plasmid-encoded pathway includes three genes, *sox* ABC, arranged in an operon residing in a 4 kb-region. These genes are responsible for the transformation of DBT to 2-HBP and sulfate. The *soxA*, *soxB*, and *soxC* genes encode for proteins with predicted molecular masses of 49.5, 38.9, and 45.1 kDa, respectively. The oxidation of DBT to DBT sulfone has been linked to the enzyme encoded by the *soxC* gene. This enzyme has been recently characterized as sulfite/sulfoxide monooxygenase [18] and requires reduced flavin mononucleotide for activity.

Most of the microbial biodesulfurization studies have focused on the aerobic conversion of DBT, coal or fuels. Nevertheless, reductive desulfurization of fossil fuels is an idea proposed more than 25 years ago by Denis-Larose et al. [19]. Mixed cultures containing sulfate-reducing bacteria (SRB) desulfurized a variety of model compounds, including thiophenes [20], organosulfides [20,21] and petroleum preparations [22]. Reductive desulfurization of DBT to form hydrogen sulfide and biphenyl has been achieved by several species of SRB that are able to grow using DBT as sole source of sulfur and sole electron acceptor [23–26]. Hydrogen gas is the normal source of reducing equivalent, however, electrochemically generated reducing equivalents can be incorporated into the normal electron transport system of SRB [23]. This dissimilatory anaerobic process for sulfur removal would accumulate no wasteful biomass nor introduce oxygen into the sulfur containing molecule or potential fuel. *Desulfovibrio desulfuricans* M6 is the best organism found so far in the anaerobic desulfurization [27].

Microbial desulfurization of petroleum derivatives has two main problems: Microbial activity is carry out in aqueous phase, thus a two phase system reactor with the intrinsic mass transfer limitations would be needed to metabolize the hydrophobic substrate. On the other hand, the microbial biocatalyst must have a broad substrate specificity for the various organosulfur compounds present in oil.

These problems could be addressed by using broad specificity enzymes instead of whole microorganisms. Enzymes are able to perform catalytic reactions in organic

solvents [28], in which the mass transfer limitations are reduced. The solvent could be the fuel itself. Under anhydrous conditions or at very low water activity, enzymes are generally more thermostable, and reactions could be performed at temperatures higher than 100°C [29]. Biocatalytic modification of complex mixtures from petroleum, such as asphaltenes, have been performed in organic solvents [30]. Several enzymes have the ability to oxidize thiophenes and organosulfur compounds *in vitro*; cytochromes *P450* [31–37], lignin peroxidase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* [38,39], lactoperoxidase [40,41], chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* [37,38,41–44], and horseradish peroxidase [37,40–42]. Non enzymatic hemoproteins are also able to perform the DBT oxidation *in vitro*, such as hemoglobin [37,45,46], cytochrome *c* [45,47,48], and microperoxidase [49,50]. All the proteins mentioned above are hemoproteins, and in all cases the products of the biocatalytic oxidations are the respective sulfoxides.

In this work, the biocatalytic oxidation of organosulfur compounds which are contained in a diesel fuel, followed by a distillation that removes the oxidized compounds is shown as a two-steps alternative process for fuel desulfurization. The possibility of using a biocatalytic process in non-aqueous systems for the desulfurization of fuels is discussed.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Purified chloroperoxidase from *C. fumago* was a gift from Dr. M.A. Pickard from the University of Alberta, Canada. Horse heart cytochrome *c* was obtained from Sigma (St. Louis, MO). Poly(ethylene glycol)-modified cytochrome *c* (PEG-Cyt) was prepared as previously reported [48] by using activated PEG with cyanuric chloride. Hydrogen peroxide and buffer salts were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). Dibenzothiophene, thianthrene, phenyl sulfide, phenyl disulfide, benzothiophene, ethyl phenyl sulfide, and bithiophene were obtained from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI), and HPLC-grade organic solvents from Fisher Scientific (Springfield, NJ). Desulfurized diesel fuel and primary diesel fuel were obtained from Petroleos Mexicanos, PEMEX.

2.2. Biocatalytic reactions with diesel

Diesel fuel oxidations with chloroperoxidase were carried out in a 10-ml reaction mixture containing 2 µg of diesel fuel and 20 mM KCl in a 20% acetonitrile-60 mM acetate buffer pH 3.0. The reaction mixture contained 2.3 nmol of chloroperoxidase and the reaction was started by adding 0.25 mM of hydrogen peroxide. Reactions with cytochrome *c* (8 nmol) were performed in 20% acetonitrile-60 mM phosphate buffer pH 6.1 in the presence of 1 mM hydrogen peroxide. After a 1 h reaction, the mixture was acidified with nitric acid to pH 2, and extracted three times with 2 ml of methylene

chloride. The organic extract was reduced under vacuum, and analyzed by gas chromatography.

2.3. Biocatalytic oxidations of organosulfur compounds

Organosulfur compounds reactions with chloroperoxidase were performed in a 15% acetonitrile, 20 mM KCl, 60 mM acetate buffer pH 3.0, 1-ml reaction mixture, containing 20 μ M substrate and from 0.2 to 5 nM of enzyme. Reactions were started by adding 1 mM of hydrogen peroxide and the disappearance of the substrate was monitored by HPLC after 10 min reaction. For products identification, 10-ml reactions were carried out. After 1 h reaction, the mixture was then acidified, extracted with methylene chloride and the extract reduced under nitrogen, before being analyzed by GC-MS.

2.4. Kinetic and inactivation constants determination

The kinetic constants for the oxidation of thianthrene with chloroperoxidase were estimated in 1-ml reaction mixture containing 15% acetonitrile and 20 mM KCl in a 60 mM acetate buffer pH 3.0, and with 1.5 nM of enzyme. The reaction was monitored spectrophotometrically by following the decreasing absorbance of thianthrene at 254 nm ($\epsilon = 35 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The specific activity is defined as the number of mol of substrate transformed by 1 mol of enzyme per minute. The inactivation of chloroperoxidase by hydrogen peroxide was measured by incubating 5 pmol of enzyme in a 1-ml mixture containing 20 mM KCl, 60 mM acetate buffer pH 3.0 and different concentrations of hydrogen peroxide, for different periods of time. The reaction was started by adding 0.1 mM of monochlorodimedon (MCD) and the reaction was monitored by the decreasing absorbance of the substrate at 278 nm ($\epsilon = 12.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.5. Analytical procedures

Gas chromatography was carried out in a Hewlett-Packard GC chromatograph (model 5890 plus) coupled to two detectors: flame ionization (FID) and flame photometric (FPD) detectors. The GC was equipped with a 30 m \times 0.25 mm SPB-20 column (Supelco), and the temperature program started at 90°C for 2 min, then raised to 300°C at 8°C/min, and held for 10 min. Product identification was performed in a Hewlett-Packard GC (model 6890)-MS (model 5972), with a 30 m \times 0.25 mm SPB-20 column (Supelco). Infrared (IR) analyses were performed in a Fourier Transform Spectrophotometer (Beckman FT 220) at the Faculty of Chemistry of the Morelos State University. UV-Vis measurements were made in a Beckman Spectrophotometer (DU 530). Samples were analyzed by HPLC using a Perkin Elmer (series 200) system, with a Hypersyl 5 μ m (100 \times 2.1 mm) Hewlett-Packard column, eluting with an acetonitrile–water phase.

Microdistillations were carried out according to the standard test for boiling range distribution of petroleum fractions by gas chromatography, ASTM D 2887-89. Organic sulfur determinations on diesel fuel were carried out by X-ray fluorimetry in a Horiba X-ray fluorimeter.

3. Results and discussion

Desulfurized diesel fuel (< 0.05% of sulfur) was enriched with 10 g l^{-1} of DBT and treated with poly(ethylene)glycol-modified cytochrome *c* (PEG-Cyt) and hydrogen peroxide. The gas chromatogram shows (Fig. 1) that the DBT is transformed to DBT sulfoxide, while the hydrocarbons seem to be not affected. DBT sulfoxide is an unstable compound which may be oxidized to form DBT sulfone. Cytochrome *c* is a biocatalyst able to oxidize thiophenes and organosulfides [47] and has several advantages when compared with other hemoenzymes. It is active in a pH range from 2 to 11, has the heme prosthetic group covalently bound, exhibiting activity at high concentrations of organic solvents, and is not expensive [47,48]. In addition, this biocatalyst can be modified by site-directed mutagenesis [51] and by chemical modification [52] to improve both its catalytic activity and range of substrates. PEG-modified enzymes are soluble in

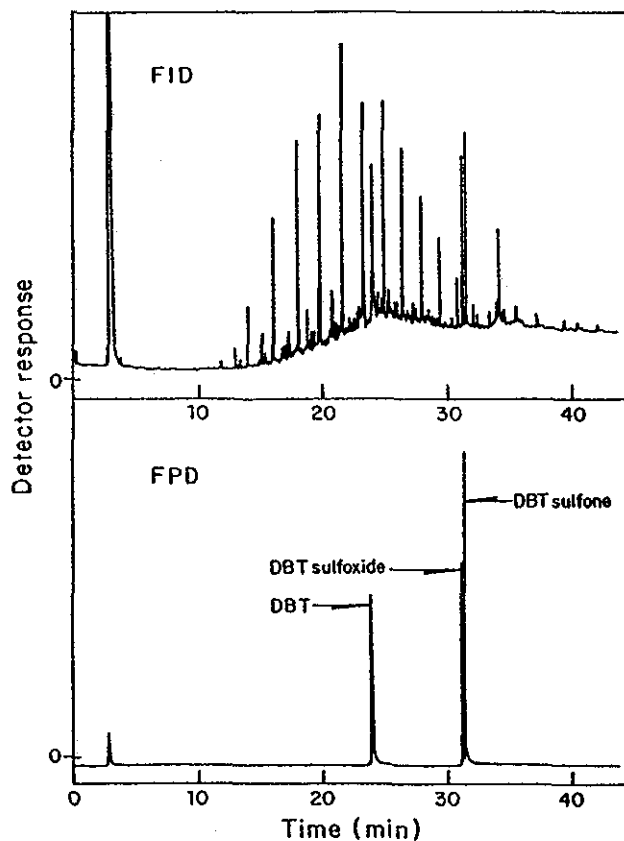


Fig. 1. Gas chromatograms of desulfurized diesel fuel, enriched with dibenzothiophene, after biocatalytic treatment with poly(ethylene)glycol-modified cytochrome *c*. FID, Flame ionization detector (general detector). FPD, Flame photometric detector (sulfur selective detector).

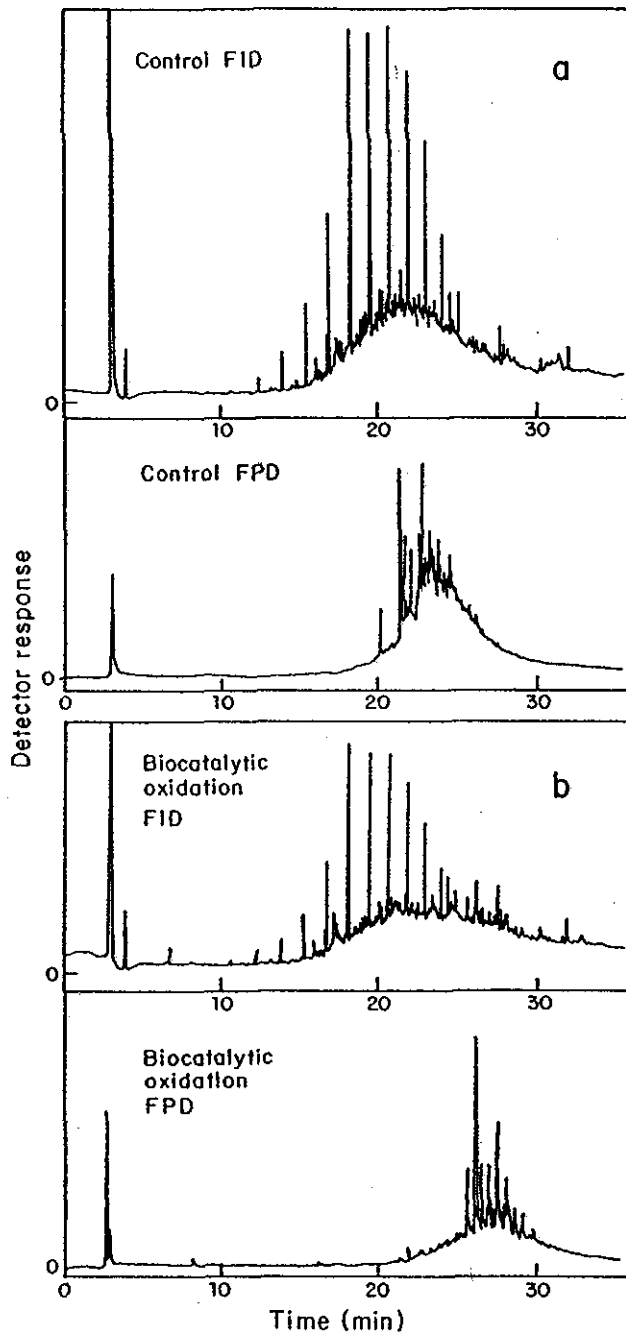


Fig. 2. Gas chromatograms of primary diesel fuel (a) before and (b) after biocatalytic treatment with chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. FID, Flame ionization detector (general detector). FPD, Flame photometric detector (sulfur selective detector).

Table 1
Specific activity of the oxidation of pure organosulfur compounds with chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*

Organosulfur compound	Specific activity (min ⁻¹)
Ethyl phenyl sulfide	1725 (±145)
Thianthrene	1310 (±132)
Bithiophene	840 (±8)
Phenyl sulfide	831 (±32)
Benzothiophene	557 (±42)
Phenyl disulfide	352 (±10)
Dibenzothiophene	126 (±9)

Standard deviations, in parentheses, were calculated from three independent replicates.

organic solvents and their activity in organic solvents is increased because of the reduction of mass transfer limitations in the system [53].

Straight-run diesel fuel, obtained from primary distillation and containing 1.6% sulfur, was tested for oxidation with PEG-Cyt. Using this authentic diesel fuel, the modified cytochrome *c* was able to oxidize most of the organosulfur compounds it contained. The oxidation was detected by the increase of boiling point (retention time) of these compounds on the gas chromatogram monitored with a Flame Photometric Detector (FPD), which is a sulfur selective detector. However, PEG-Cyt was not able to oxidize all of the organosulfur compound because some of them remained unchanged in the FPD chromatogram. This could be due to the fact that some of the organosulfur compounds found in the straight-run diesel fuel could be sterically hindered and do not bind with the active site. This has been observed in the oxidation of model compounds by cytochrome *c* [47].

With the aim of increasing the biocatalytic oxidation of sulfur compounds, chloroperoxidase from the imperfect fungus *C. fumago* was tested on primary diesel fuel. Fig. 2 shows that most of the organosulfur compounds in the primary diesel fuel were significantly oxidized and a considerable increase of the boiling points of all the sulfur compounds was found. Chloroperoxidase has been shown to be more active than other

Table 2
Mass spectral data of products from enzymatic oxidation of some organosulfur compounds with chloroperoxidase

Substrate	Product	Mass spectral ions (m/z)
Phenyl sulfide	Phenyl sulfone	218(27) [M ⁺], 125(100), 97(26), 77(53), 51(47), 50(16)
Dibenzothiophene	Dibenzothiophene sulfone	216(100) [M ⁺], 187(46), 160(31), 150(16), 139(30)
Thianthrene	5-thianthrene oxide	232(16) [M ⁺], 184(100), 171(15), 139(14), 69(14)
	5,10-thianthrene dioxide	248(77) [M ⁺], 200(86), 184(84), 171(100), 168(23), 139(30), 108(24), 69(36)

Values in parentheses are relative abundances.
[M⁺], molecular ion.

Table 3
Kinetic constants of chloroperoxidase in the oxidation of thianthrene with hydrogen peroxide^a

k_{cat} (s^{-1})	Thianthrene		Hydrogen peroxide	
	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
64	1.45	44.2	133	0.482

^a Kinetic constants for hydrogen peroxide with a thianthrene saturating concentration of 20 μM , and for thianthrene with a hydrogen peroxide saturating concentration of 1 mM.

peroxidases, including lignin peroxidase from *P. chrysosporium*, in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons [54].

In order to know the kinetic properties of chloroperoxidase with organosulfur compounds and the chemical nature of products, enzymatic oxidations were performed in media containing pure substrates, such as thiophenes and organosulfides. Table 1 shows the specific activity of chloroperoxidase in the oxidation of pure organosulfur compounds. The products of some of these reactions, identified by GC–MS, are listed in Table 2. These organosulfur compounds are good substrates for chloroperoxidase, because they are easily oxidized to form sulfoxides. Kinetic constants for the oxidation of thianthrene by chloroperoxidase were determined (Table 3). The k_{cat} for the oxidation reaction was 64 s^{-1} and the K_M for thianthrene was $90 \times$ lower than for hydrogen peroxide.

On the other hand, hemoproteins are inactivated by hydrogen peroxide; the inactivation constants for chloroperoxidase determined from a first-order equation, in the presence of different concentrations of hydrogen peroxide are shown in Table 4. As in the cases of horseradish peroxidase [55], lignin peroxidase [56], manganese peroxidase [57], lactoperoxidase [58], and other peroxidases, chloroperoxidase is inactivated by the presence of an excess of hydrogen peroxide. This substrate inactivation leads to the modification of the heme prosthetic group and probably, to the formation of a verdohaemoprotein as a final product [57]. So far, the inactivation mechanism has not been clearly elucidated [55–60]. Experimentation is currently being performed in order to improve the enzyme stability against hydrogen peroxide by chemical and genetic modifications of chloroperoxidase.

Obviously, in a one-step enzymatic reaction the removal of sulfur compounds was not envisaged, however, the oxidation of these compounds to sulfoxides permits their removal by a single distillation. Microdistillation of both treated and untreated diesel

Table 4
Inactivation constants (k_{in}) of chloroperoxidase in the presence of different concentrations of hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide (mM)	k_{in} (min^{-1})
0.25	0.203
0.50	0.248
1.00	0.287

fuels monitored by Flame Ionization Detector, FID and by FPD (Fig. 3) shows that the hydrocarbon distillation profile monitored by FID (general detection) changes slightly after the biocatalytic treatment. On the other hand, the specific sulfur detector (FPD) shows a significant change of the distillation profile. The IR spectrum of oxidized diesel fuel showed the presence of two strong absorbance bands at 1385 and 1464 cm^{-1} indicating the presence of sulfoxides and sulfones.

Oxidized sulfur compounds can be removed by a distillation step in which the final distillation point is 50°C lower than the starting fraction. When primary diesel fuel containing 1.6% sulfur is distilled in order to obtain a 100% distillation at a temperature 50°C lower than the original fraction, it produces a diesel fuel containing 1.27% of

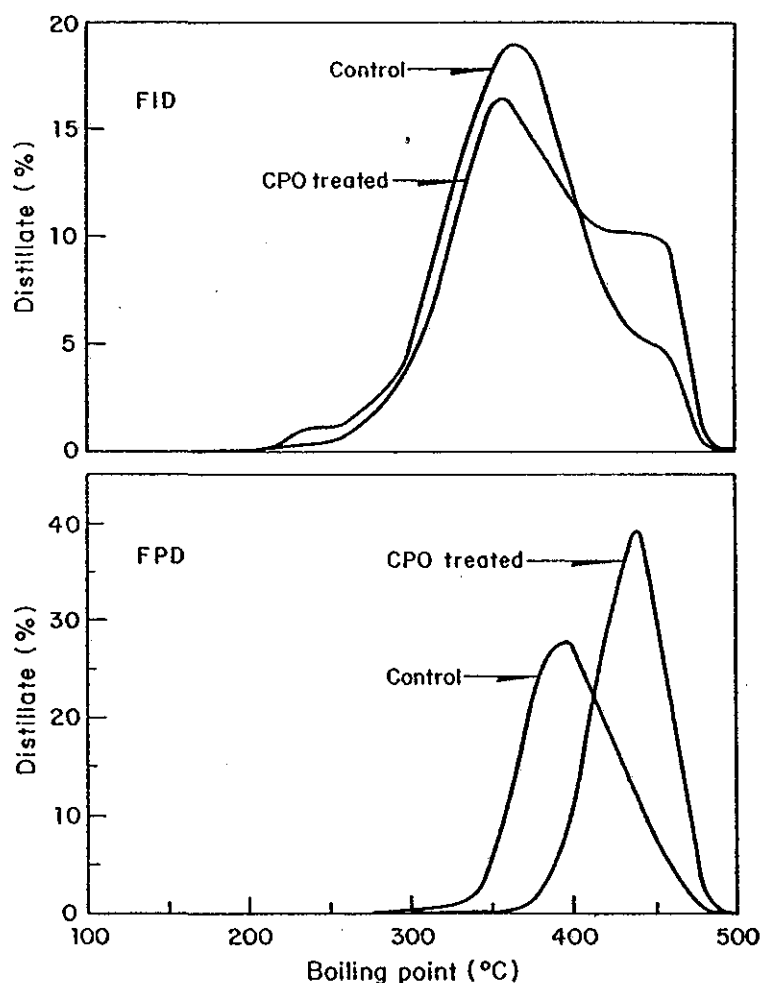


Fig. 3. Microdistillation profiles of untreated and enzymatically treated primary diesel fuel. FID, Flame ionization detector (general detector). FPD, Flame photometric detector (sulfur selective detector). CPO, chloroperoxidase.

sulfur and 83% of the original hydrocarbons. The undistilled heavy fraction (17% of starting hydrocarbons) contained 1.94% sulfur. If this petroleum fraction is previously oxidized by chloroperoxidase and hydrogen peroxide, and distilled at the same conditions, the distillate shows a sulfur content of only 0.27%, and 71% of total hydrocarbons. Thus, a biocatalytic treatment of primary diesel fuel with chloroperoxidase from *C. fumago*, followed by a distillation is able to reduce the sulfur content by 80%. This mass balance was determined by GC integrations with Flame Ionization and Flame Photometric detectors and by sulfur content determinations on a X-ray fluorimeter. This approach for mass balance has some limitations, but it is useful for comparing similar fractions tested under the same conditions. In addition, microdistillation using Flame Ionization Detector is currently a standard method (ASTM D 2887-89) for mass balance.

In conclusion, biocatalytic oxidation of organosulfur compounds can be performed in complex hydrocarbon mixtures. Biocatalytic oxidation of organosulfur compounds found in fuels to less volatile products, which can then be removed by distillation, could be considered as a biodesulfurization process. So far, the reactions were carried out in aqueous mixtures of diesel, however our final goal is to perform the biocatalytic oxidation of organosulfur compounds in the diesel itself as reaction solvent without addition of water or organic solvent. Genetic and chemical modifications on different biocatalysts are in progress in our laboratory, focused on biocatalysis in organic solvent systems.

Acknowledgements

This work was funded by the Instituto Mexicano de Petróleo Grant FIES 95-137-II. We thank Dr. M.A. Pickard from the University of Alberta for the chloroperoxidase supply. The authors thank Rosa Roman for her technical assistance.

References

- [1] D.J. Monticello, W.R. Finnerty, *Annu. Rev. Microbiol.* 39 (1985) 371.
- [2] A. Bhadra, J.M. Scharer, M. Moo-Yong, *Biotechnol. Adv.* 5 (1987) 1.
- [3] J.J. Kilbane, K. Jackowski, *Biotechnol. Bioeng.* 40 (1992) 1107.
- [4] D.J. Monticello, D. Bakker, W.R. Finnerty, *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985) 756.
- [5] L. Setti, G. Lanzarini, P.G. Pifferi, *Proc. Biochem.* 30 (1995) 721.
- [6] M.D. Dahlberg, R.L. Rohere, D.J. Fautb, R. Sprecher, G.J. Olson, *Fuel* 72 (1992) 1645.
- [7] M.K. Lee, J.D. Senius, M.J. Grossman, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 4362.
- [8] T. Omori, L. Monna, Y. Saiki, T. Kodama, *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1992) 911.
- [9] Y. Izumi, T. Oshiro, Y. Hine, M. Shimao, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 223.
- [10] T. Ohshiro, T. Hirata, Y. Izumi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44 (1995) 249.
- [11] P. Wang, A.E. Humphrey, S. Krawiec, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 3066.
- [12] P. Wang, S. Krawiec, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1670.
- [13] K.J. Kayser, B.A. Bielaga-Jones, K. Jackowski, O. Odusan, J.J. Kilbane, *J. Gen. Microbiol.* 139 (1993) 3123.
- [14] *Biotreatment News*, March 1994, 3.
- [15] S.A. Denome, E.S. Olson, K.D. Young, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 2837.
- [16] S.A. Denome, E.S.C. Oldfield, L.J. Nash, K.D. Young, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 6707.
- [17] C.S. Piddington, B.R. Kovacevich, J. Rambosek, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 468.

- [18] B. Lei, S.C. Tu, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 5699.
- [19] C. Denis-Larose, D. Labbe, H. Bergeron, A.M. Jones, C.W. Greer, J. Al-Hawari, M.J. Grossman, B.M. Sankey, P.C.K. Lau, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 2915.
- [20] M. Köhler, I.L. Genz, B. Schicht, V. Eckart, *Zentralbl. Mikrobiol.* 139 (1984) 239.
- [21] K.W. Miller, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 2176.
- [22] V. Eckart, M. Köhler, W. Hieke, *Zentralbl. Mikrobiol.* 141 (1986) 291.
- [23] T.S. Kim, H.Y. Kim, B.H. Kim, *Biotechnol. Lett.* 12 (1990) 757.
- [24] H.Y. Kim, T.S. Kim, B.H. Kim, *Biotechnol. Lett.* 12 (1990) 761.
- [25] H.M. Lizama, L.A. Wilkins, T.C. Scott, *Biotechnol. Lett.* 17 (1995) 113.
- [26] S.M. Armstrong, B.M. Sankey, G. Voordouw, *Biotechnol. Lett.* 17 (1995) 1133.
- [27] B.H. Kim, H.Y. Kim, T.S. Kim, *Fuel Process. Technol.* 43 (1995) 87.
- [28] J.S. Dordick, *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989) 194.
- [29] V.V. Mozhaev, K.G. Poltevsy, V.I. Slepnev, G.A. Badun, A.V. Levashov, *FEBS Lett.* 292 (1991) 159.
- [30] P.M. Fedorak, K.M. Semple, R. Vazquez-Duhalt, D.W.S. Westlake, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 429.
- [31] W. Nastainczyk, H.H. Ruf, V. Ullrich, *Eur. J. Biochem.* 60 (1975) 615.
- [32] D. Fukushima, Y.H. Kim, T. Iyanagi, S. Oae, *J. Biochem.* 83 (1978) 1019.
- [33] Y. Wantabe, T. Iyanagi, S. Oae, *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 3685.
- [34] Y. Wantabe, T. Iyanagi, O. Shigeru, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 533.
- [35] T. Takata, M. Yamazaki, K. Fujimori, Y.H. Kim, T. Iyanagi, S. Oae, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 56 (1983) 2300.
- [36] D. Mansuy, P. Valadon, Y. Erdelmeier, P. Lopez-García, C. Amar, J.P. Girault, P.M. Dansette, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 7825.
- [37] J.C. Alvarez, P.R. Ortiz de Montellano, *Biochemistry* 31 (1992) 8315.
- [38] R.P. Scheiner, S.E. Stevens, M. Tien, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 1858.
- [39] R. Vazquez-Duhalt, D.W.S. Westlake, P.M. Fedorak, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 459.
- [40] D.R. Doerge, *Arch. Biochem. Biophys.* 244 (1986) 678.
- [41] D.R. Doerge, N.M. Cooray, M.E. Brewster, *Biochemistry* 30 (1991) 8960.
- [42] S. Kobayashi, M. Nakano, T. Goto, T. Kimura, A.P. Schaap, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135 (1986) 166.
- [43] S. Colonna, N. Gaggero, L. Casella, G. Carrea, P. Pasta, *Tetrahedron Asymmetry* 3 (1992) 95.
- [44] P. Pasta, G. Carrea, S. Colonna, N. Gaggero, *Biochim. Biophys. Acta* 1209 (1994) 203.
- [45] N.L. Klyachko, A.M. Klivanov, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 37 (1992) 53.
- [46] M. Ortiz-Leon, L. Velasco, R. Vazquez-Duhalt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215 (1995) 968.
- [47] R. Vazquez-Duhalt, D.W.S. Westlake, P.M. Fedorak, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 494.
- [48] R. Vazquez-Duhalt, K.M. Semple, D.W.S. Westlake, P.M. Fedorak, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 936.
- [49] T. Mashino, S. Nakamura, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 3163.
- [50] S. Colonna, N. Gaggero, G. Carrea, P. Pasta, *Tetrahedron Lett.* 35 (1994) 9103.
- [51] E. Torres, J.V. Sandoval, F.I. Rosell, A.G. Mauk, R. Vazquez-Duhalt, *Enzyme Microb. Technol.* 17 (1995) 1014.
- [52] R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, *Enzyme Microb. Technol.* 22 (1998) 8.
- [53] R. Vazquez-Duhalt, P.M. Fedorak, D.W.S. Westlake, *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 837.
- [54] R. Vazquez-Duhalt, E. Torres, R. Tinoco, in: B.C. Alleman, A. Leeson (Eds.), *In Situ and On-Site Bioremediation*, Vol. 2, Battelle Press, Columbus, OH, 1997, p. 225.
- [55] M.B. Arnao, M. Acosta, J.A. del Rio, R. Varón, F. García-Cánovas, *Biochim. Biophys. Acta* 1041 (1990) 43.
- [56] Z.C. Hu, R.A. Korus, C.R. Venkataramu, R.L. Crawford, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 567.
- [57] M. Mylrajan, K. Valli, H. Wariishi, M.H. Gold, T.M. Lochr, *Biochemistry* 29 (1990) 9617.
- [58] M. Huwiler, H. Jenzer, H. Kohler, *Eur. J. Biochem.* 158 (1986) 609.
- [59] A.N.P. Hiner, J. Hernández-Ruiz, F. García-Cánovas, A.T. Smith, M.B. Arnao, M. Acosta, *Eur. J. Biochem.* 234 (1995) 506.
- [60] J.N. Rodríguez-López, J. Hernández-Ruiz, F. García-Cánovas, R.N.F. Thorneley, M. Acosta, M.B. Arnao, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 5469.

Substrate Specificity and Ionization Potential in Chloroperoxidase-Catalyzed Oxidation of Diesel Fuel

MARCELA AYALA,*¹
 NORMA R. ROBLEDO,¹
 AGUSTIN LOPEZ-MUNGUIA,¹ AND
 RAFAEL VAZQUEZ-DUHALT¹

Institute of Biotechnology, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico, and CEPROBI, IPN, Yautepec, Morelos, Mexico

Straight-run diesel fuel containing 1.6% of sulfur was enzymatically oxidized with chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. Most organosulfides and thiophenes were transformed to form sulfoxides and sulfones. The oxidized organosulfur compounds can be effectively removed by distillation. The resulting fraction after distillation contained only 0.27% sulfur, while the untreated straight-run diesel fuel after the same distillation process still showed 1.27% sulfur. To know the chemical nature of the products, nine organosulfur compounds and 12 polycyclic aromatic compounds (PACs) were transformed by chloroperoxidase in the presence of chloride and hydrogen peroxide. Organosulfur compounds were only oxidized to form sulfoxides and sulfones, and no chlorinated derivatives were detected, except for bithiophene. In contrast, PACs were exclusively chlorinated, and no oxidized derivatives could be found. No enzymatic activity was detected on PACs with an ionization potential higher than 8.52 eV, while in the lower region it was found that the higher the ionization potential of the PAC the lower the specific activity. On the other hand, the substrate ionization potential did not seem to influence chloroperoxidase activity in the oxidation of organosulfur compounds. All organosulfur compounds tested were oxidized by chloroperoxidase. From double-substrate experiments, it appears that organosulfur compounds are oxidized by both compound I and compound X enzyme intermediates, while PACs react only with the halogenating intermediate, compound X.

Introduction

The environmental driver for diesel sulfur reduction is well-established. Meeting sulfur regulations on petroleum products is driving up the cost of refining, because conventional hydrodesulfurization becomes increasingly expensive and less efficient in handling sulfur removal as lower and lower sulfur levels are reached (1). In the United States, there are plans to greatly reduce motor-vehicle emissions and sulfur content

in gasoline (2). The plan would cut the average sulfur level in gasoline by 90%, from an average of about 330 ppm to 30 ppm, by 2004.

Microbial desulfurization of fossil fuels has been under active investigation for several decades and has been recently reviewed (3-5). Research groups and companies worldwide are developing the technology for fuel biodesulfurization, the most successful being a unique refinery process using bacteria to selectively remove sulfur from diesel. The patented bacteria, *Rhodococcus* IGTS8, has been genetically engineered to increase both activity and stability (6).

Recently, we have described an enzymatic method for fuel desulfurization (7). The method includes the steps of biocatalytic oxidation of organosulfur compounds contained in straight-run diesel fuel by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*, followed by a distillation process in which the oxidized compounds are removed. Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* (CPO) (EC 1.11.1.10) is a versatile heme enzyme because of its catalytic diversity. CPO is a peroxide-dependent chlorinating enzyme, and it also catalyzes peroxidase-, catalase-, and cytochrome P450-type reactions of dehydrogenation, H₂O₂ decomposition, and oxygen insertion, respectively. This unusual combination of enzymatic activities is the origin of a number of studies involving CPO as a catalyst with potential applications, including the petroleum industry. It has been demonstrated that CPO is able to remove nickel and vanadium from asphaltene fractions (8). CPO is also able to perform interesting reactions, like the enantioselective epoxidation of alkenes (9), oxidation of phenolic pollutants (10, 11), oxygenation of sulfides (7, 12), oxidation of organophosphorus pesticides (13), and the determination of genotoxic potential of pollutants (14), to give only a few examples. However, the catalytic mechanism of CPO has not been completely established, and the exact role of chloride and the identity of the halogenating species remains a subject of controversy (15-18).

The ability of fungal peroxidases to biotransform petroleum compounds, such as polyaromatic hydrocarbons (PAHs), has been investigated before, specially lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) from *Phanerochaete chrysosporium*. These nonspecific extracellular enzymes are believed to be involved in pollutant biotransformation. Interestingly, the activity of LiP and MnP correlates with the ionization potential (IP) of the PAHs. A threshold IP value was found for each enzyme. LiP oxidizes PAHs with IP \leq 7.55 eV as well as some heterocyclic compounds with IP \leq 8 eV (19, 20), while MnP oxidizes PAHs with IPs as high as 8.1 eV (21, 22). With this evidence it was possible to distinguish whether a substrate was transformed via an electron subtraction process.

Considering that both organosulfur and PACs are contained in diesel fuel, in the present work the enzymatic activity of CPO toward a group of several organosulfur compounds (thiophenes and organic sulfides) and PACs was determined. The chemical nature of reaction products and the role of the substrate ionization potential were analyzed.

Experimental Section

Chemicals. Purified CPO from *Caldariomyces fumago* was produced in a fructose medium and purified according to Pickard (23); all preparations used in this study had an $R_z = 1.36$, which corresponds to 95% purity. Hydrogen peroxide and buffer salts were obtained from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ). Polycyclic aromatic compounds and aromatic thiophenes and sulfides were purchased from Aldrich

* Corresponding author phone: +52 73 291619; fax: +52 73 172388; e-mail: maa@ibt.unam.mx. Mailing address: Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico.

¹ Institute of Biotechnology, UNAM.

² CEPROBI, IPN.

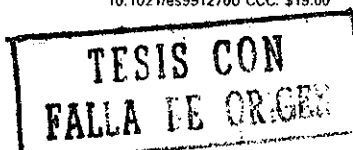


TABLE 1. Sulfur Content of Straight-Run Diesel Fuel after Enzymatic Oxidation with Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* Followed by a Distillation to 325 °C as Final Distillation Point

	distillation		enzymatic + distillation	
	TPH ^a (%)	sulfur (%)	TPH (%)	sulfur (%)
distillate	83	1.27	71	0.27
residue	17	3.21	29	5.51

^a Total petroleum hydrocarbons.

Chemical (Milwaukee, WI). HPLC-grade acetonitrile and methylene chloride were purchased from Fisher Scientific (Springfield, NJ).

Reaction Conditions. Diesel fuel oxidations with chloroperoxidase were carried as previously reported (7). Oxidation reactions of individual organosulfur and aromatic compounds were carried out in a 1-mL reaction mixture containing 20 μM substrate and 15% acetonitrile in a 60 mM acetate buffer, pH 3.0, with or without 20 mM KCl at room temperature. From 0.4 pmol to 0.2 nmol of the purified enzyme were used in the mixtures. Reactions were started by addition of 1 mM H₂O₂. Reaction rates were estimated by monitoring the substrate peak in a HPLC system equipped with a diode array detector. Enzyme activities were obtained from the differences in peak area after 10 min of reaction, transformed by a standard curve, and adjusted for protein concentration. Reported values are the mean of three replicates. Specific reaction rates are given as mol of substrate converted per mol of enzyme per minute or simply in min⁻¹. For products identification, 10-mL reactions were performed; after 1 h, the mixture was acidified and extracted with methylene chloride, and the extract was reduced under nitrogen, before being analyzed by GC-MS.

Two-Substrate Reactions. Reaction mixtures contained either 20 μM thianthrene or 30 μM pyrene and 100 μM monochlorodimedone (MCD) in 15% acetonitrile in a 20 mM KCl, 60 mM acetate buffer pH 3.0. The reaction was started by addition of 0.25 mM H₂O₂ and monitored spectrophoto-

metrically at 288 nm (MCD) and either 254 nm (thianthrene) or 335 nm (pyrene).

Kinetic Constants Determination. Reactions were performed in 1 mL of 60 mM acetate buffer pH 3.0, 20 mM KCl and either 15% for thianthrene or 20% acetonitrile for MCD and pyrene. Reaction was started by addition of 1 mM H₂O₂. The initial reaction rates were obtained by following the decrease in absorbance at 254 nm for thianthrene ($\epsilon = 35 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and at 335 nm for pyrene ($\epsilon = 32.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Analytical Methods. Substrate concentration was measured in a Perkin Elmer (series 200) HPLC system, using a C₁₈ Hypersyl 5 μm Hewlett-Packard column and eluted with an acetonitrile-water (70:30 v/v) solvent mixture. Substrate and products detection was carried out using a diode array detector coupled to the HPLC system. The used wavelengths for detection (λ_{det}) are listed in Tables 3 and 4. Other UV measurements were made in a Beckman Spectrophotometer (DU 530). Product identification was performed in a Hewlett-Packard GC (model 6890)-MS (model 5972) equipped with a SPB-20 column (30m × 0.25 mm, Supelco). The GC system was coupled to both a flame ionization detector (FID, general detector) and a flame photometric detector (FPD, specific sulfur detector). The temperature program started at 100 °C for 2 min; the temperature was raised to 290 °C at a rate of 8 °C/min and kept at 290 °C for 10 min.

Microdistillations were carried out according to the standard test for boiling range distribution of petroleum fractions by gas chromatography, ASTM D 2887-89. Organic sulfur content on diesel fuel were determined by X-ray fluorimetry in a Horiba X-ray fluorimeter. Total petroleum hydrocarbons (TPH) were estimated by the USEPA 8015 method (modified).

Results

Sraight-run diesel fuel, obtained from primary distillation and containing 1.6% sulfur, was oxidized with chloroperoxidase in the presence of 20 mM KCl and 1 mM hydrogen peroxide. The gas chromatographic analysis with both flame

TABLE 2. Mass Spectral Data of Products^a

substrate	product	mass spectral ions (m/z)
benzothiophene	benzothiophene sulfone	166 (42) [M ⁻], 138 (9), 137 (100), 118 (15), 109 (48), 90 (14), 89 (16), 76 (15), 75 (15), 74 (14), 65 (9), 63 (13)
diphenyl sulfide	diphenyl sulfone	218 (27) [M ⁺], 125 (100), 97 (26), 77 (53), 51 (47), 50 (16)
dibenzothiophene	dibenzothiophene sulfone	216 (100) [M ⁻], 187 (46), 160 (31), 150 (16), 139 (30)
thianthrene	5-thianthrene oxide	232 (16) [M ⁻], 184 (100), 171 (15), 139 (14), 69 (14)
	5,10-thianthrene dioxide	248 (77) [M ⁻], 200 (86), 184 (84), 171 (100), 168 (23), 139 (30), 108 (24), 69 (36)
acenaphthene	dichloroacenaphthene	224 (39), 222 (64) [M ⁺], 187 (100), 152 (95), 93 (17), 75 (24)
	trichloroacenaphthene	258 (57), 256 (81) [M ⁺], 221 (66), 186 (100), 150 (50), 110 (27), 98 (18), 75 (23)
anthracene	9,10-dichloroanthracene	248 (68), 246 (100) [M ⁺], 176 (43), 87 (10)
biphenylene	dichlorobiphenylene	222 (64), 220 (100) [M ⁺], 185 (17), 150 (45), 75 (11)
	trichlorobiphenylene	258 (30), 256 (93), 254 (100) [M ⁺], 219 (13), 184 (49), 149 (14), 74 (10)
fluorene	dichlorofluorene	238 (25), 237 (7), 236 (40) [M ⁺], 201 (31), 199 (18), 166 (63), 165 (100), 164 (17), 163 (24), 100 (11), 82 (35)
phenanthrene	chlorophenanthrene	214 (32), 213 (16) [M ⁺], 212 (100), 177 (20), 176 (55), 175 (11), 174 (10), 151 (14), 150 (14), 106 (17), 88 (33), 87 (11), 75 (13)
pyrene	chloropyrene	238 (31), 236 (100) [M ⁺], 200 (34), 100 (12)
	dichloropyrene	272 (62), 270 (100) [M ⁺], 235 (11), 200 (53), 135 (12), 100 (23)
triphenylene	chlorotriphenylene	265 (7), 264 (34), 263 (21) [M ⁻], 262 (100), 227 (14), 226 (63), 225 (16), 224 (23), 200 (11), 132 (9), 131 (20), 113 (56), 112 (43), 100 (21), 99 (12), 87 (9)
bithiophene	dichlorobithiophene	238(15), 236 (72) [M ⁺], 234 (100), 201 (36), 164 (45), 157 (28), 155 (76), 142 (10), 119 (21), 93 (17), 82 (19), 79 (14), 69 (30)
	trichlorobithiophene	272 (37), 271 (11), 270 (100) [M ⁻], 233 (58), 198 (81), 191 (53), 189 (82), 163 (15), 154 (33), 135 (18), 119 (37), 103 (19), 93 (39), 81 (46), 79 (58), 69 (36), 58 (12)
	tetrachlorobithiophene	308 (13), 306 (49), 304 (96) [M ⁻], 302 (71), 267 (52), 232 (44), 223 (39), 197 (22), 188 (30), 162 (12), 153 (76), 117 (72), 98 (11), 93 (36), 81 (74), 79 (100), 69 (26)

^a Values in parentheses are relative abundances.

109

TABLE 3. Specific Activity of CPO with Organosulfur Compounds

	λ_{det} (nm)	IP (eV)	specific activity (min^{-1})	
1	thianthrene	254	7.80	1310 (\pm 132)
2	2,2'-bithiophene	300	7.83 ^a	840 (\pm 8)
3	diphenyl sulfide	248	7.88	831 (\pm 32)
4	dibenzothiophene	232	8.39	126 (\pm 9)
5	benzothiophene	226	8.73	557 (\pm 42)
6	ethyl phenyl sulfide	254	8.80	1725 (\pm 145)
7	benzenethiol	238	8.90	116 (\pm 5)
8	thioanisole	256	8.95	2917 (\pm 58)
9	diphenyl disulfide	240	9.40	352 (\pm 10)

^a IP measured by charge transfer (25).

TABLE 4. Specific Activity of CPO with Aromatic Compounds

	λ_{det} (nm)	IP (eV)	specific activity (min^{-1})	
1	azulene	270	7.43 ^a	676 (\pm 34)
2	9-methylanthracene	254	7.46	758 (\pm 27)
3	anthracene	250	7.51	134 (\pm 14)
4	biphenylene	248	7.56 ^a	10 (\pm 0.5)
5	2-methylanthracene	248	7.70	107 (\pm 8)
6	pyrene	236	7.72	53 (\pm 6)
7	acenaphtene	226	7.73 ^a	65 (\pm 8)
8	fluorene	260	7.91	1.9 (\pm 0.13)
9	fluoranthene	236	7.95 ^a	3 (\pm 0.2)
10	phenanthrene	250	8.07	7 (\pm 0.1)
11	triphenylene	256	8.10	0.8 (\pm 0.09)
12	naphthalene	220	8.18	0.6 (\pm 0.01)
13	biphenyl	250	8.64	NR ^b
14	dibenzofuran	280	8.77	NR ^b
15	anthrone	260	9.43	NR ^b

^a IP measured by photoelectron spectroscopy (25). ^b NR: no reaction detected.

ionization (FID) and flame photometric (FPD) detectors showed that chloroperoxidase was able to oxidize most of organosulfur compounds contained in the diesel fuel. The oxidation was detected by the increase of boiling point (retention time) of these compounds on the gas chromatogram monitored by the sulfur selective detector (FPD). Microdistillation of both chloroperoxidase-oxidized and untreated diesel fuels monitored by FID (general detection) and FPD (sulfur selective detection) (Figure 1) shows that the hydrocarbon distillation profile changes slightly after enzymatic treatment. In contrast, the specific sulfur detector (FPD) shows a significant change of the distillation profile, in which most of organosulfur compounds were effectively oxidized and their boiling points increased after enzymatic treatment.

Oxidized sulfur compounds can be removed by a distillation process (Table 1). After distillation, the sulfur content in the enzymatically oxidized diesel fuel is only 0.27%, while for the untreated fuel is 1.27%. The distillation of the straight-run diesel fuel (1.6% sulfur) to a final distillation point of 325 °C produced a distillate containing 66% of the total sulfur, while if the diesel fuel is previously oxidized with chloroperoxidase, the obtained distillate contained only 12% of the total sulfur. Thus, by using an enzymatic oxidation with chloroperoxidase coupled with a distillation process it is possible to obtain a diesel fuel with six times lower sulfur concentration than straight-run diesel fuel. Few hydrocarbons are also transformed during the enzymatic treatment, and after distillation an additional 12% of them remain in the residue (Table 1).

To know the chemical nature of the products from the enzymatic reaction, nine organosulfur compounds, including

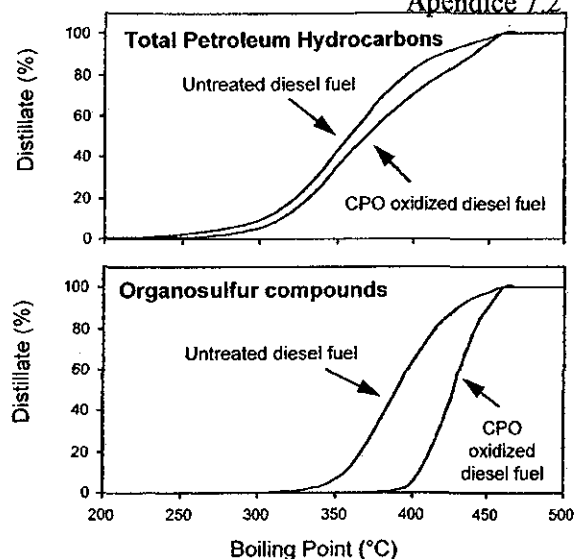


FIGURE 1. Microdistillation of untreated and chloroperoxidase-oxidized straight-run diesel fuel: FID, flame ionization detector (general detector) and FPD, flame photometric detector (sulfur selective detector).

thiophenes, organic sulfides, and thiols, and 15 aromatic compounds were tested for chloroperoxidase transformation. Table 2 shows the products identified by GC-MS. Products from all the organosulfur compounds were their respective sulfoxides and sulfones, except for biothiophene for which chlorinated derivatives were detected. Sulfones are the final product of CPO reactions; successive additions of both enzyme and H_2O_2 to complete substrate modification did not change the chemical nature of the products. In addition, sulfone standard compounds were not substrate for CPO as determined by GC and HPLC methods.

Aromatic hydrocarbons are also important constituents of diesel fuel. It is well known that chloroperoxidase is able to transform some PAHs (14, 24). Twelve of the 15 PACs tested were transformed by CPO in the presence of 1 mM H_2O_2 and 20 mM KCl, as monitored by HPLC. GC-MS analysis of the reaction products showed that the substrates were exclusively chlorinated during the reaction (Table 2). Furthermore, in the absence of chloride there was not observable reaction.

Tables 3 and 4 show the specific activity of CPO and IP values for the organosulfur and PACs compounds assayed. The ionization potentials (IP) taken are measured by electron impact, except for azulene, biphenylene, fluoranthene, and bithiophene (25). Figure 2 shows the correlation between IP values and specific activity for PACs and organosulfur compounds.

To determine the effect of the presence of a good substrate for halogenation, such as monochlorodimedone (MCD), thianthrene oxidation and pyrene halogenation reactions were performed in the presence of 0.1 mM MCD (Figure 3). Under these conditions, thianthrene was initially oxidized to form a sulfoxide with a significantly low rate (Table 3). Once MCD was exhausted, thianthrene oxidation rate became similar to that found in the absence of MCD (Figure 3a). In the case of pyrene, halogenation did not start until all MCD was halogenated, suggesting a strong affinity of MCD for the enzyme (Figure 3b). Under our experimental conditions, the specific activity of halogenation of MCD is 3480 min^{-1} . The specific reaction rate is only slightly affected in the presence of pyrene (3200 min^{-1}). On the other hand, the presence of thianthrene decreases the specific reaction rate for halogenation of MCD (2830 min^{-1}), while the initial rate for

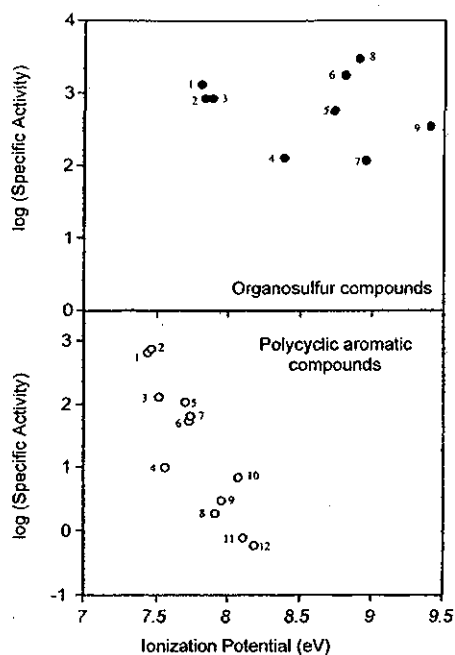


FIGURE 2. Influence of the substrate ionization potential on the specific activity of CPO. Substrates are organosulfur compounds (●) and polycyclic aromatic compounds (○). Numbers in superior and inferior panels correspond to those in Tables 3 and 4, respectively.

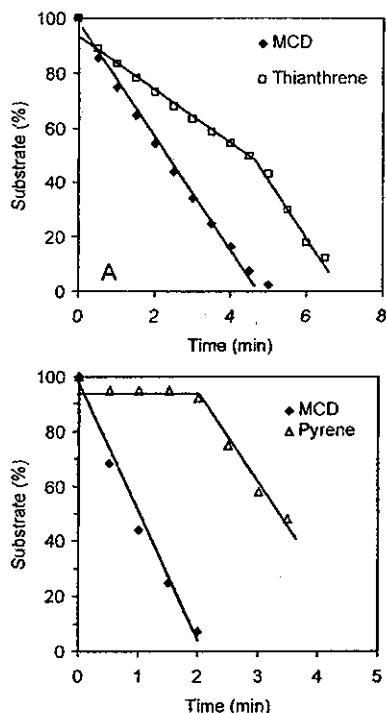


FIGURE 3. Competition between (A) MCD and thianthrene and (B) MCD and pyrene.

thianthrene oxidation is 300 min^{-1} , until MCD is exhausted. The addition of the MCD halogenation and thianthrene oxidation rates results in a value close to that obtained with MCD alone.

Kinetic constants for pyrene halogenation and thianthrene oxidation were determined (Table 5). Chloroperoxidase is a more efficient catalyst in the reaction of oxidation of thianthrene than in the reaction of halogenation of pyrene.

TABLE 5. Kinetic Constants for Thianthrene Oxidation and Pyrene Halogenation

substrate	$k_{cat} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_M \text{ (}\mu\text{M)}$	$k_{cat}/K_M \text{ (}\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}$
MCD	94	1.4	67
thianthrene	64	1.5	44
pyrene	37	32	1.2

as can be seen from the catalytic efficiencies k_{cat}/K_M . Though both the affinity and the catalytic constant are higher for thianthrene, the main effect comes from the affinity of the enzyme for the substrate, which is 1 order of magnitude lower for pyrene.

Discussion

Enzymatic oxidation of diesel fuel allows the organosulfur compounds to be separated by a single distillation process. Chloroperoxidase from *C. fumago* is a very active enzyme able to perform transformation of complex oil fractions, such as diesel (7) and asphaltenes (8). Chloroperoxidase shows three different catalytic activities: halogenase, peroxidase, and catalase (26–28). In addition, some reports have claimed that chloroperoxidase catalyzes two-electron reactions (peroxygenase), which could be considered a kind of monooxygenase activity (29–32). Nevertheless, when organosulfur compounds such as thiophenes and organosulfides are substrates, mainly sulfoxides are formed by the peroxidase activity (Table 2 and Figure 1). All nine organosulfur compounds tested were oxidized by chloroperoxidase, even when the reaction system contained 20 mM KCl (Table 3), except for 2,2'-bithiophene from which halogenated derivatives were detected. These results are in agreement with previous work reporting that sulfoxides are produced from chloroperoxidase activity (30, 32, 33).

On the other hand, polycyclic aromatic compounds (PACs) are halogenated (Table 2). Other peroxidases, such as lignin peroxidase (19, 20) and manganese peroxidase (21, 22) and even hemoproteins with peroxidase activity (24, 34), produce mainly quinones from PAHs oxidation. Specific activity of chloroperoxidase on PACs halogenation shows a clear correlation with the substrate ionization potential (Figure 2). Because ionization potential could be defined as the energy involved in taking out one electron from the substrate molecule, this correlation suggests a one-electron mechanism with a free radical-mediated reaction. Only PACs with ionization potential lower than 8.52 eV were halogenated (Table 4). In general, the lower the ionization potential of the PAC, the higher the specific activity of the chloroperoxidase for that substrate (Figure 2). The ionization potential value of 8.52 eV appears to be a threshold, as none of the compounds tested having higher ionization potentials were transformed by chloroperoxidase. This threshold value is significantly higher than those reported for other peroxidases. Lignin peroxidase is able to oxidize PAHs and form quinones up to a PAHs ionization potential of 8.0 eV (20), and manganese peroxidase from *P. chrysosporium* shows a threshold value for PAHs substrates of 8.1 eV (22). Interestingly, no clear correlation could be found between the ionization potential and the specific activity for organosulfur compounds (Figure 2). In fact, we were not able to find a single organosulfur compound, thiophene or sulfide, which is not transformed by chloroperoxidase.

A possible production of chlorinated derivatives from PAHs by CPO reactions is an undesirable side of the process. However, as shown in Tables 3 and 4 (enzyme activity on single substrates) and in Table 5 (affinity constants, K_M , for thianthrene and pyrene), organosulfur compounds are better substrates and therefore can compete favorably with PAHs. This means that in a mixture containing both types of

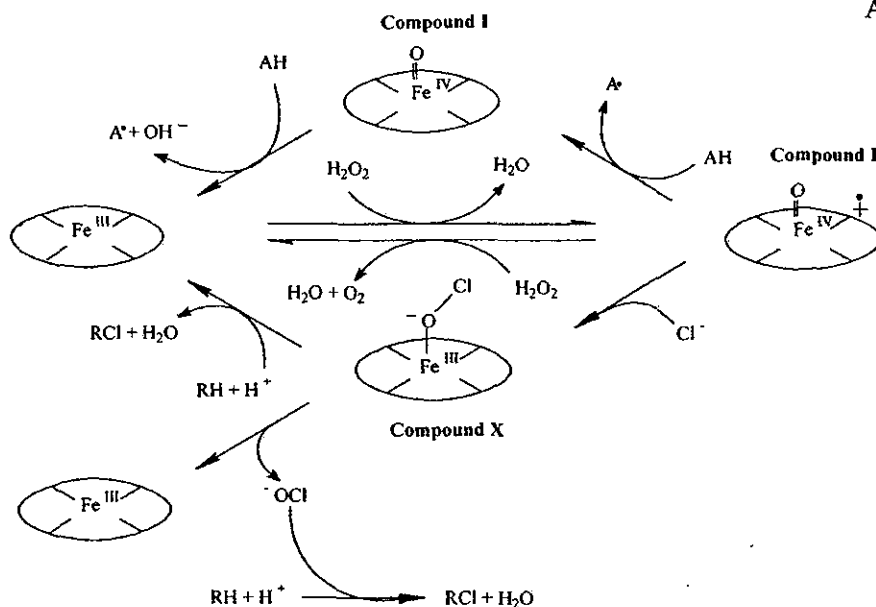


FIGURE 4. Proposed catalytic cycle of chloroperoxidase.

compounds, the sulfur compounds would be preferentially oxidized by CPO. Nevertheless, the reaction conditions and the biocatalyst preparation should be designed to minimize the halogenation reactions because of the environmental implications of chlorinated aromatic compounds.

So far, the catalytic cycle of chloroperoxidase is not completely elucidated (15, 16, 18, 35). The proposed mechanism (Figure 4) includes a first activation step, in which hydrogen peroxide transforms the (Fe^{III})porphyrin group (native state) to oxo(Fe^{IV})porphyrin radical cation (compound I). Then compound I can follow two ways: the oxidation of a substrate molecule to form an oxo(Fe^{IV})porphyrin without the associated porphyrin π -radical cation (compound II) or the reaction with a chlorine ion to form a ClO(Fe^{III})porphyrin group, called compound X, which is the only responsible for the enzymatic reaction of halogenation. In addition, this compound X seems also to be able to perform oxidation reactions liberating a chlorine ion. After both reactions, compound X returns to the native (Fe^{III})porphyrin state. From this proposed mechanism, it seems that the organosulfur compounds are able to react with both compound I and compound X, while PACs are only reactive to compound X. This is in agreement with our results, as when a high affinity halogenation substrate (MCD) is present in the medium, a slow thianthrene oxidation is found (Figure 3a). The oxidation rate is lower because most of compound I is rapidly transformed to compound X, due to rapid compound X turnover by MCD reaction. Thus the observed thianthrene oxidation is mainly mediated by compound X. When MCD is exhausted, thianthrene competes more favorably with the chlorine ions for compound I, its transformation involving both forms: compound I and compound X. This competition between a halogenation substrate (MCD) and a peroxidase substrate (catechol) has been previously reported (35). In this case, MCD quantitatively replaces catechol as a substrate for part of the enzymatic reaction. In contrast, and as expected, chloroperoxidase is not able to react with pyrene when MCD is present in the medium (Figure 3b), a situation that can be explained by the significant differences between the catalytic efficiencies of MCD ($k_{cat}/K_M = 55 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) and pyrene ($k_{cat}/K_M = 1.2 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). The main effect comes from the different affinity of chloroperoxidase for the substrates, whereas for MCD $K_M = 1.2 \mu\text{M}$, and for pyrene $K_M = 32 \mu\text{M}$,

1 order of magnitude lower. Under these conditions the available halogenating active sites are readily saturated by MCD; pyrene, which is unable to compete for compound X, is transformed only until MCD is exhausted.

Chloroperoxidase from *C. fumago* catalyzes the oxidation of most of organosulfur compound found in straight-run diesel fuel. This oxidation allows the desulfurization of diesel fuel by distillation. Sulfoxides and sulfones are the main products from CPO reaction on organosulfur compounds, while halogenated aromatic compounds are the only products from PACs reactions. Furthermore, PACs halogenation by chloroperoxidase seems to be dependent on the substrate ionization potential. In general, PACs with an ionization potential of $< 8.52 \text{ eV}$ were halogenated. Our results support a free radical mechanism for enzymatic halogenation and a catalytic cycle in which compound X [ClO(Fe^{III})porphyrin] could be responsible for both substrate halogenation and oxidation in a chlorine-dependent process.

The broad specificity and high activity of chloroperoxidase encourage further investigation in the use of this enzyme as an efficient catalyst in a desulfurization process, including an enzymatic treatment followed by a fractional distillation step. Sulfur removal from a very complex mixture, such as petroleum fractions, is far from being accomplished. Conventional hydrodesulfurization becomes expensive and less efficient as lower and lower sulfur levels are reached. The biotechnological process could be applied after a conventional desulfurization process in order to reach these new regulatory low-levels for sulfur content in fuels. At the moment, the use of chloride as an activator in this process seems unavoidable, since in this hydrophobic medium, chloroperoxidase presents very low activity and chloride greatly improves the reaction rate. Unfortunately, the presence of halogens would yield some environmentally undesirable products. Our research is currently focused on the protein engineering of chloroperoxidase in order to reduce its halogenase activity, maintaining or increasing the peroxidase activity. In addition, different approaches to improve the stability of chloroperoxidase are under research, such as genetic engineering and cross-linking of enzyme crystals. The stabilization of enzymes in non-conventional low-water content medium is a priority for the successful development of industrial enzymatic processes.

Acknowledgments

This work was supported by DGPA-UNAM grant IN 220598 from the National Autonomous University of Mexico (UNAM).

Literature Cited

- (1) Hunt, P. *Oil Gas J.* **1996**, *94*, 53.
- (2) Grisham, J. L. *Chem. Eng. News* **1999**, *77*, 21.
- (3) Monticello, D. J.; Finnerly, W. R. *Annu. Rev. Microbiol.* **1985**, *39*, 371.
- (4) Monticello D. J. *CHEMTECH* **1998**, *28*, 38.
- (5) McFarland, B. L.; Boron, D. J.; Deever, W.; Meyer, J. A.; Johnson A. R.; Atlas, R. M. *Crit. Rev. Microbiol.* **1998**, *24*, 99.
- (6) Pacheco, M. A.; Lange, E. A.; Pienkos, P. T.; Yu, L.-Q.; Rouse, M. P.; Lin, Q.; Linguist, L. K. *National Petrochemical and Refiners Association Annual Meeting*, March 21-23, San Antonio, TX, 1999.
- (7) Ayala, M.; Tinoco, R.; Hernandez, V.; Bremauntz, P.; Vazquez-Duhalt, R. *Fuel Processing Technol.* **1998**, *57*, 101.
- (8) Fedorak, P. M.; Semple, K. M.; Vazquez-Duhalt, R.; Westlake, D. W. S. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 429.
- (9) Zaks, A.; Dodds, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10419.
- (10) Aitken, M. D.; Massey, I. J.; Chen, T.; Heck, P. E. *Water Res.* **1994**, *28*, 1879.
- (11) Carmichael, R.; Fedorak, P. M.; Pickard M. A. *Biotechnol. Lett.* **1985**, *7*, 289.
- (12) Casella, L.; Colonna, S.; Carrea, G. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9451.
- (13) Hernandez, J.; Robledo, N. R.; Velasco, L.; Quintero, R.; Pickard, M. A.; Vazquez-Duhalt, R. *Pest. Biochem. Physiol.* **1998**, *61*, 87.
- (14) Marquez-Rocha, F. J.; Pica-Granados, Y.; Sandoval-Villasana, A. M.; Vazquez-Duhalt, R. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1997**, *59*, 788.
- (15) Dunford, H. B.; Lambeir, A.; Kashem, M.; Pickard M. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *252*, 292.
- (16) Libby, R. D.; Beachy, T. M.; Phipps A. K. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21820.
- (17) Sundaramoorthy, M.; Terner, J.; Poulos, T. L. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 461.
- (18) Wagenknecht, H. A.; Woggon, W. D. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 367.
- (19) Hammel, K. E.; Kalyanaraman, B.; Kirk, T. K. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 16948.
- (20) Vazquez-Duhalt, R.; Westlake, D. W. S.; Fedorak, P. M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 459.
- (21) Bogan, B. W.; Lamar, R. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 2631.
- (22) Bogan, B. W.; Lamar, R. T.; Hammel, K. E. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 1788.
- (23) Pickard, M. A.; Kadima, T. A.; Carmichael, R. D. *J. Ind. Microb.* **1991**, *7*, 235.
- (24) Torres, E.; Tinoco, R.; Vazquez-Duhalt, R. *Wat. Sci. Tech.* **1997**, *36*, 37.
- (25) Ion Energetics Data. In *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69 (Online)*; Mallard, W. G., Linstrom, P. J., Eds.; National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, 1998 (<http://webbook.nist.gov>) (September 28, 1999, last date accessed).
- (26) Hager, L. P.; Morris, D. R.; Brown, F. S.; Eberwein, H. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1769.
- (27) Thomas, J. A.; Morris, D. R.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 3129.
- (28) Thomas, J. A.; Morris, D. R.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 3135.
- (29) Kedderis, G. L.; Rickert, D. E.; Pandey, R. N.; Hollenberg, P. F. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15910.
- (30) Kobayashi, S.; Nakano, M.; Kimura, T.; Schaap, A. P. *Biochemistry* **1987**, *26*, 5019.
- (31) McCarthy, M. B.; White R. E. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 9153.
- (32) Ortiz de Montellano, P. R.; Choe, Y. S.; DePillis, G.; Catalano, C. E. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11641.
- (33) Pasta, P.; Carrea, G.; Colonna, S.; Gaggero, N. *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, *1209*, 203.
- (34) Tinoco, R.; Vazquez-Duhalt, R. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 8.
- (35) Libby, R. D.; Rotberg, N. S.; Emerson, J. T.; White, T. C.; Yen, G. M.; Friedman, S. H.; Sun, N. S.; Goldowski, R. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 15284.

Received for review November 10, 1999. Revised manuscript received March 16, 2000. Accepted April 5, 2000.

ES9912700

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



PERGAMON

Phytochemistry 58 (2001) 929–933

www.elsevier.com/locate/phytochem

Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago*

Rafael Vázquez-Duhalt^{a,*}, Marcela Ayala^a, Facundo J. Márquez-Rocha^b^aBiotechnology Institute UNAM, AP 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico^bMarine Bioprocess Engineering Laboratory, CICESE, Baja California, 22860, Mexico

Received 19 March 2001; received in revised form 5 July 2001

Abstract

Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* was able to chlorinate 17 of 20 aromatic hydrocarbons assayed in the presence of hydrogen peroxide and chloride ions. Reaction rates varied from 0.6 min⁻¹ for naphthalene to 758 min⁻¹ for 9-methylanthracene. Mono-, di- and tri-chlorinated compounds were obtained from the chloroperoxidase-mediated reaction on aromatic compounds. Dichloroacenaphthene, trichloroacenaphthene, 9,10-dichloroanthracene, chloropyrene, dichloropyrene, dichlorobiphenylene and trichlorobiphenylene were identified by mass spectral analyses as products from acenaphthene, anthracene, pyrene and biphenylene respectively. Polycyclic aromatic hydrocarbons with 5 and 6 aromatic rings were also substrates for the chloroperoxidase reaction. The importance of the microbial chlorination of aromatic pollutants and its potential environmental impact are discussed. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Fungal chloroperoxidase; Enzymatic chlorination; Polycyclic aromatic hydrocarbons

1. Introduction

Organochlorine industrial compounds, chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) are considered among the most important pollutant xenobiotics. Their toxic effects have been extensively studied (Evangelista de Duffard and Duffard, 1996; Giesy and Kannan 1998; Tilson and Kodavanti, 1998). Because of their potential public health risk, some organochlorine compounds, such as PCBs, have been banned in western countries, but many are still manufactured and used as pesticides, plasticizers, paint and printing-ink components, adhesives, flame retardants, hydraulic and heat transfer fluids, refrigerants, solvents, additives for cutting oils, and textile auxiliaries. Thus, contamination with organochlorine compounds still occurs and this is of great public concern due to potential toxicity to humans and wildlife. Microbiological studies have been almost entirely focused on the degradation of these toxic compounds (Robinson, 1998; Wiegel and Wu, 2000; Chaudhry and Chapalamadugu, 1991).

In spite of the microbial capacity to produce halogenated compounds (Neidleman, 1975; de Jong and Field, 1997), information is scarce on the microbial production of toxic organochlorine compounds. In addition to de novo synthesis of chlorinated compounds, microorganisms transform some non-halogenated xenobiotics into organochlorine compounds with a possible increase in their toxicity. In this work, we show the capacity of chloroperoxidase from the fungus *Caldariomyces fumago* to chlorinate aromatic hydrocarbons, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). PAHs are widely dispersed in the environment, and they are considered to be a potential health risk because of their possible carcinogenic and mutagenic activities. Chloroperoxidase (CPO) is a 42,000 Da extracellular heme glycoenzyme containing ferriprotoporphyrin IX as the prosthetic group (Sundaramoorthy et al., 1995). CPO exhibits a broad spectrum of chemical reactivities, it is a peroxide-dependent chlorinating enzyme and it also catalyzes peroxidase-, catalase- and cytochrome P450-type reactions of dehydrogenation, H₂O₂ decomposition and oxygen insertion, respectively (Yi et al., 1999). CPO is only one of a variety of halogenase enzymes that can be found in nature, other enzymes such as vanadium and non-heme halogenases (van Pee et al., 2000; Vollenbroek et al., 1995) are also potentially able to chlorinate organic pollutants.

* Corresponding author at: Instituto de Biotecnología UNAM, Aparto Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. Tel.: +52-5622-7655; fax: +52-7317-2388.

E-mail address: vazqduh@ibt.unam.mx (R. Vázquez-Duhalt).

2. Results and discussion

Chloroperoxidase was able to utilize 17 of the 20 aromatic hydrocarbons assayed as substrate (Table 1). Only biphenyl, and the oxygen-containing dibenzofuran and anthrone, were not substrates for CPO under our reaction conditions. The specific activity values were from 0.6 min⁻¹ for naphthalene to 758 min⁻¹ for 9-

Table 1
Specific activity of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* against aromatic compounds

Aromatic compound	Specific activity (min ⁻¹)
9-Methylanthracene	758 (±27)
Azulene	676 (±34)
Anthracene	134 (±14)
2-Methylanthracene	107 (±8)
7,12-Dimethylbenzanthracene	87 (±8)
Benzo[a]pyrene	84 (±6)
7-Methylbenzo[a]pyrene	81 (±7)
Acenaphthene	65 (±8)
Pyrene	53 (±6)
Benzo[ghi]perylene	45 (±7)
Perylene	25 (±10)
Biphenylene	10 (±0.5)
Phenanthrene	7 (±0.1)
Fluoranthene	3 (±0.2)
Fluorene	1.9 (±0.13)
Triphenylene	0.8 (±0.09)
Naphthalene	0.6 (±0.01)
Biphenyl	NR ^a
Dibenzofuran	NR ^a
Anthrone	NR ^a

^a NR, no reaction detected.

methylanthracene. Interestingly, recalcitrant and carcinogenic 5- and 6-aromatic rings PAHs were substrates for chloroperoxidase in the presence of hydrogen peroxide and chloride ions. Chloroperoxidase is able to perform a broad range of reactions, like the enantioselective epoxidation of alkenes (Zaks and Dodds, 1995), oxidation of phenolic pollutants (Aitken et al., 1994; Carmichael et al., 1983), oxygenation of sulfides (Colonna et al., 1990), oxidation of organophosphorus pesticides (Hernandez et al., 1998), and the PAH–DNA adduct formation (Marquez-Rocha et al., 1997), to give only a few examples. In addition, CPO is able to oxidize very complex molecules, such as asphaltenes (Fedorak et al., 1993) and complex mixtures such as petroleum distillates (Ayala et al., 1998). Thus this halogenating enzyme is the most versatile enzymatic hemoprotein. Other halogenases are also able to perform halogenations, mainly chlorination, on a variety of substrates (Neidleman, 1975; Vollenbroek et al., 1995).

The chemical nature of the reaction products was determined by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The mass spectra of the products from the enzymatic reaction with acenaphthene, anthracene, biphenylene, fluorene, phenanthrene, pyrene, and triphenylene are shown in Table 2. Monochlorinated, dichlorinated and trichlorinated compounds were found (Fig. 1), and they showed major ions at $m/z = [M^+] - 35$, $m/z = [M^+] - 70$, and $m/z = [M^+] - 105$, respectively. No oxygen incorporation was detected in any of the products from the CPO-mediated reactions. In addition, no reaction could be detected with any PAH tested under peroxidase activity conditions (pH 5.0 and in the absence of chlorine ions). Significant information is available on the toxicity of chlorinated aromatic compounds, such as polychlorophenols (International

Table 2
Mass spectral data of the products from the chloroperoxidase-mediated reaction on aromatic compounds

Substrate	Product	Mass spectral ions (m/z) ^{a,b}
Acenaphthene	Dichloroacenaphthene	224 (39), 222 (64) [M ⁺], 187 (100), 152 (95), 93 (17), 75 (24).
	Trichloroacenaphthene	258 (57), 256 (81) [M ⁺], 221 (66), 186 (100), 150 (50), 110 (27), 98 (18), 75 (23).
Anthracene	9,10-Dichloroanthracene	248 (68), 246 (100) [M ⁺], 176 (43), 87 (10).
Biphenylene	Dichlorobiphenylene	222 (64), 220 (100) [M ⁺], 185 (17), 150 (45), 75 (11).
	Trichlorobiphenylene	258 (30), 256 (93), 254 (100) [M ⁺], 219 (13), 184 (49), 149 (14), 74 (10).
Fluorene	Dichlorofluorene	238 (25), 237 (7), 236 (40) [M ⁺], 201 (31), 199 (18), 166 (63), 165 (100), 164 (17), 163 (24), 100 (11), 82 (35).
Phenanthrene	Chlorophenanthrene	214 (32), 213 (16) [M ⁺], 212 (100), 177 (20), 176 (55), 175 (11), 174 (10), 151 (14), 150 (14), 106 (17), 88 (33), 87 (11), 75 (13).
Pyrene	Chloropyrene	238 (31), 236 (100) [M ⁺], 200 (34), 100 (12).
	Dichloropyrene	272 (62), 270 (100) [M ⁺], 235 (11), 200 (53), 135 (12), 100 (23).
Triphenylene	Chlorotriphenylene	265 (7), 264 (34), 263 (21) [M ⁺], 262 (100), 227 (14), 226 (63), 225 (16), 224 (23), 200 (11), 132 (9), 131 (20), 113 (56), 112 (43), 100 (21), 99 (12), 87 (9).

^a Values in parentheses are relative abundances.

^b [M⁺] molecular ion.

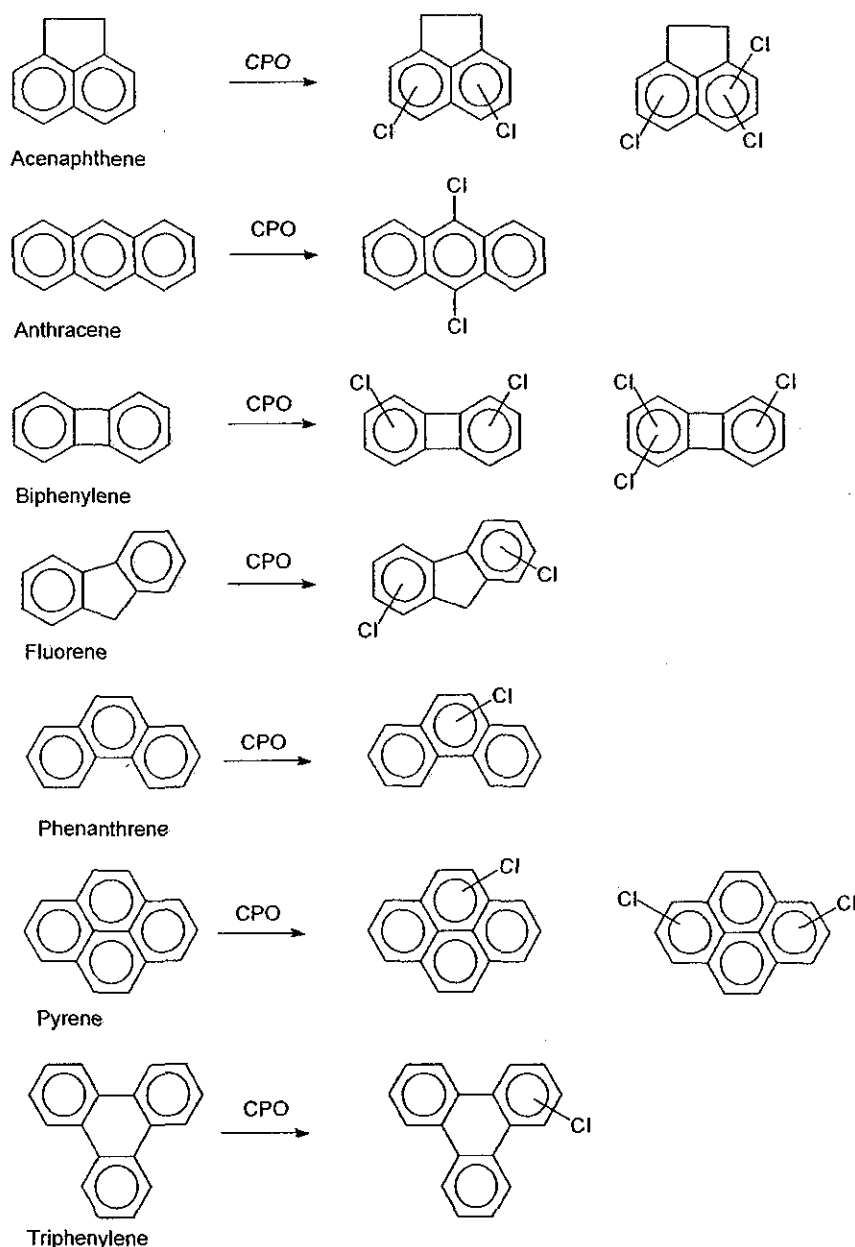


Fig 1. Chlorinated products from the enzymatic halogenation of aromatic compounds by chloroperoxidase in the presence of hydrogen peroxide and chloride ions.

Agency for Research on Cancer, 1999) and PCBs (Robinson, 1998; Wiegel and Wu, 2000), and to a less extent, on the toxicity of chlorinated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. Chlorinated PAHs have been tested for mutagenic activity by the Ames test on *Salmonella typhimurium* (Colmsjö et al., 1984; Johnsen et al., 1989). Chlorinated fluorene, flouranthene and benzo(a)pyrene acted as strong mutagens both in the presence and in the absence of metabolic activation, while only benzo(a)pyrene showed mutagenic activity as parent hydrocarbon. Mono- and di-chloropyrene isomers showed from 40 to 4000 times higher mutagenic

activity than 1-nitropyrene and pyrenoquinones, respectively. On the other hand, a mixture of chlorinated chrysene isomers was considerably more potent than the parent hydrocarbon in terms of embryoletality and cytochrome P450 induction (7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase and aryl hydrocarbon hydroxylase) (Gustafsson et al., 1994). The chlorinated chrysene caused anomalies, including edema and beak defects, similar to those reported after treatment of chick embryos with coplanar PCBs. These effects of the chlorinated mixture were mainly accounted for by 6-chlorochrysene and 6,12-dichlorochrysene. Chloronaphthalene was 5000-times

more potent than naphthalene for the inhibition of mitochondrial respiration in molar basis (Beach and Harmon, 1992). Monochloronaphthalene represent a risk for human health (Tsunenar et al., 1982) and for aquatic organisms (Ward et al., 1981).

3. Conclusions

Chloroperoxidase from the imperfect fungus *Caldariomyces fumago* is the most versatile enzyme in the hemoprotein family (Yi et al., 1999). CPO performs halogenase, peroxidase, catalase and cytochrome P450-like reactions. However, under our reaction conditions and with PAHs as substrates, CPO only acts as halogenase and no oxygenated products could be detected. In contrast, peroxidase activity on aromatic compounds produces mainly quinones, such as in the case of lignin peroxidase (Hammel et al., 1986; Vazquez-Duhalt et al., 1994) and manganese peroxidase (Bogan et al., 1996).

Caldariomyces fumago has been isolated from damp sites and also has been reported as a marine fungus (Dawson and Sono, 1987; Colonna et al., 1999). Chloroperoxidase, as other halogenases, is an extracellular enzyme that can react with a variety of substrates in the microbial environment. This enzyme is able to catalyze PAH-DNA adduct formation in vitro (Marquez-Rocha et al., 1997), suggesting the production of genotoxic aromatic intermediates. The present work shows that the transformation of aromatic pollutants into chlorinated derivatives by microbial enzymes may occur in polluted sites. This biocatalytic process should be considered because the toxicity and environmental impact of aromatic compounds may be increased.

4. Experimental

4.1. Chemicals

Purified CPO [EC 1.11.1.10] from *C. fumago* 89362 (Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK) was produced in a fructose medium and purified according to Pickard et al. (1991); all preparations used in this study had an $R_z = 1.36$, which corresponds to 95% purity. Hydrogen peroxide and buffer salts were obtained from J.T. Baker (Phillisburg, NJ). Polycyclic aromatic hydrocarbons were purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). HPLC-grade acetonitrile and methylene chloride were purchased from Fisher Scientific (Springfield, NJ).

4.2. Reaction rate measurements

Reactions were carried out in a 1-ml reaction mixture containing 20 μM substrate and 15% acetonitrile in a 60

mM acetate buffer, pH 3.0, with 20 mM KCl at room temperature. From 0.4 pmol to 0.2 nmol of the purified enzyme were used in the mixtures. Reactions were started by addition of 1 mM H_2O_2 and monitored by HPLC. Reaction rates were measured from the differences in peak area after 10 min and referred to the purified protein concentration for specific activity calculations. Reported values are the mean of three replicates. Specific reaction rates are given as mol of substrate converted per mol of enzyme per minute or simply in min^{-1} . Reactions for 5 and 6 aromatic rings PAHs 7,12-dimethylbenzanthracene, benzo[a]pyrene, 7-methylbenzo[a]pyrene, benzo[ghi]perylene and perylene were also monitored by fluorescence spectrum, with an excitation at 300 nm, in a Luminescence spectrometer, Perkin-Elmer, Model LS 50, during 2 min at 25 °C. The CPO activity was measured as the disappearance of the respective maximum emission peak for each PAH over a two minute reaction.

4.3. Analytical methods

Substrate concentration was measured in a Perkin-Elmer (series 200) HPLC system, using a C_{18} Hypersyl 5 μm Hewlett-Packard column eluted with an acetonitrile–water (70:30 v/v) solvent mixture. Substrate and product detection was carried out using a diode array detector coupled to the HPLC system. Product identification was performed in a Hewlett-Packard GC (model 6890)-MS (model 5972) equipped with a SPB-20 column (30 $\text{m} \times 0.25$ mm, Supelco). The temperature program started at 100 °C for 2 min; the temperature was raised to 290 °C at a rate of 8 °C/min and kept at 290 °C for 10 min.

Acknowledgements

This work was supported by The National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT grant 33611-U) and by The Mexican Oil Institute (grant FIES 98-110-VI).

References

- Aitken, M.D., Massey, I.J., Chen, T., Heck, P.E., 1994. Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Wat. Res.* 28, 1879.
- Ayala, M., Tinoco, R., Hernandez, V., Bremauntz, P., Vazquez-Duhalt, R., 1998. Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel Processing Technol.* 57, 101–111.
- Beach, A.C., Harmon, H.J., 1992. Additive effects and potential inhibitory mechanism of some common aromatic pollutants on in vitro mitochondrial respiration. *J. Biochem. Toxicol.* 7, 155–161.
- Bogan, B.W., Lamar, R.T., Hammel, K.E., 1996. Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependant lipid peroxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1788–1792.

- Carmichael, R., Fedorak, P.M., Pickard, M.A., 1983. Oxidation of phenols by chloroperoxidase. *Biotechnol. Lett.* 7, 284–294.
- Chaudhry, G.R., Chapalamadugu, S., 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* 55, 59–79.
- Colmsjo, A., Rannug, A., Rannug, U., 1984. Some chloro derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons are potent mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 135, 21–29.
- Colonna, S., Gaggero, N., Richelmi, C., Pasta, P., 1999. Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *Trends Biotechnol.* 17, 163–168.
- Colonna, S., Gaggero, N., Manfredi, A., Casella, L., Gullotti, M., Carrea, G., Pasta, P., 1990. Enantioselective oxidations of sulfides catalyzed by chloroperoxidase. *Biochemistry* 29, 10465–10468.
- Dawson, J.H., Sono, M., 1987. Cytochrome P-450 and chloroperoxidase: thiolate-ligand heme enzymes. Spectroscopic determination of their active site structures and mechanistic implications of thiolate ligand. *Chem. Rev.* 87, 1255–1270.
- de Jong, E., Field, J.A., 1997. Sulfur tuft and turkey tail: biosynthesis and biodegradation of organohalogens by Basidiomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 375–414.
- Evangelista de Duffard, A.M., Duffard, R., 1996. Behavioral toxicology, risk assessment, and chlorinated hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.* 104 (2), 353–360.
- Fedorak, P.M., Semple, K.M., Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S., 1993. Chloroperoxidase-mediated modifications of porphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 429–437.
- Giesy, J.P., Kannan, K., 1998. Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 511–569.
- Gustafsson, E., Brunstrom, B., Nilsson, U., 1994. Lethality and EROD-inducing potency of chlorinated chrysene in chick embryos. *Chemosphere* 29, 2301–2308.
- Hammel, K.E., Kalyanaraman, B., Kirk, T.K., 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo(p)dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261, 16948–16952.
- Hernandez, J., Robledo, N.R., Velasco, L., Quintero, R., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R., 1998. Chloroperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus pesticides. *Pest. Biochem. Physiol.* 61, 87–94.
- International Agency for Research on Cancer, 1999. Polychlorophenols and their sodium salts. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals on Humans. 71 (2), 769–816.
- Johnsen, S., Gribbestad, I.S., Johansen, S., 1989. Formation of chlorinated PAH: a possible health hazard from water chlorination. *Sci. Total Environ.* 81–82, 231–238.
- Marquez-Rocha, F.J., Pica-Granados, Y., Sandoval-Villasana, A.M., Vazquez-Duhalt, R., 1997. Determination of genotoxicity using a chloroperoxidase-mediated model of PAH-DNA adduct formation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 788–795.
- Neidleman, S.L., 1975. Microbial halogenation. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 3, 333–358.
- Pickard, M.A., Kadima, T.A., Carmichael, R.D.J., 1991. Chloroperoxidase a peroxidase with potential. *Ind. Microb.* 7, 235–242.
- Robinson, G.K., 1998. (Bio)remediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): problems, perspectives and solutions. *Biochem. Soc. Trans.* 26, 686–690.
- Sundaramoorthy, M., Terncr, J., Poulos, T.L., 1995. The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure* 3, 1367–1377.
- Tilson, H.A., Kodavanti, P.R., 1998. The neurotoxicity of polychlorinated biphenyls. *Neurotoxicology* 19, 517–525.
- Tsunenar, S., Yonemitsu, K., Uchimura, Y., Takacsu, H., Kamisato, M., 1982. A rare fetal case of wood preservative, monochloronaphthalene (MCN), poisoning. *Forensic Sci. Int.* 20, 173–178.
- van Pec, K.H., Keller, S., Wage, T., Wynands, I., Schnerr, H., Zehner, S., 2000. Enzymatic halogenation catalyzed via a catalytic triad and by oxidoreductases. *Biol. Chem.* 381, 1–5.
- 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, 459–466.
- Vollenbrock, E.G., Simons, L.H., van Schijndel, J.W., Barnett, P., Balzar, M., Dekker, H., van der Linden, C., Wever, R., 1995. Vanadium chloroperoxidases occur widely in nature. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 267–271.
- Ward, G.S., Parrish, P.R., Rigby, R.A., 1981. Early life stage toxicity test with a saltwater fish: effects of eight chemicals on survival growth, and development of sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). *J. Toxicol. Environ. Health* 8, 225–240.
- Wiegel, J., Wu, Q., 2000. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 1–15.
- Yi, X., Mroczko, M., Manjol, K.M., Wang, X., Hager, L.P., 1999. Replacement of the proximal heme thiolate ligand in chloroperoxidase with a histidine residue. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96, 12412–12417.
- Zaks, A., Dodds, D.R., 1995. Chloroperoxidase asymmetric oxidations: Substrate specificity and mechanistic study. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10419–10424.



ELSEVIER

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 16 (2001) 159–167



www.elsevier.com/locate/molcatb

Spectroscopic characterization of a manganese–lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera adusta* in the absence of manganese: evidence of a protein centred radical by hydrogen peroxide

M. Ayala Aceves^b, M.C. Baratto^a, R. Basosi^a, R. Vazquez-Duhalt^b, R. Pogni^{a,*}

^a Department of Chemistry, University of Siena, Via A. Moro, 53100-I Siena, Italy

^b Instituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62271, Morelos, Mexico

Received 29 May 2001; received in revised form 31 August 2001; accepted 31 August 2001

Abstract

Electronic absorption and electron paramagnetic resonance (EPR) spectra are reported for a novel manganese–lignin peroxidase (MnLiP) hybrid isozyme produced by *Bjerkandera adusta* in the absence of manganese at pH 5. The room temperature absorption and the low temperature (10 K) EPR spectra indicate that the same coordination and spin states are present at both temperatures: mainly six coordinate high spin containing low percentage six coordinate low spin ferric heme, the latter probably with a bis-imidazole coordination. A protein centred radical was detected in the presence of an excess of hydrogen peroxide and assumed to be a tryptophanyl radical. The catalytic significance of this site was addressed by specific chemical modification of the tryptophan residues that revealed a marked effect on the specific activity of the enzyme. It is proposed that substrate oxidation might proceed through a long range-electron transfer process. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: EPR; Spin state; Heme protein; Peroxidase; Protein radical

1. Introduction

The biodegradation of lignin, a major constituent of wood, is far from being fully elucidated. White rot fungi, with a complex enzymatic system, contribute in the recycling of this biopolymer in nature. Several

extracellular enzymes from these ligninolytic fungi are involved in the degradation of lignin polymer. Among these enzymes, lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) from *Phanerochaete chrysosporium* have been extensively studied [1,2]. The catalytic cycle for both enzymes is similar to that of other heme peroxidases and begins with a two-electron oxidation of the heme prosthetic group by hydrogen peroxide yielding compound I. These two oxidizing equivalents are then sequentially transferred to substrate molecules. One of the oxidizing equivalents of compound I is located on the heme iron atom, leading to the formation of an oxyferryl iron(IV) centre. However, differences have been noted with

Abbreviations: LiP, lignin peroxidase; MnP, manganese peroxidase; MnLiP, manganese–lignin peroxidase hybrid; HS, high spin; LS, low spin; 6c-HS, hexacoordinated high spin; 5c-HS, penta-coordinated high spin; NBS, *N*-bromosuccinimide; BSA, bovine serum albumin; VA, veratryl alcohol

* Corresponding author. Tel.: +39-0577-23-4258;

fax: +39-0577-23-4239.

E-mail address: pogni@unisi.it (R. Pogni).

respect to the second one. In all, peroxidases characterized up to date, the UV–VIS and resonance Raman (RR) spectroscopy have provided evidence that the second oxidizing equivalent is in fact a porphyrin π radical cation [3] except in cytochrome c peroxidase (CcP). In this case the radical resides on a tryptophan residue in the vicinity of the proximal histidine [4].

Although the exact mechanism of lignin degradation is not fully understood, it has been proposed that in vivo the process by which LiP and MnP attack the lignin polymer is different. LiP directly interacts with its substrates to form radical cations whereas MnP oxidizes Mn(II) to Mn(III), which in turn acts as a diffusible oxidizing intermediate [5].

Recently, two novel fungal peroxidases belonging to class II of the plant peroxidase superfamily [6] were detected in the white rot fungi *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* [7,8]. Both enzymes are able to catalyze manganese-dependent as well as manganese-independent reactions. The manganese-dependent activity proceeds optimally at pH 5, while the manganese-independent reactions require more acidic conditions, showing maximum rates at pH 3. The catalytic intermediates seem to be the same in these enzymes, as they oxidize Mn(II) and aromatic substrates with comparable values of V_{\max} and K_m [8]. The biotechnological interest for the manganese–lignin peroxidase hybrid (MnLiP) from *B. adusta* lies in its ability to oxidize large substrate molecules in the absence of Mn(II).

Camarero et al. [9] suggested that MnLiP might be a structural hybrid, based on a comparison of a molecular model of the MnLiP structure from *P. eryngii* with the known structures of LiP and MnP from *P. chrysosporium*. This hybrid possesses a MnP-like Mn(II) binding site as well as a long range-electron transfer mechanism similar to that recently found for LiP [10]. Therefore, depending on the reaction conditions this enzyme would oxidize substrates unable to reach the heme pocket through the mediation of a diffusible, highly reactive intermediate or through an activated surface amino acid residue in the case of less accessible substrates [11].

The present results show that MnLiP from *B. adusta* exhibits a prevalent 6c-high spin ferric form with a low percentage of 6c-low spin probably due to a bis-imidazole co-ordination at both room

and low temperature. A protein centred radical was detected at room temperature in the presence of hydrogen peroxide, supporting the hypothesis of a long range-electron transfer mechanism for the oxidation of large molecules.

2. Experimental

Lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) from *P. chrysosporium* were obtained from Tienzyme, Inc. (Salt Lake City, UT). The partially purified hybrid peroxidase (MnLiP) from *B. adusta* UAMH 7308 ($R_z (A_{403}/A_{280}) = 1.3$) was kindly provided by Prof. M.A. Pickard, from the University of Alberta, Canada. Protein concentration was determined with BioRad reagent using BSA as standard. The molecular weight of the protein was estimated from a Coomassie-stained 10% SDS–PAGE gel and it is equal to 45 kDa. The single band in the gel shows that there is no contamination from other proteins in the preparation for this work (data not shown). 2-Methyl-2-nitroso propane (MNP) was purchased from Sigma (St. Louis, MO) and H_2O_2 from Fluka (Germany). All reagents were used without further purification.

EPR and UV–VIS measurements were performed on the native enzyme and the enzyme modified with *N*-bromo succinimide (NBS) [12]. EPR solutions of the native enzyme were prepared with a final concentration of 0.21 mM MnLiP and 2 mM H_2O_2 at pH 5. The chemical modification of Trp residues was done using NBS recrystallized from hot water just before use. To follow the effect on activity of the chemical modification of Trp, 0.2 ml of a 0.24 mM MnLiP solution were mixed with different molar excesses of NBS dissolved in water. After 2 min, the reaction was stopped by adding a 600-fold molar excess of Trp in water. To follow the decrease of Trp fluorescence at 315 nm, 2 ml of a 0.0015 mM MnLiP solution were mixed with increasing amounts of NBS dissolved in water, and after 1 min the emission spectra were recorded. For the EPR measurements, 1 ml of a 0.17 mM MnLiP solution was mixed with a 60-fold molar excess of NBS dissolved in water. The reaction was allowed to proceed for 2 min and stopped by adding 0.1 g tryptophan dissolved in water. The reaction mixtures were extensively washed

with 100 mM acetate buffer pH 4.5 in an ultrafiltration cell using a 10 kDa cutoff membrane, in order to remove substances that could interfere with the EPR and enzymatic assays.

Absorption spectra of a 0.005 mM solution of MnP, LiP and MnLiP were measured in 60 mM phosphate buffer pH 5. The Mn(II)-independent activity at different pH was estimated using hydroquinone as substrate. Reactions were performed in 60 mM phosphate buffer, pH 3 or 5, in the presence of 1 mM of hydroquinone and 0.1 mM H₂O₂. The reaction was started by adding H₂O₂ and followed by measuring the changes in absorbance at 247 nm ($\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). LiP and MnP activity were measured as reported elsewhere [13,14]. For LiP activity, the reaction mixture contained 40 mM succinate buffer pH 4, 4 mM veratryl alcohol (VA) and 0.4 mM hydrogen peroxide. The production of veratryl aldehyde was followed at 310 nm ($\epsilon = 9.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). For MnP activity, the reaction consisted of 50 mM malonate buffer pH 4.5, 0.1 mM manganese sulfate and 0.1 mM hydrogen peroxide. The production of the malonate-Mn³⁺ complex was monitored at 270 nm ($\epsilon = 11.59 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). For all reactions, the enzyme concentration was in the pH range.

UV-VIS measurements were performed on a Hewlett-Packard 8453 spectrophotometer. Fluorescence measurements were performed on a Perkin Elmer LS 50 Luminescence spectrometer, with an excitation wavelength of 285 nm, excitation slit = 8 nm and emission slit = 5 nm. EPR spectra were recorded on a Bruker 200D SRC instrument equipped with a microwave frequency counter XL (Jagmar, Krakow, Poland). The spectrometer was interfaced with a PS/2 technical instrument hardware computer and the data acquired using the EPR data system CS-EPR produced by Stelar Inc. (Mede, Italy). An Oxford instrument ESR 900 cryostat was used to obtain low temperatures. The spectra were recorded under non-saturating conditions at 10 K, 9.466 GHz microwave frequency, 10 mW microwave power and 1 mT modulation amplitude. Spectra were also recorded at 20 K and 80 mW. All samples were frozen rapidly by immersion of the EPR tube into liquid nitrogen. The spectrum at 120 K was recorded using an ER4111VT Bruker variable temperature unit, 9.565 GHz microwave frequency and 63 mW microwave power.

3. Results

Fig. 1 shows the electronic absorption spectrum at room temperature and pH 5 of the hybrid MnLiP from *B. adusta* compared with those of LiP and MnP from *P. chrysosporium*. The spectrum shows a Soret band at 409 nm, α and β bands at 579 (shoulder) and 541 nm, and two charge transfer bands at 501 nm (CT2) and 632 nm (CT1).

All the electronic absorption spectra reported in Fig. 1 show a CT1 band at 632 nm. The wavelength of the band in the 600–650 nm region is sensitive to the heme pocket environment [15]. This band, observed only in the high spin (HS) heme proteins, was assigned to a charge transfer transition (CT1) from the porphyrin to the iron [$a'_{2u}(\pi) \rightarrow e_g(d_\pi)$]. For the hexacoordinate (6c) proteins containing an imidazole as the fifth ligand, the CT1 ranges from 600–637 nm [16]. It has been suggested [15,17–19] that the room temperature electronic absorption spectra of MnP and LiP indicate that the heme iron is predominantly in the hexacoordinated HS state (6c-HS) with a water molecule bound at the sixth coordination position of the Fe atom. The close similarity of the absorption spectrum from MnLiP with those from MnP and LiP suggests that the major heme state of MnLiP is also 6c-HS. Furthermore, the presence of a low percentage of 6c-LS heme in MnLiP of bis-imidazole coordination is revealed by the pronounced β band at 541 nm and the α band at 579 nm, the latter being absent in the spectra of LiP and MnP.

Fig. 2a shows the X-band EPR spectrum of MnLiP at pH 5, recorded under non-saturating conditions (temperature 10 K, microwave power 10 mW). The spectrum is characterized by two distinct signals which indicate the coexistence in MnLiP of a HS species ($g = 6.00, 2.00$) and a small amount of LS species ($g = 3.15, 2.07$) at liquid helium temperature. The third value of the latter species is too weak to be observed. The feature at $g = 4.3$ corresponds to a non-heme iron impurity often seen in protein samples [20].

The LS signal was optimized at a temperature of 20 K and a microwave power of 80 mW as shown in Fig. 2b. Particular attention should be given to the signal at $g = 3.15$. Many model compounds and heme proteins which have bis-imidazole coordination have g values close to 3.0 or slightly lower [21,22].

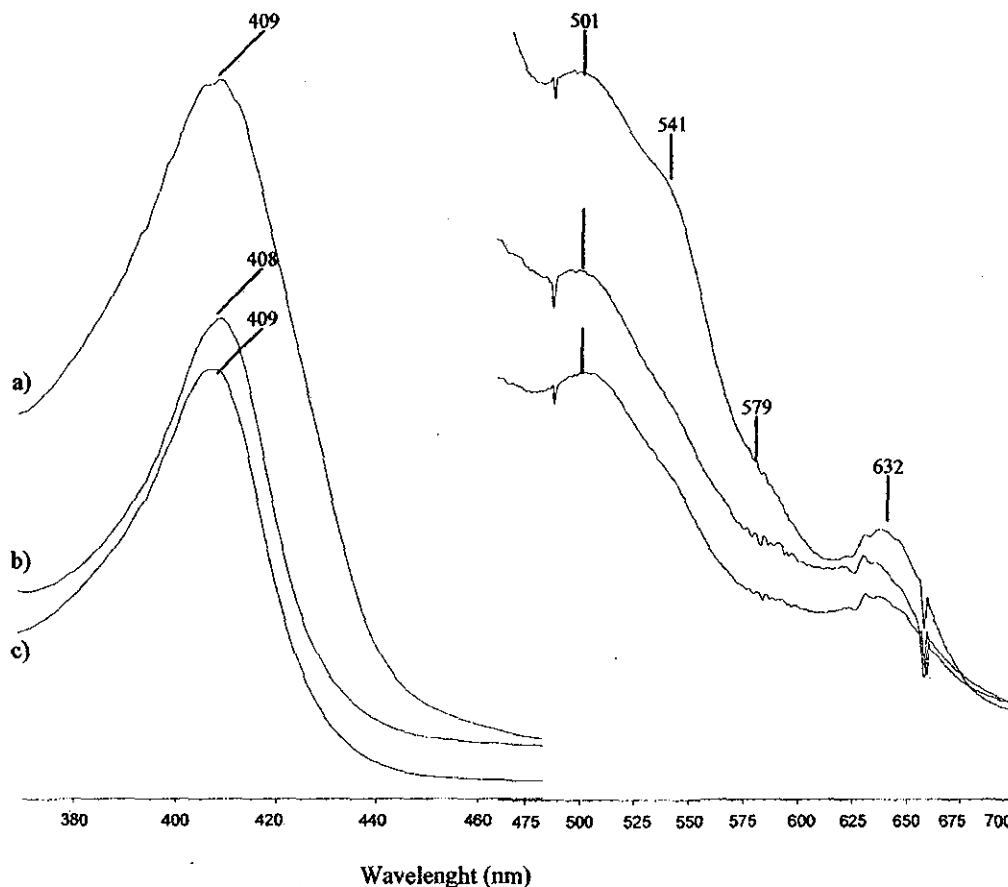


Fig. 1. Electronic absorption spectra of ferric (a) MnLiP, (b) LiP, (c) MnP obtained at room temperature in 60 mM phosphate buffer solution at pH 5. The region between 475–700 nm has been expanded.

Furthermore, a wide variety of membrane bound cytochromes b, which have bis-imidazole coordination, have $g > 3.0$. These large g values have been shown to result from a non-parallel orientation of the imidazole ligands [23–25]. The LS signal at $g = 3.15$ observed in our case supports the assignment of the LS species noted in the absorption spectra to a bis-imidazole complex from an endogenous ligand. Thus, the low temperature EPR and absorption measurements indicate that MnLiP has a similar heme environment at both temperatures, in which HS and LS species coexist in similar proportions. Consequently, it seems that the protein does not undergo a conformational change upon lowering the temperature, which would lead to a significant modification of the heme spin state proportions.

The addition of H_2O_2 to the enzyme solution shows the presence of an enzyme intermediate at both EPR liquid helium temperature and UV–VIS room temperature region (data not shown). The UV–VIS spectrum of this intermediate is similar to those reported for compound I from other peroxidases [26,27]. The signal of this intermediate is stable for at least 4 min, after which the spectrum spontaneously begins to slowly revert to that of the native enzyme. The room temperature EPR spectrum of a protein centred radical with a $g_{iso} = 2.005$ is reported in Fig. 3a. Although the signal is clearly evident, it is characterized by a very rapid decrease in intensity, indicative of a short lifetime species. The spectrum reveals superhyperfine structure that becomes more evident in the second derivative display, as evidenced

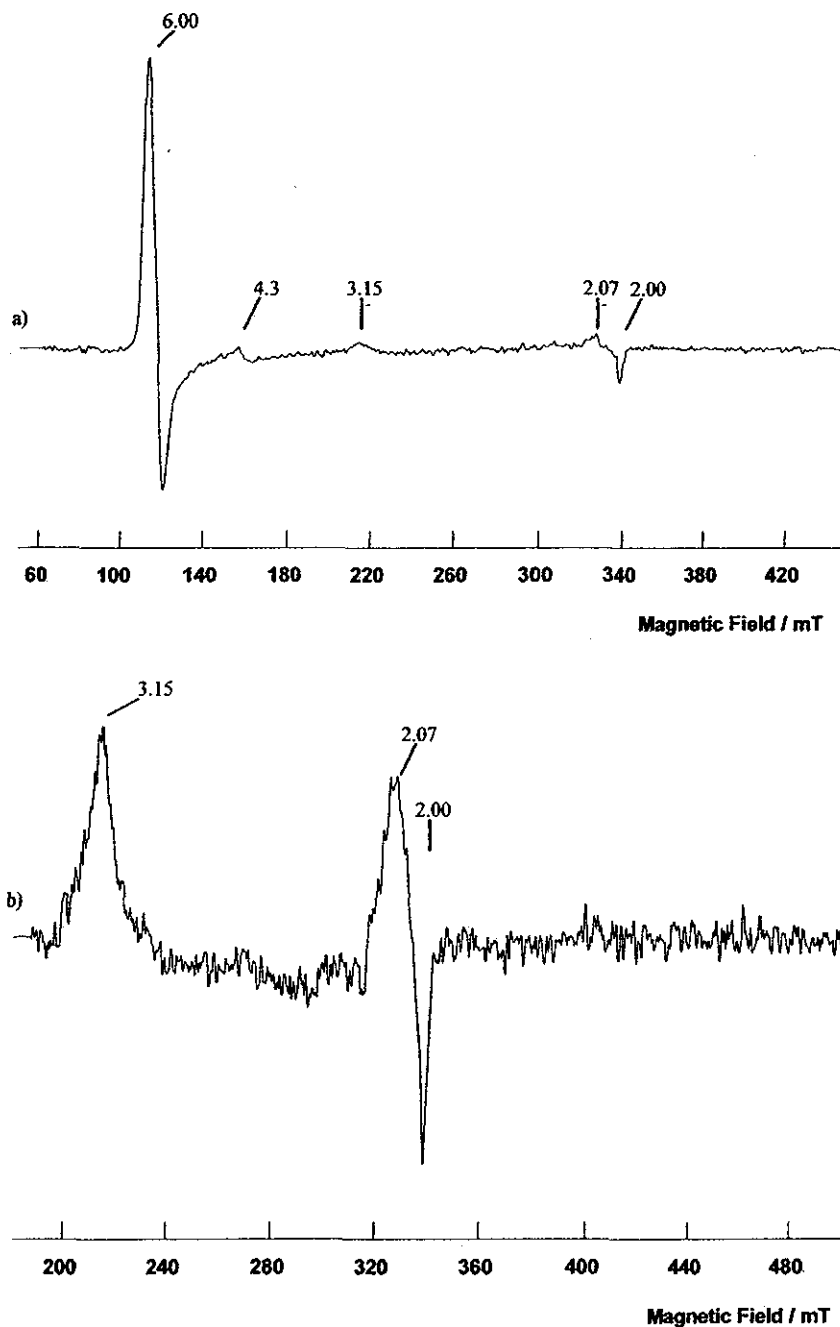


Fig. 2. X-band EPR spectra of the ferric iron MnLiP in 60 mM phosphate buffer solution at pH 5 (a) recorded at 10 K with 1 mT modulation amplitude, 10 mW power and $\nu = 9.466$; (b) recorded at 20 K with 1 mT modulation amplitude, 80 mW power and $\nu = 9.464$.

previously by others [28]. In Fig. 3b the same radical at nitrogen temperature is reported. The reaction was performed in the absence of Mn(II) ions at acidic pH.

To investigate the role of a Trp residue in the protein centred radical, a chemical modification of the Trp residues of MnLiP was performed. Table 1 shows the specific activity of MnLiP with hydroquinone at two

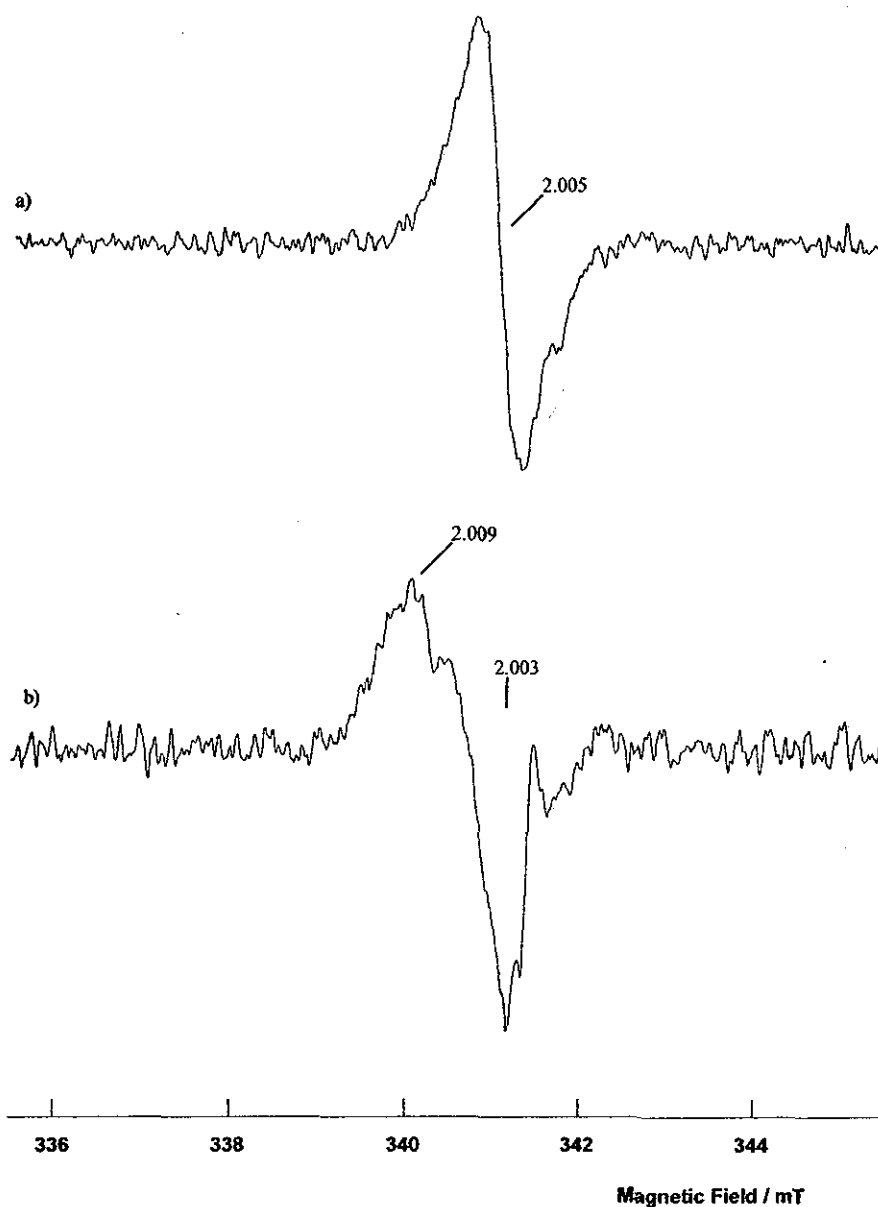


Fig. 3. X-band EPR spectra of the protein centred radical of MnLiP in 60mM buffer solution at pH 5 recorded at (a) 298 K, $\nu = 9.5716$ and (b) 120 K, $\nu = 9.5652$. The spectra were recorded with 0.02 mT modulation amplitude and 63 mW power.

Table 1
Enzymatic activity of the hybrid peroxidase from *B. adusta*

Substrate	Specific activity (min^{-1})
Hydroquinone, pH 3	16.4 (± 0.8)
Hydroquinone, pH 5	4.5 (± 0.2)
Veratryl alcohol	263 (± 13)
Manganese(II)	2847 (± 142)

different pH. As expected, the Mn(II)-independent activity is higher at low pH values. The MnP-like activity and the LiP-like activity are reported as well. Although the enzyme catalyzes both Mn(II)-dependent and Mn(II)-independent reactions, it is more efficient when Mn(II) is used as substrate. Fig. 4 shows the changes in fluorescence at 315 nm and the decrease in

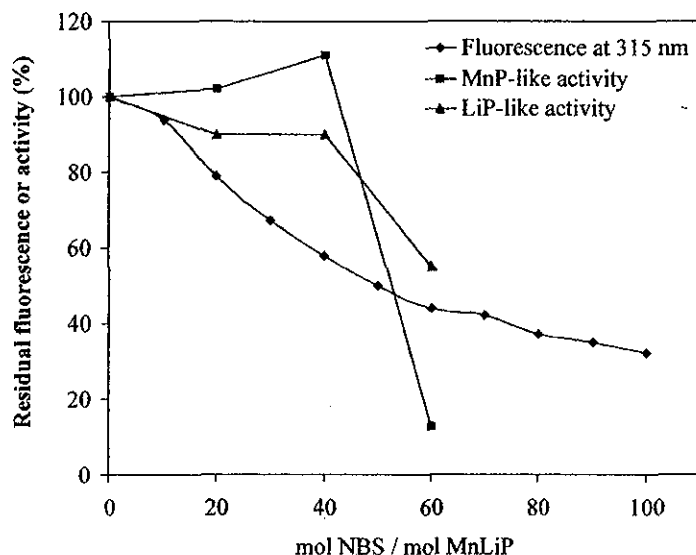


Fig. 4. Effect of the enzymatic activity and fluorescence reduction of the NBS modified Trp residues in MnLiP.

enzymatic activity as the molar excess of NBS over MnLiP increases. Although the chemical modification of Trp lowers both the MnP-like and the LiP-like activities, a more pronounced effect is observed on the Mn(II)-independent activity. This indirect evidence also supports the hypothesis of a tryptophanyl radical involved in the catalytic cycle of this enzyme.

4. Discussion

The crystal structures and the available sequence alignments show that the heme active sites of peroxidases share many common features. The conserved functional residues on the distal (His, Arg, Asn) and proximal (His, Asp) sides are linked by a hydrogen bond network, mediated by polar residues and water molecules, connecting the proximal and the distal sides of the heme. Nevertheless, small structural variations from one type of peroxidase to another which modulate the strength of the axial histidine hydrogen bond could easily account for the considerable range of midpoint potentials found for this class of enzymes [29]. Normally the heme iron is pentacoordinate at room temperature, an exception being LiP and its various isozymes which have a water molecule located close to the heme iron, giving rise to a 6c-HS heme [15,18,19].

The percentage of a 6c-LS form in MnLiP distinguishes this enzyme with respect to LiP and MnP. The presence of a 6c-LS species is confirmed by EPR at liquid helium temperature (Fig. 2a and b), thus revealing the same coordination at both temperatures. The signal at $g = 3.15$ indicates that this LS species might be assigned to a bis-imidazole complex. Such large g values have been shown to arise from a non-parallel orientation of the imidazole ligands [23,30]. Crystal field and thermodynamic analysis, based upon reasonable estimates of the tetragonal and rhombic splittings of the d orbitals of low spin Fe(III) porphyrins, suggest that perpendicular alignment of planar axial ligands could lead to a positive shift in redox potential of about 50 mV over that observed for parallel alignment, all other structural and environmental factors being equal [30].

The ability of MnLiP to oxidize large substrates prompted the hypothesis that different sites in the protein were involved in the oxidation of the substrate. In a recent work by Doyle et al. [10] two distinct substrate interaction sites in LiP were postulated. One was a heme-edge site typical of those encountered in other peroxidases. The second one was a novel site centred around Trp 171 which is required for the oxidation of VA even if, until now, this latter protein radical has not been directly detected. Considering the structural homology of MnLiP from *Pleurotus*

eryngii with LiP and MnP from *P. chrysosporium* for which crystal structure data are available [18,19,31], the substrate access channel and heme appear relatively inaccessible suggesting that the classical heme-edge site may not be the only site for substrate interaction [9]. The presence of a tryptophan residue exposed to the solvent and in close proximity to the heme might be a probable site for the oxidation of substrates.

A long-range electron transfer pathway in the presence of H_2O_2 was envisaged based on the structural homology with LiP, where Trp 171 participates in the oxidation of VA [8]. Our results show that at room temperature a radical is formed ($g = 2.005$) in the presence of excess hydrogen peroxide (Fig. 3a). The signal intensity decreases very rapidly, indicative of a short lifetime. The spectrum has been obtained at room temperature performing the reaction with an excess of hydrogen peroxide, even if the formation of the radical is evident also for an equivalent quantity of hydrogen peroxide with respect to the protein. Our attempts to highlight the protein radical adduct with the 2-methyl-2-nitroso propane (MNP) spin trap were prevented [11,29,32]. The protein radical might be a Trp with a similar role to that of Trp 171 in LiP. The C3 of the indolyl radical cation is generally believed to be the prime target of a spin trap like MNP or dioxygen, since this is the site of the highest spin density in tryptophan radicals. In LiP the positions of the pyrrole moiety of the Trp 171 indole ring are hardly accessible by the solvent in contrast with the benzene ring that becomes more accessible site giving an adduct that promptly becomes diamagnetic [11]. The structural model of MnLiP from *P. eryngii* was examined and two Trp residues (Trp 250 and Trp 170) were identified. Both tryptophans are on the proximal side of the protein, the Trp 250 is buried inside while the Trp 170 is solvent exposed via the benzene ring, in close proximity of the heme and Ser 174 that is bound to the proximal His 175.

To probe the localization of the radical on MnLiP tryptophan residues a chemical modification of the peroxidase from *B. adusta* was undertaken using the tryptophan-specific agent NBS. For LiP, it was reported [12] that the activity decreased when from 10- to 25-fold molar excess of NBS was added to reach a constant value of $\sim 15\%$ residual activity at ~ 30 -fold excess of reagent. The change in activity was

accompanied by a reduction of tryptophan fluorescence because oxindoles are non-fluorescent. The loss of about one-third of the initial fluorescence intensity was achieved with five equivalents of NBS while the activity was slightly affected. This could be attributed to the modification of a surface tryptophan residue (Trp 170). The second stage of the modification required higher amounts of NBS, and resulted in the loss of most of the activity and roughly another third of the initial fluorescence. The remaining emission was attributed to a tryptophan buried inside the protein (Trp 250) [12].

With MnLiP from *B. adusta* the fluorescence at 315 nm diminished as higher amounts of NBS were added (Fig. 4). This is indicative of chemical modification of the solvent exposed Trp residues in the protein. The enzymatic activity decreases when a 60-fold molar excess of NBS reacts with the protein. The Mn(II)-independent activity is drastically reduced and consequently the enzyme retains only 15% of its original activity. On the other hand, the Mn(II)-dependent activity is reduced to 55% of its original value. No EPR radical signals were detected with this chemically modified sample, showing that solvent exposed tryptophan residues are important for the formation of the protein radical.

These findings strongly suggest a mechanism in which a protein radical is formed on a Trp residue of MnLiP in the presence of H_2O_2 and in the absence of Mn(II). When Trp residues are chemically oxidized, no electrons can be extracted from the Trp residue and thus the radical cannot be formed. Consequently, the oxidation of the substrate at this site cannot be accomplished. Nevertheless, the oxidation pathway at the Mn(II)-binding site is still available.

The EPR low temperature (120K) spectrum of the MnLiP radical (Fig. 3b) differs from that at room temperature (Fig. 3a) displaying a slightly axial symmetry with an apparent $g_{\parallel} > g_{\perp}$, which is similar to that obtained for the Trp 191 free radical species of wild-type CcP [28]. The radical signal is difficult to saturate even at 10K, which is again similar to the behaviour of the Trp 191 radical of wild-type CcP, and thus it is presumably coupled to the $S = 1$ oxyferryl heme iron centre [33].

In conclusion, the UV-VIS absorption and EPR spectra show the presence of a percentage of 6c-LS species for MnLiP that might result from a

bis-imidazole complex, very likely due to the distal histidine becoming bound to the sixth coordination site of the iron atom. MnLiP from *B. adusta* described here is truly a hybrid peroxidase, as it possesses two oxidation pathways. One pathway resembles that of MnP and it proceeds through the oxidation of Mn(II) to the highly reactive Mn(III). A second different pathway resembles that of LiP and it involves the formation of a solvent exposed protein radical. To our knowledge, it is the first time that a protein centred radical has been directly detected by EPR in the presence of hydrogen peroxide at room temperature for a ligninolytic peroxidase, demonstrating the key role played by this site in the oxidation of substrates by a long range-electron transfer. The importance of Trp residues in both peroxidase activity and protein radical formation has been demonstrated by the specific chemical modification of Trp residues, even if further characterization of the free radical site is under way.

This is the fourth enzyme, together with CcP, DNA photolyase [34] and LiP [11], in a group of unique enzymes that display an active Trp required for the transformation of natural substrates.

Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge Prof. M.A. Pickard, for generous supply of MnLiP by Bjerkandera *Adusta* and Dr. B.D. Howes for technical assistance and useful discussion. This work was funded by Cofin MURST CFSIB 97 and C.N.R. "Biotecnologie e Biologia Molecolare" n. 98.01066.CT14, and by the Mexican Council of Sciences and Technology (Conacyt 33611-U).

References

- [1] M. Tien, T.K. Kirk, *Science* 221 (1983) 661.
- [2] M. Kuwahara, J.K. Glenn, M.A. Morgan, M.H. Gold, *FEBS Lett.* 169 (1984) 247.
- [3] A. Khindaria, S.D. Aust, *Biochemistry* 35 (1996) 13107.
- [4] M. Sivaraja, D.B. Goodin, M. Smith, B.M. Hoffman, *Science* 245 (1989) 738.
- [5] L. Banci, S. Cioffi-Baffoni, M. Tien, *Biochemistry* 38 (1999) 3205.
- [6] K.G. Welinder, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1992) 388.
- [7] T. Mester, J.A. Field, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 15412.
- [8] A. Heinfling, F.J. Ruiz-Dueñas, M.J. Martinez, M. Bergbauer, U. Szewzyk, A.T. Martinez, *FEBS Lett.* 428 (1998) 141.
- [9] S. Camarero, S. Sakar, F.J. Ruiz-Duenas, M.J. Martinez, A.T. Martinez, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 10324.
- [10] W.A. Doyle, B. Blodig, N.C. Veitch, K. Piontek, A. Smith, *Biochemistry* 37 (1998) 15097.
- [11] W. Blodig, A.T. Smith, K. Winterhalter, K. Piontek, *Arch. Biochem. Biophys.* 370 (1999) 86.
- [12] W. Blodig, W.A. Doyle, A.T. Smith, K. Winterhalter, T. Choinowski, K. Piontek, *Biochemistry* 37 (1998) 8832.
- [13] M. Tien, K. Kirk, *Meth. Enzymol.* 161 (1988) 238.
- [14] H. Wariishi, K. Valhi, M. Gold, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 23688.
- [15] G. Smulevich, *Biospectroscopy* 4 (1998) S3.
- [16] G. Smulevich, F. Neri, M.P. Marzocchi, K.G. Welinder, *Biochemistry* 35 (1996) 10576.
- [17] J.K. Glenn, M.H. Gold, *Arch. Biochem. Biophys.* 242 (1985) 329.
- [18] T.L. Poulos, S.L. Edwards, H. Wariishi, M.H. Gold, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 4429.
- [19] K. Piontek, T. Glumoff, K. Winterhalter, *FEBS Lett.* 315 (1993) 119.
- [20] W.E. Blumberg, J. Peisach, B.A. Wittenberg, J.B. Wittenberg, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 1854.
- [21] W.E. Blumberg, J. Peisach, in: C.B.T. Yonetani, A.S. Mildvan (Eds.), *Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1971, p. 215.
- [22] B.D. Howes, A. Feis, C. Indiani, M.P. Marzocchi, G. Smulevich, *J. Biol. Inorg. Chem.* 5 (2000) 227.
- [23] F.A. Walker, B.H. Huynh, W.R. Scheidt, S.R. Osvath, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 5288.
- [24] F.A. Walker, *Coord. Chem. Rev.* 185/186 (1999) 471.
- [25] C. Indiani, A. Feis, B.D. Howes, M.P. Marzocchi, G. Smulevich, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (2000) 7368.
- [26] A. Tuynman, M.K.S. Vink, H.L. Dekker, H.E. Schoemaker, R. Wever, *Eur. J. Biochem.* 258 (1998) 906.
- [27] W.D. Hewson, L.P. Hager, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 3182.
- [28] H. Hori, T. Yonetani, *J. Biol. Chem.* 260 (1) (1985) 349.
- [29] D.B. Goodin, D.E. McRee, *Biochemistry* 32 (1993) 3313.
- [30] G.T. Babcock, W.R. Widger, W.A. Cramer, W.A. Oertling, J.G. Metz, *Biochemistry* 24 (1985) 3638.
- [31] M. Sundaramoorthy, K. Kishi, M.H. Gold, T.L. Poulos, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 32759.
- [32] R. Pogni, G. Della Lunga, E. Busi, R. Basosi, *Int. J. Quant. Chem.* 73 (1999) 249.
- [33] J.E. Huyett, P.E. Doan, R. Gurbiel, A.L.P. Houseman, M. Sivaraja, D.B. Goodin, B.M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 9033.
- [34] J. Stubbe, W.A. Van der Donk, *Chem. Rev.* 98 (1998) 705.

Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes

Review

Brenda Valderrama,¹ Marcela Ayala,
and Rafael Vazquez-Duhalt
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México
AP 510-3 Cuernavaca
Morelos 62250
México

As the number of industrial applications for proteins continues to expand, the exploitation of protein engineering becomes critical. It is predicted that protein engineering can generate enzymes with new catalytic properties and create desirable, high-value, products at lower production costs. Peroxidases are ubiquitous enzymes that catalyze a variety of oxygen-transfer reactions and are thus potentially useful for industrial and biomedical applications. However, peroxidases are unstable and are readily inactivated by their substrate, hydrogen peroxide. Researchers rely on the powerful tools of molecular biology to improve the stability of these enzymes, either by protecting residues sensitive to oxidation or by devising more efficient intramolecular pathways for free-radical allocation. Here, we discuss the catalytic cycle of peroxidases and the mechanism of the suicide inactivation process to establish a broad knowledge base for future rational protein engineering.

Introduction

Redox reactions require a small but steady supply of oxidative species. In particular, physiological amounts of hydrogen peroxide, and of other reactive oxygen species, are generated during normal cellular activity either as a toxic by-product of respiration [1, 2] or from other oxidative reactions [3, 4]. Oxidative species attack a variety of cellular constituents, but proteins are well known to be especially sensitive, with the most susceptible amino acids being methionine, cysteine, tryptophan, tyrosine, and histidine [5, 6], although damage to other residues has also been observed [6, 7]. Protein oxidation is considered a cause or contributory factor to many diseases, such as Refsum's disease and Alzheimer's disease, and has also been related to the aging process [8–12]. Besides the global effects of oxidative damage to proteins, as evidenced by the overall increase of protein carbonyl content [13], certain enzymes have been found to be specifically inactivated by the irreversible oxidation of catalytically important residues [14–18]. For example, cysteine residues, once oxidized, disrupt the overall protein structure and facilitate further damage [19]. Additionally, protein glutathione adducts can form through cysteine residues [20]. In particular, the reversible oxidation of methionine residues has been suggested to play an important role in the regulation of

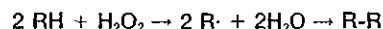
various cellular processes [21, 22]. Although protein oxidation is generally independent of the catalytic activity of any given protein, the oxidative inactivation of hemeperoxidases is mechanism based. Here we present an integrative review of the literature related to the oxidative inactivation of different groups of peroxidasic heme proteins with emphasis upon the general nature of this phenomenon and the proposal of a consensus mechanism.

Peroxidases can be divided into three classes that are defined according to their specific active center: hemeperoxidases are a subset of the heme proteins, which contain the prosthetic group iron porphyrin and control a wide variety of fundamental biological processes in most living organisms [23]; vanadium peroxidases contain a vanadate ion at their active site and are most commonly found in marine environments [24, 25]; and finally, non-metal peroxidases require acetate or propionate buffer for activity and are found in bacteria [26].

The crystal structures of twelve hemeperoxidases and seven cytochrome P450 heme proteins have been reported to date (see Table 1 and references therein). In each of these structures, a coordinated heme prosthetic group is present in the form of iron-protoporphyrin IX, generally coordinated by a histidine residue as the proximal ligand, with the exception of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* and cytochrome P450 from all species examined to date, in which the proximal ligand is a cysteine residue [27]. The heme proteins in Table 1 are distributed within five different folding groups according to structure-structure alignments [28]. The chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* is the only member of its group. Fold similarity is highly significant among members of the same group, despite the low identity of their amino acid sequences, which can be as little as 20% identical.

The classical reaction catalyzed by hemeperoxidases is oxidative dehydrogenation, although they also catalyze a variety of related reactions, including oxygen transfer, hydrogen peroxide cleavage, and peroxidative halogenations. These reactions are described in more detail in the following paragraphs.

Oxidative dehydrogenation involves one-electron transfer processes between an oxo-iron(IV)porphyrin-based π -free radical (pathway 2 in Figure 1) or an oxo-iron(V)porphyrin (pathway 3 in Figure 1) and a diversity of organic and inorganic substrates, with hydrogen peroxide, organic hydroperoxides, peracids, or inorganic oxides, such as periodate and chlorite, as electron donors. An example of this reaction is the spontaneous polymerization of phenol and aniline free radicals [29].



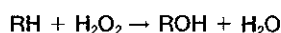
Oxygen transfer is, from a synthesis point of view, the most interesting oxidative transformation catalyzed by peroxidases. This oxidation is comparable to those performed by monooxygenases, such as cytochrome P450. Such oxidations include hetero-atom oxidation (S-oxi-

¹Correspondence: brenda@ibt.unam.mx

Table 1. Peroxidases and Cytochromes P450 with Available Crystal Structures Grouped by Fold Similarity

Folding Group	Function	PDB Account Number	Reference
Hemeprotein Source			
Plant peroxidases			
Soybean	peroxidase	1FHF	[153]
<i>Arabidopsis</i>	peroxidase A2	1PA2	[154]
Barley grain	peroxidase	1BGP	[155]
Horseradish	peroxidase	1ATJ	[156]
Peanut	peroxidase	1SCH	[157]
<i>Arabidopsis</i>	peroxidase N	1QGJ	[158]
Manganese and lignin peroxidases			
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Mn-peroxidase	1MNP	[159]
<i>Arthomyces ramosus</i>	peroxidase	1ARV	[160]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	lignin-peroxidase	1LLP	[130]
Cytochrome c peroxidases			
Yeast	cytochrome c peroxidase	1RYC	[161]
<i>Pisum sativum</i>	ascorbate peroxidase	1APX	[162]
Chloroperoxidase			
<i>Caldariomyces fumago</i>	chloroperoxidase	1CPO	[163]
Cytochromes P450			
Mammalian microsomal			
	cytochrome P450		
	monoxygenase	1DT6	[164]
<i>Bacillus megaterium</i>	cytochrome P450	1BU7	[165]
<i>Pseudomonas</i> sp.	cytochrome P450	1CPT	[166]
<i>Fusarium oxysporium</i>	nitric oxide reductase	1ROM	[167]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	α -sterol demethylase	1EA1	[168]
<i>Sulfolobus sulfataricus</i>	cytochrome P450	1F4T	[169]
<i>Pseudomonas putida</i>	cytochrome P450cam	1PHD	[170]

dation and N-oxidation), epoxidation, and C-H bond oxidation (pathways 9 and 10 in Figure 1) [30].



Hydrogen peroxide decomposition is achieved through the heterolytic cleavage of H_2O_2 to form water (pathways 1 and 8 in Figure 1). In particular, chloroperoxidase ex-

hibits a substantial catalase activity when hydrogen or organic peroxides are the only reductants present in the reaction mixture [31, 32]. In recent years, a new class of peroxidase-related enzymes, the catalase-peroxidase group, has been discovered. In addition to catalase activity, they exhibit a significant classical-peroxidase activity [33–36].

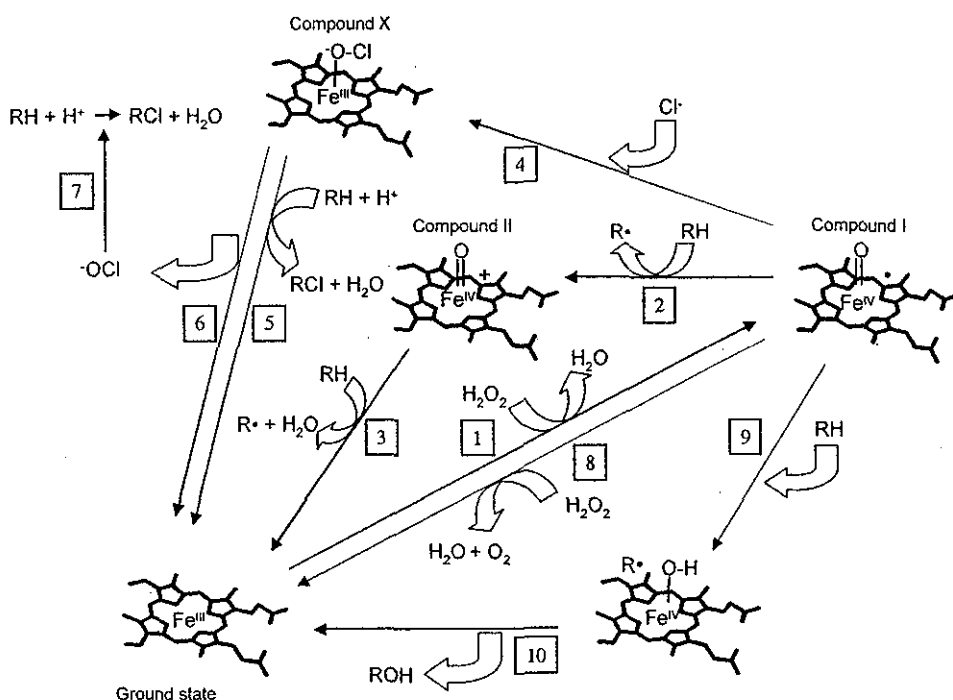
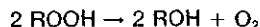
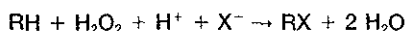


Figure 1. Summary Mechanistic Cycle of Peroxidases



Finally, peroxidative halogenation is catalyzed by a special class of peroxidases called haloperoxidases, which mediate the halogenation of organic substrates (pathways 4–7 in Figure 1). Peroxidative halogenation is not limited to hemeperoxidases but is also catalyzed by vanadium haloperoxidases and other non-heme enzymes [24–26, 37]. Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* is the most active heme-containing haloperoxidase [31].



Non-enzymatic heme proteins are also able to catalyze peroxidase-like reactions. Hemoglobin [38, 39], myoglobin [40], cytochrome *c* [41], and microperoxidase, a heme-bound octapeptide derived from the enzymatic proteolysis of cytochrome *c* [42], are able to oxidize organic substrates. Hydrogen peroxide enables the iron atoms of these proteins, whether high- or low-spin and whether hexa- or penta-coordinated, to perform one-electron oxidations, most likely by the peroxidase cycle.

The development of ecoefficient technological innovations will be critical in this new century and will propel us toward sustainable industrial practices [43]. Green chemistry seeks to develop and deploy chemical products and processes that reduce or eliminate the use and generation of hazardous substances [44]. Valid concerns about the effects of current practices on the environment and energy sources are the driving force behind these unavoidable and necessary changes. Biotechnology will, without a doubt, play an important role in this transformation. The industrial application of enzymes is growing, and the industrial processes in which they are involved are considered clean and low in energy demand. Peroxidases have potentially interesting applications in diverse fields. The most important application so far is in the analytical diagnostic field, where peroxidases are used as a key component of biosensors and immunoassays [45–47]. Peroxidases are currently extensively studied for their use in industrial processes such as Kraft pulp bleaching [48–50], in which they can substitute for the large amounts of chlorine that are currently used and thus prevent the formation of toxic halogenated compounds during the process. Further, these enzymes are involved in the degradation of aromatic compounds and other xenobiotics, including pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, and dioxins [51] and thus can be developed for the removal of phenolic and aromatic pollutants [52, 53], as antioxidants [54], as indicators for food processing [47], in bioelectrodes [55], in the production of pharmaceuticals [56], and in the synthesis of conducting plastics [29]. In addition, peroxidases could also be used in the synthesis of fine chemicals and optically and biologically active compounds [30, 57].

Despite the obvious value of peroxidases, their present commercial uses are limited, primarily by the low stability of peroxidases in the presence of their natural substrate, hydrogen peroxide. All heme proteins, including peroxidases, are inactivated in the presence of catalytic concentrations of hydrogen peroxide. This process, which can be described as a suicide inactivation, is

especially important in the absence of reducing substrates, and its mechanism has not been fully elucidated.

Suicide Inactivation of Peroxidases

Classical Peroxidases

Extensive investigations into the mechanism of function of classical peroxidases resulted in a consensus catalytic network (Figure 1) that proceeds via the establishment of a sixth-coordination bond between hydrogen peroxide and the heme iron and yields Compound I, a high-valent oxo-iron(IV)porphyrin-based π -free radical (pathway 1 in Figure 1). Electron paramagnetic resonance (EPR) studies established that the second oxidation equivalent in Compound I is initially present as a porphyrin-based free radical, but in some cases, electron abstraction from the protein results in formation of a second Compound I species with an unpaired electron based in a residue close to the porphyrin [58, 59]. The presence of 0.5 equivalents of a two electron-reducing agent, such as an aromatic compound, generates Compound II, which is an oxo-iron(IV)porphyrin without the associated porphyrin π -free radical (pathway 2 in Figure 1). Compound II oxidizes a second molecule of substrate via the peroxidase shortcut to form the resting-state iron(III)porphyrin (pathway 3 in Figure 1). Classical peroxidases are irreversibly inactivated by exposure to high concentrations of hydrogen peroxide [60–63].

Ligninolytic microorganisms secrete two extracellular types of peroxidases, lignin peroxidase [64–67] and manganese peroxidase [68]. Although these enzymes are structurally very similar (see Table 1), their reaction mechanisms are significantly different. Lignin peroxidase presents an unusually low optimum pH and is able to catalyze the oxidation of a variety of compounds with reduction potentials exceeding 1.4 V [69], although the most important substrate is veratryl alcohol (3,4-dimethoxybenzyl alcohol) [70]. Like the classical peroxidases, ferric lignin peroxidase follows the peroxidase cycle (pathways 1–3 in Figure 1). In the absence of substrate, the addition of hydrogen peroxide results in the formation of Compound III (pathway 1 in Figure 2) [71]. Further addition of hydrogen peroxide to Compound III drives the enzyme toward bleaching, and irreversible inactivation [71]. Although not directly related to the inactivation process, the surface tryptophan 171 residue is hydroxylated and functions as the endogenous electron donor for Compound I reduction, revealing the existence of multiple electron transfer pathways between the protein and the porphyrin [67, 72]. In contrast, manganese peroxidase produces the oxidant Mn(III) ion from Mn(II), which behaves as a low-molecular-weight mediator that diffuses to remote regions into the lignin molecule and initiates its oxidation. In the presence of hydrogen peroxide, manganese peroxidase forms Compound I, which is in turn reduced by a bound Mn(II) atom to form Compound II (pathway 2 in Figure 1). Compound II then oxidizes another Mn(II) ion, driving the enzyme back to the ground state. As with other peroxidases, the addition of excess hydrogen peroxide drives manganese peroxidase into Compound III [73], which can be further oxidized until bleaching and irreversible inactivation [74]. This fungal peroxidase is, so far, the only known enzyme

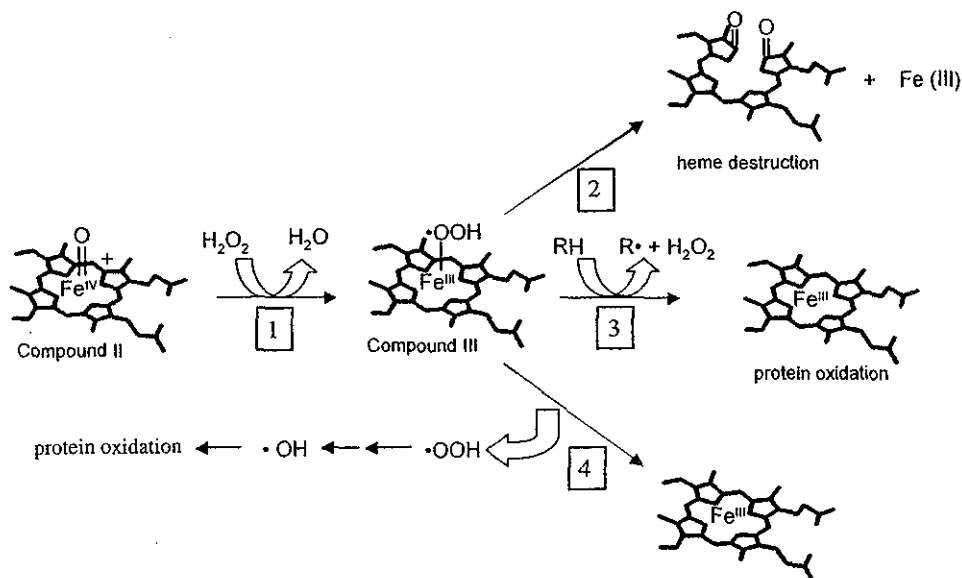


Figure 2. Alternative Inactivation Pathways from Compound III Intermediate

system that utilizes soluble Mn(II)/Mn(III) as a redox couple.

Chloroperoxidase is the most unusual type of peroxidase described so far, and its catalytic cycle has not been completely elucidated [23, 75–77]. The proposed mechanism includes a first activation step, in which hydrogen peroxide transforms the iron(III)porphyrin group to an oxo-iron(IV)porphyrin-based π -free radical (Compound I) (pathway 1 in Figure 1). Subsequently, Compound I can follow three alternative pathways: first, the oxidation of a substrate molecule to form an oxo-iron(IV)porphyrin without the associated porphyrin π radical (Compound II) (pathway 2 in Figure 1); second, the reaction with a chlorine ion to form a ClO-iron(III)porphyrin group, called Compound X (pathway 4 in Figure 1), which seems to be the only enzymatic activity responsible for the enzymatic reaction of halogenation. In addition, this Compound X appears also to be able to perform oxidative reactions by liberating a chlorine ion [75, 78] (pathway 7 in Figure 1). After both reactions occur, Compound X returns to the ground iron(III)porphyrin state (pathways 5 and 6 in Figure 1). Finally, chloroperoxidase shows a significant catalatic activity (pathway 8 in Figure 1), in which Compound I reacts with a second peroxide molecule to form a three-oxygen-containing enzyme intermediate, which decomposes to yield stoichiometric amounts of oxygen, water, and ground-state chloroperoxidase [32]. Chloroperoxidase is significantly resistant to inactivation by hydrogen peroxide or by organic hydroperoxides because of its intrinsic catalase activity [79]. Nevertheless, exposure to high concentrations of hydrogen peroxide (30 mM) irreversibly inactivates chloroperoxidase with a half-life of about 1 min [80]. However, very high turnover numbers can be reached with fed-batch reactors coupled to a hydrogen peroxide-sensor controller [81]. No information is available about the chloroperoxidase intermediates during the hydrogen peroxide-mediated inactivation process.

Other Heme proteins

Cytochrome P450 is widely distributed among living organisms and has been found in mammals, fish, yeast, bacteria, and plants [82]. This enzyme is part of multi-enzymatic systems called monooxygenases that catalyze the activation of dioxygen and the transfer of one of its oxygen atoms into substrates with the consumption of NADPH (or NADH). The monooxygenase cycle of cytochrome P450 has been thoroughly studied [27, 83, 84]. The low-spin hexa-coordinated ferric resting form of iron is converted into a high-spin penta-coordinated state upon substrate binding. Further reduction leads to a high-spin penta-coordinated ferrous form capable of binding dioxygen or carbon monoxide. One-electron reduction of the oxygen adduct, the last stable intermediate in the reduction cycle, leads to release of water and the hydroxylated product. Cytochrome P450 is also able to carry out oxidations with exogenous single-oxygen atom donors such as H₂O₂, alkyl-hydroperoxides, iodosobenzene, amine oxide, and peracids [85–87]. Oxidations with these single-oxygen donors are observed in vitro without any need for cytochrome P450 reductase or any other electron transfer protein and without consumption of NADPH [85, 86]. In this case, it seems possible that the enzyme follows a peroxidase-like catalytic cycle as showed in pathways 9 and 10 in Figure 1. The major products formed from the oxidation of benzo(α)-pyrene by the monooxygenase pathway with NADPH are phenols, whereas in the presence of cumene hydroperoxide, the products are quinones, supporting the existence of a peroxidasic activity for cytochrome P450 [85]. Treatment of cytochrome P450 with excess cumene hydroperoxide leads to protein inactivation and to destruction of the porphyrin into reactive fragments that irreversibly bind to the protein [86]. Self-inactivation of cytochrome P450 during benzphetamine oxidation is accompanied by heme degradation and apo-enzyme modification, followed by protein aggregation, probably

through cross-linked oligomers, as evidenced by the appearance of novel carbonyl groups [87].

The peroxidasic activity of cytochrome *c* has been previously reviewed [41], and the hydrogen peroxide-mediated production of peroxy and alkoxy radicals has been investigated by ESR-trapping techniques [88, 89]. Exposure of cytochrome *c* to excess hydrogen peroxide leads to heme bleaching and protein inactivation [90] by a mechanism presumably involving the formation of a reactive species equivalent to Compound III. Free-radical species such as tyrosine-based free radicals [91, 92], as well as alkoxy and peroxy reactive species [88, 93], have been detected after exposure of cytochrome *c* to an excess of hydrogen peroxide.

The metabolic role of myoglobin and hemoglobin involves the reversible binding of molecular oxygen to an iron(II)porphyrin group [94]. Part of the oxygenated iron(II)porphyrin form of the protein is spontaneously auto-oxidized into the iron(III)porphyrin state known as the met form, which is unable to bind oxygen, with the generation of a superoxide anion [94]. Auto-oxidation is pH dependent, and although the half-life of oxygenated myoglobin at physiological conditions was found to be 3.3 days, at low pH it became less than 30 min [95]. Although the met form could be reduced back to the ground iron(II)porphyrin state, the superoxide anion produced can easily be converted into hydrogen peroxide by spontaneous dismutation [96, 97]. Hydrogen peroxide can induce very rapid oxidation of the deoxyiron(II)porphyrin into the met form through the formation of an iron(IV)porphyrin species. On the other hand, the iron(III)porphyrin-met form further reacts with hydrogen peroxide via the cyclic formation of an oxo-iron(IV)porphyrin radical cation, analogous to Compound I of peroxidases. That species is very unstable and decays nearly immediately to form a tryptophanyl radical that rapidly reacts with oxygen to form a peroxy radical [98–102]. It is unclear from the data if a second tyrosyl radical observed is formed simultaneously with the tryptophanyl radical or if it is formed by subsequent rescue of the former radical [98–102]. Reaction with hydrogen peroxide also results in covalent dimerization of sperm whale myoglobin [103] and in the oxidation of the porphyrin moiety [104, 105].

A Consensus Inactivation Mechanism

The oxidative inactivation of heme proteins is mechanism based. The molecular mechanism underlying this hydrogen peroxide-mediated inactivation is extraordinarily complex because of the fact that a multitude of reactions can occur subsequent to the reaction of the heme iron with the hydroperoxide (Figure 1). Despite peculiarities among different heme proteins, a common inactivation mechanism comprising several stages can be proposed. In the absence of substrate, or when exposed to high concentrations of hydrogen peroxide, peroxidases show the kinetic behavior of a suicide inactivation, in which hydrogen peroxide is the suicide substrate that converts Compound II into a highly reactive peroxy-iron(III)porphyrin free-radical called Compound III (pathway 1 in Figure 2) [106]. Compound III is not part of the peroxidase cycle, but it is produced under excessive

exposure of protonated Compound II to oxidative species in a reaction partially mediated by superoxide free radical [60, 106, 107]. ESR spin trapping and spectral analyses have demonstrated the occurrence of this species after the oxidative treatment of cytochrome *c* [89], horseradish peroxidase [60], prostaglandin H synthase [108], lignin peroxidase [71], and manganese peroxidase [73].

Despite representing different structural groups, the kinetic models for the hydrogen peroxide-mediated inactivation of horseradish peroxidase [109] and ascorbate peroxidase [61] are similar in that they are time dependent and show saturation kinetics. In both cases, the addition of a reducing substrate protected the enzyme from inactivation. From the stoichiometry of the inactivation, it was concluded that for ascorbate peroxidase only two molecules of hydrogen peroxide are required per active site to generate the inactive form [61] in contrast to 265 molecules required for horseradish peroxidase [109]. This difference arises from the fact that horseradish peroxidase exhibits a low, albeit significant, catalytic activity that is absent in ascorbate peroxidase [110]. For ascorbate peroxidase, inactivation correlated with enzyme bleaching, suggesting heme destruction [61].

The addition of excess substrate would preclude the suicide inactivation by competing with hydrogen peroxide for Compound II, as has been previously suggested [61, 109]. Once formed, Compound III might follow at least three alternative decomposition pathways (pathways 2, 3, and 4 in Figure 2). First, given the vicinity of the bound peroxy radical of Compound III to the porphyrin ring, it is reasonable to suspect that once formed, this reactive species would potentially reach the tetrapyrrole structure and oxidize the porphyrin moiety (pathway 2 in Figure 2). This speculation is supported by the existence of an inactive species, different from but related to Compound III and characterized by heme bleaching, which has been observed after the treatment of ascorbate peroxidase [61], hemoglobin [111], myoglobin [112], horseradish peroxidase [62], prostaglandin H synthase-1 [108], microperoxidase-11 [113], cytochrome P450 [86], chloroperoxidase [114], and peroxidase from *Coprinus cinereus* [63], as well as in prostaglandin H synthase [115] with excess hydrogen peroxide. Heme compounds are particularly susceptible to the formation of biliverdin ring systems by oxidative attack at the meso positions, and the dependence of this process on exogenous peroxide has been recently demonstrated [116]. Such oxidation readily leads to rupture or elimination of the carbon bridges linking the pyrrole rings and results in cleavage of the porphyrin macrocycle and formation of an open-chain tetra-pyrrole structure [62, 117, 118]. The release of heme iron during the formation of these species confirms that they are associated with heme degradation. Second, Compound III might return to the ground state after catalyzing the oxidation of the surrounding protein, yielding an oxidized amino acid side chain group in a reaction similar to that previously described for lignin peroxidase (Pathway 3 in Figure 2) [119]. Alternatively, the electron donor might be a substrate molecule, in which case the porphyrin moiety would be repaired, and a ground state enzyme would

Table 2. Redox Potential of Some of the Reactions Involved in the Oxidative Inactivation of Peroxidases

Redox Reaction	E_m (mV)	Reference
$\text{HO}\cdot + \text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	2200	[151]
$\text{Mn (III)} + \text{e}^- \rightarrow \text{Mn (II)}$	1540	[171]
$\text{Met}\cdot^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Met}$	1500	[156]
$\text{HOO}\cdot + \text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	1480	[151]
$\text{VA}\cdot^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{VA}$	1400	[69]
$\text{Trp}\cdot^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Trp}$	1200	[151]
$\text{TyrO}\cdot + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{TyrOH}$	930	[151]
$\text{CysS}\cdot + \text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CysS}$	900	[151]

result [120]. Finally, the spontaneous liberation of free radicals by the unimolecular decay of Compound III is feasible because the peroxy radical is not covalently bound to the porphyrin. This assumption is supported by experimental evidence demonstrating that in the presence of excess hydrogen peroxide and no reductant, Compound III decays irreversibly because of the formation of reactive oxygen species [109, 121–124]. Once released, two molecules of superoxide free radicals might undergo spontaneous rearrangement into a short-lived tetraoxide species that decomposes into two molecules of hydroxyl free radicals and one of oxygen [123]. Hydroxyl free radicals are more reactive than peroxy free radicals (Table 2), and given their solubility, they are potentially able to oxidize remote amino acid side chains. Amino acid-based free radicals have been detected after the treatment of cytochrome c [92], metmyoglobin [99], prostaglandin H synthase [125, 126], microperoxidase-8 [127], ascorbate peroxidase [58], and lignin peroxidase [128–130] with excess hydrogen peroxide. In some cases the amino acid-based free radical is located in the vicinity of the porphyrin, whereas in other cases it is stabilized in the outskirts of the protein. It is well known that free-radical damage may be propagated within protein structures and that, in most cases, transient short-lived species react rapidly with a range of targets to yield other radicals [5]. Once formed, protein-based free radicals might travel back and forth between the protein backbone and proximal side chains until they reach the lowest reduction potential site available. The ultimate sink for oxidizing equivalents in proteins is cysteine residues (Table 2), although tryptophan- and tyrosine-based free radicals were observed after the examination of a number of peptide radicals [131]. Transfer reactions within hemoproteins have been observed in myoglobin [132], hemoglobin [133], and leghemoglobin [134]. These hemoprotein-derived radicals generate intermolecular crosslinks through the formation of di-tyrosine links. Tyrosine-mediated oligomerization has been observed during the oxidative inactivation of myoglobin [103], cytochrome c peroxidase [135], cytochrome P450 [87], lactoperoxidase [136], and myeloperoxidase [137].

Improving Stability through Protein Engineering

Protein engineering is generally understood as the use of site-directed or random mutagenesis to alter the properties of a protein. Due to the delicate balance between stabilizing and destabilizing interactions, proteins are only stable under physiological conditions, and two

different approaches have been used to increase their stability under non-natural conditions: (1) random mutagenesis followed by selection, also known as directed or molecular evolution and (2) the rational introduction of possibly stabilizing amino acids based on the knowledge derived from the three-dimensional structure. Comprehensive reviews of these strategies are available elsewhere [138, 139]. It may be possible to harness the powerful tools of molecular biology to directly replace low-reducing-potential residues around the active site. This would alter the intermolecular radical transfer pathways with the goal of reducing undesirable paths. As a consequence, the inactivation process would be delayed or even suppressed.

In an interesting structure-based molecular-modeling approach, ascorbate peroxidase variants with increased activity were recovered by engineering of the active site [140]. Stabilization of non-heme proteins has been obtained by substitution of amino acids, mainly methionine residues, that are susceptible to oxidative damage [141]. Significant results increasing oxidative stability in hemoproteins have resulted from site-directed mutagenesis. In the case of cytochrome P450 BM-3, the F87A substitution significantly increased the stability toward hydrogen peroxide [142], whereas in hemoglobin the formation of a stable thyl radical decreased the rate of autoxidation and reduced heme degradation attributed to the reaction of superoxide with the heme [143]. Substitution of the active site residues N52I and Y67F abolished heme destruction but not protein inactivation in cytochrome c [90], whereas substitution of residue N81 significantly increased the resistance toward hydrogen peroxide apparently by reducing the protein affinity for this compound in the case of recombinant manganese peroxidase [144]. In light of the inactivation mechanism proposed here, these results can be interpreted as evidence of electron abstraction pathway reconfigurations that lead to an altered electron-allocation equilibrium between the substrate molecule and secondary sinks.

Despite the wide acceptance of directed-evolution methods in protein engineering, only a few hemoproteins have been subjected to this approach and, in most cases, the aim was to modify their catalytic properties. In some pioneering studies, a recombinant horse heart-myoglobin quadruple variant with increased peroxidase activity was obtained after successive rounds of random mutagenesis and screening [145]. In a more recent publication, yeast cytochrome c peroxidase mutants with increased activity toward guaiacol were recovered after several rounds of DNA shuffling and screening [146]. Interestingly, all these mutants contained the multi-species conserved arginine 48 residue changed to histidine, in addition to other changes related to the general stability of the apo-protein, which is believed to play a key role in the active site of the enzyme as a gatekeeper controlling the access of small molecules to the ferryl oxygen and the distal histidine [146]. *Pseudomonas putida* cytochrome P450 was successfully evolved toward the hydroxylation of naphthalene with hydrogen peroxide as the electron acceptor. A first round of mutagenesis and a single round of recombination were followed by a second series of experiments, in which five first-generation variants were used as parents in a novel

shuffling reaction yielding mutants with as much as a 20-fold improvement in activity over the wild-type protein [147]. Finally, random mutagenesis has been used in the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase locus to develop a mutant that resisted the suicidal inactivation by allylbenzene [148] as well as a mutant with increased activity in organic cosolvents [149].

In the only example of molecular evolution of a heme-protein being aimed to increase protein stability toward hydrogen peroxide, a combination of approaches were used to develop a fungal peroxidase for activity in the highly alkaline and oxidative conditions of laundry wash water [150]. Using the crystal structure as a guide, the researchers first used site-directed mutagenesis to target amino acid residues susceptible to oxidation by hydrogen peroxide. Three amino acids were identified and combined by site-directed mutagenesis to generate a variant with an oxidative stability 5-fold higher than that of the wild-type enzyme and thermostability that had improved by more than 100-fold. Further random mutagenesis and selection identified a series of mutants with greater improvements in thermostability and peroxide stability, but such improvements came at the cost of reducing the overall activity of the enzyme. To overcome this obstacle, the authors then shuffled *in vivo* clones with improved thermostability with clones encoding enzymes with high activity. The output of these experiments was mutant enzymes with higher specific activity and greater stability than any of the input parental gene products. A final round of *in vivo* shuffling resulted in two distinct mutants with substitutions in the same position, I49. The best of these products was 174 times more thermally stable and 100 times more stable in the presence of hydrogen peroxide than the native enzyme. Most of the changes selected in the former mutant were located inside the active site, mainly in the contact point between the two helices that coordinate the binding of peroxide. The replacement of isoleucine at position 49 with amino acids that can establish hydrogen bonding was especially important. The I49S substitution increased oxidative stability 50-fold, probably by promoting the establishment of an alternative hydrogen bonding network. Protein-based free radicals are known to be allocated through covalent bonds but also through hydrogen bonding networks [151], and therefore the stabilizing effect of a novel hydrogen bonding architecture might allow alternative free-radical pathways, enabling other sources of electrons to provide the reducing power instead of the protein.

In cases in which neither the crystallographic structure nor a recombinant expression system are available, disruption of the electron tunnel pathway could be attained by chemical means. An example of this approach is the electron abstraction source switching from the substrate to the porphyrin ring, as observed in the hydrogen peroxide-treated prostaglandin H synthase upon the addition of cyclooxygenase inhibitors [152].

Future Prospects

From the evidence presented here, we conclude that in the case of hemeperoxidases substrate oxidation is a naturally imperfect process, and we hypothesize that to

some extent, the porphyrin ring or the protein backbone may become the alternative electron sources. Protein destruction seems to arise ultimately as a consequence of the of nonproductive electron abstraction pathways in the reaction pathway, whereas protection by the substrate comes from the favorable partition of the oxidative equivalents toward the substrate. Although we do not know whether these alternative pathways operate sequentially or simultaneously, overall stabilization of peroxidases against hydrogen peroxide might be achieved through the rational reorganization of low-reduction-potential residues within the active site. The aim of this approach would be to orient the electron abstraction pathways toward the substrate instead of the porphyrin or the protein. We are confident that the systematic study of the mechanism-based inactivation of hemeperoxidases will undoubtedly provide the knowledge required for the rational design of site-directed variants to prevent suicide inactivation.

Acknowledgments

This work was funded by Conacyt grant 33611 and by Mexican Institute of Petroleum (IMP) grant FIES 98-110-VI. We thank Grant Mauk and Michael Pickard for their comments on the manuscript.

References

1. Branchaud, B.P. (1999). Free radicals as a result of dioxygen metabolism. *Metal Ions Biol. Sys.* 36, 79–102.
2. Boveris, A., and Cadenas, E. (2000). Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *IUBMB Life* 50, 245–250.
3. Salazar, J.J., and Van Houten, B. (1997). Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Mut. Res. DNA Repair.* 385, 139–149.
4. Bockle, B., Martinez, M.J., Guillen, F., and Martinez, A.T. (1999). Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 923–928.
5. Hawkins, C.L., and Davies, M.J. (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 196–219.
6. Stadtman, E.R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 797–821.
7. Fu, S.L., and Dean, R.T. (1997). Structural characterization of the products of hydroxyl-radical damage to leucine and their detection on proteins. *Biochem. J.* 324, 41–48.
8. Raha, S., and Robinson, B.H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25, 502–508.
9. Muller, F. (2000). The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: is relevance to aging. *J. Am. Aging Assoc.* 23, 227–253.
10. Anson, R.M., and Bohr, V.A. (2000). Mitochondria, oxidative DNA damage, and aging. *J. Am. Aging Assoc.* 23, 199–218.
11. Dean, R.T., Fu, S.L., Stocker, R., and Davies, M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324, 1–18.
12. Ruan, H., Tang, X.D., Chen, M.-L., Joiner, M.A., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S.H., Iverson, L., Wu, C.-F., et al. (2002). High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2748–2753.
13. Chevion, M., Berenshtein, E., and Stadtman, E.R. (2000). Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic. Res.* 33, S99–S108.
14. Allen, J.D., Bentley, D., Stringer, R.A., and Lowther, N. (1999).

- Hybrid (BDBB) interferon-alpha: preformulation studies. *Int. J. Pharm.* 187, 259–272.
15. Liu, J.L., Lu, K.V., Katta, V., Westcott, K.R., Narhi, L.O., and Lu, H.S. (1998). *In vitro* methionine oxidation of recombinant human leptin. *Pharm. Res.* 15, 632–640.
 16. Taggart, C., Cervantes-Laurean, D., Kim, G., McElvaney, N.G., Wehr, N., Moss, J., and Levine, R.L. (2000). Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in α (1)-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 27258–27265.
 17. Milzani, A., Rossi, R., Di Simplicio, P., Giustarini, D., Colombo, R., and DalleDonne, I. (2000). The oxidation produced by hydrogen peroxide on Ca-ATP-G-actin. *Protein Sci.* 9, 1774–1782.
 18. DePaz, R.A., Barnett, C.C., Dale, D.A., Carpenter, J.F., Gaertner, A.L., and Randolph, T.W. (2000). The excluding effects of sucrose on a protein chemical degradation pathway: methionine oxidation in subtilisin. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 123–132.
 19. Kim, B.M., Schultz, L.W., and Raines, R.T. (1999). Variants of ribonuclease inhibitor that resist oxidation. *Protein Sci.* 8, 430–434.
 20. Hanson, S.R.A., Chen, A.A., Smith, J.B., and Lou, M.F. (1999). Thiolation of the gamma B-crystallins in intact bovine lens exposed to hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 274, 4735–4742.
 21. Levine, R.L., Moskovitz, J., and Stadtman, E.R. (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* 50, 301–307.
 22. Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskovitz, J., Mosoni, L., and Stadtman, E.R. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.* 107, 323–332.
 23. Dunford, H.B. (1999). *Heme Peroxidases*. (New York: John Wiley and Sons).
 24. Simons, B.H., Barnett, P., Vollenbroek, E.G.M., Dekker, H.L., Muijersers, A.O., Messerschmidt, A., and Wever, R. (1995). Primary structure and characterisation of the vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Eur. J. Biochem.* 229, 566–574.
 25. Shimonishi, M., Kuwamoto, S., Inoue, H., Wever, R., Ohshiro, T., Izumi, Y., and Tanabe, T. (1998). Cloning and expression of the gene for a vanadium-dependent bromoperoxidase from a marine macro-algae, *Corallina pilulifera*. *FEBS Lett.* 362, 105–110.
 26. Wolframm, C., Lingens, F.M.R., and van Pée, K.-H. (1993). Chloroperoxidase-encoding gene from *Pseudomonas pyrrocinia*—sequence, expression in heterologous hosts, and purification of the enzyme. *Gene* 130, 131–135.
 27. Dawson, J.H., and Sono, M. (1987). Cytochrome P-450 and chloroperoxidase: thiolate-ligated heme enzymes. Spectroscopic determination of their active site structures and mechanistic implications of thiolate ligation. *Chem. Rev.* 87, 1255–1276.
 28. Holm, L., and Sander, C. (1996). Fold classification based on structure-structure alignment of proteins—European Bioinformatics Institute. *Science* 273, 595–603.
 29. Liu, W., Kumar, J., Tripathy, S., Senecal, K.J., and Samuelson, L. (1999). Enzymatically synthesized conducting polyaniline. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 71–78.
 30. van Rantwijk, F., and Sheldon, R.A. (2000). Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 554–564.
 31. Thomas, J.A., Morris, D.R., and Hager, L.P. (1970). Chloroperoxidase. VII. Classical peroxidase, catalatic, and halogenating forms of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 245, 3129–3134.
 32. Sun, W., Kadima, T.A., Pickard, M.A., and Dunford, H.B. (1994). Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity. *Biochem. Cell Biol.* 72, 321–331.
 33. Hochman, A., and Shemesh, A. (1987). Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Biol. Chem.* 262, 6871–6876.
 34. Amemura-Maekawa, J., Mishima-Abe, S., Kura, F., Takahashi, T., and Watanabe, H. (1999). Identification of a novel periplasmic catalase-peroxidase KatA of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 339–344.
 35. Zamocky, M., Janecek, S., and Koller, F. (2000). Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. *Gene* 256, 169–182.
 36. Chouchane, S., Lippai, I., and Magliozzo, R.S. (2000). Catalase-peroxidase (*Mycobacterium tuberculosis* KatG) catalysis and isoniazid activation. *Biochemistry* 39, 9975–9983.
 37. Pfeifer, O., Pelletier, I., Altenbuchner, J., and von Pée, K.-H. (1992). Molecular cloning and sequencing of a non-haem bromoperoxidase gene from *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1123–1131.
 38. Ortíz-León, M., Velasco, L., and Vazquez-Duhalt, R. (1995). Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by hemoglobin and hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 215, 968–973.
 39. Lenk, W., and Sterzl, H. (1984). Peroxidase activity of oxyhaemoglobin *in vitro*. *Xenobiotica* 14, 581–588.
 40. Rao, S.I., Wilks, A., Hamberg, M., and Ortiz de Montellano, P.R. (1994). The lipoxygenase activity of myoglobin. Oxidation of linoleic acid by the ferryl oxygen rather than protein radical. *J. Biol. Chem.* 269, 7210–7216.
 41. Vazquez-Duhalt, R. (1999). Cytochrome c as a biocatalyst. *J. Mol. Cat. B Enz.* 7, 241–249.
 42. Adams, P.A., and Louw, J. (1995). Dioxygen bond scission and heme degradation in haemoproteins: a kinetic-study of chemical-model systems using ferrimyoglobin and haempeptide-non-haempeptide complexes as catalysts for peroxidic reduction of hydrogen-peroxide. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* 2, 1683–1690.
 43. DeSimone, L.D., and Popoff, F. (1997). *The Business Link to Sustainable Development*. (Cambridge, MA: MIT Press).
 44. Anastas, P.T., and Warner, J.C. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. (New York: Oxford University Press).
 45. Ramos, M.C., Torijas, M.C., and Diaz, A.N. (2001). Enhanced chemiluminescence biosensor for the determination of phenolic compounds and hydrogen peroxide. *Sensors and Actuators B-Chemical.* 73, 71–75.
 46. Iwuoha, E.I., Joseph, S., Zhang, Z., Smyth, M.R., Fuhr, U., and Ortiz de Montellano, P.R. (1998). Drug metabolism biosensors: electrochemical reactivities of cytochrome P450cam immobilised in synthetic vesicular systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, 1101–1110.
 47. Ingram, D.T., Lamichhane, C.M., Rollins, D.M., Carr, L.E., Malinsson, E.T., and Joseph, S.W. (1998). Development of a colony lift immunoassay to facilitate rapid detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 from agar plates and filter monitor membranes. *Clin. Diagnos. Lab. Immunol.* 5, 567–573.
 48. Paice, M.G., and Jurasek, K.L. (1984). Peroxidase catalyzed color removal from bleach plant effluent. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 477–480.
 49. Michel, F.C., Dass, S.B., Grulke, E.A., and Reddy, C.A. (1991). Role of manganese peroxidase and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of Kraft bleach plant effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2368–2375.
 50. Ferrer, I., Dezotti, M., and Duran, N. (1991). Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase. *Biotechnol. Lett.* 13, 577–582.
 51. Hammel, K.E., Kayanaraman, B., and Kirk, T.K. (1986). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo(p)dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261, 16948–16952.
 52. Klibanov, A.M., Tu, T.-M., and Scott, K.L. (1983). Peroxidase catalyzed removal from coal-conversion waste waters. *Science* 221, 259–260.
 53. Aitken, M.D. (1993). Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. *Chem. Eng. J.* 52, B49–B58.
 54. Patel, M., and Day, B.J. (1999). Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trends Pharm. Sci.* 20, 359–364.
 55. Gaspar, S., Popescu, I.C., Gazaryan, I.G., Bautista, A.G., Sakharov, I.Y., Mattiasson, B., and Csoregi, E. (2000). Biosensors based on novel plant peroxidases: a comparative study. *Electrochimica Acta.* 46, 255–264.

56. Yilmaz, E. (2001). Biotechnological production of prostaglandin. *Biotechnol. Adv.* 19, 387–397.
57. van Deurzen, M.P.J., van Rantwijk, F., and Sheldon, R.A. (1997). Selective oxidations catalyzed by peroxidases. *Tetrahedron* 53, 13183–13220.
58. Hiner, A.N.P., Martínez, J.I., Arnao, M.B., Acosta, M., Turner, D.D., Raven, E.L., and Rodríguez-Lopez, J.N. (2001). Detection of a tryptophan radical in the reaction of ascorbate peroxidase with hydrogen peroxide. *Eur. J. Biochem.* 268, 3091–3098.
59. Miller, V.P., Goodin, D.B., Friedman, A.E., Hartmann, C., and Ortiz de Montellano, P.R. (1995). Horseradish peroxidase Phe172→Tyr mutant. Sequential formation of compound I with a porphyrin radical cation and a protein radical. *J. Biol. Chem.* 270, 18413–18419.
60. Adediran, S.A., and Lambeir, A.M. (1989). Kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III. *Eur. J. Biochem.* 186, 571–576.
61. Hiner, A.N.P., Rodríguez-Lopez, J.N., Arnao, M.B., Lloyd Raven, E., Garcia-Canovas, F., and Acosta, M. (2000). Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 348, 321–328.
62. Nakajima, R., and Yamazaki, I. (1980). The conversion of horseradish peroxidase c to a verdohemoprotein by a hydroperoxide derived enzymatically from indole-3-acetic acid and by m-nitroperoxybenzoic acid. *J. Biol. Chem.* 255, 2067–2071.
63. Chang, H.C., Holland, R.D., Bumpus, J.A., Churchwell, M.I., and Doerge, D.R. (1999). Inactivation of *Coprinus cinereus* peroxidase by 4-chloroaniline during turnover: comparison with horseradish peroxidase and bovine lactoperoxidase. *Chem. Biol. Interact.* 123, 197–217.
64. Gold, M.H., Kuwahara, M., Chiu, A.A., and Glenn, J.K. (1984). Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring diarylpropane oxygenase from the white rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 234, 353–362.
65. Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., and Gold, M.H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169, 247–250.
66. Tien, M., and Kirk, T.K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2280–2284.
67. Piontek, K., Smith, A.T., and Blodig, W. (2001). Lignin peroxidase structure and function. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 111–116.
68. Pease, E.A., and Tien, M. (1992). Heterogeneity and regulation of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 174, 3532–3540.
69. Bietti, M., Baciocchi, E., and Steenken, S. (1998). Lifetime, reduction potential and base-induced fragmentation of the veratryl alcohol radical cation in aqueous solution. Pulse radiolysis studies on a ligninase “mediator.” *J. Phys. Chem. A* 102, 7337–7342.
70. Harvey, P.J., Floris, R., Lundell, T., Palmer, J.M., Schoemaker, H.E., and Wever, R. (1992). Catalytic mechanisms and regulation of lignin peroxidase. *Biochem. Soc. Trans.* 20, 345–349.
71. Wariishi, H., and Gold, M.H. (1990). Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265, 2070–2077.
72. Blodig, W., Smith, A.T., Doyle, W.A., and Piontek, K. (2001). Crystal structure of pristine and oxidatively processed lignin peroxidase expressed in *Escherichia coli* and of the W171F variant that eliminates the redox active tryptophan 171. Implications for the reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* 305, 851–861.
73. Wariishi, H., Akileswaran, L., and Gold, M.H. (1988). Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* 27, 5365–5370.
74. Timofeevski, S.L., Reading, N.S., and Aust, S.D. (1998). Mechanisms for protection against inactivation of manganese peroxidase by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 287–295.
75. Libby, R.D., Beachy, T.M., and Phipps, A.K. (1996). Quantitating direct chlorine transfer from enzyme to substrate in chloroperoxidase-catalyzed reactions. *J. Biol. Chem.* 271, 21820–21827.
76. Wagenknecht, H.A., and Woggon, W.D. (1997). Identification of intermediates in the catalytic cycle of chloroperoxidase. *Chem. Biol.* 4, 367–372.
77. Libby, R.D., Rotberg, N.S., Emerson, J.T., White, T.C., Yen, G.M., Friedman, S.H., Sun, N.S., and Goldowski, R. (1989). The chloride-activated peroxidation of catechol as a mechanistic probe of chloroperoxidase reactions. Competitive activation as evidence for a catalytic chloride binding site on compound I. *J. Biol. Chem.* 264, 15284–15292.
78. Libby, R.D., Shedd, A.L., Phipps, A.K., Beachy, T.M., and Gerstberger, S.M. (1992). Defining the involvement of HOCl or Cl₂ as enzyme-generated intermediates in chloroperoxidase-catalyzed reactions. *J. Biol. Chem.* 267, 1769–1775.
79. Manoj, K.M., and Hager, L.P. (2001). Utilization of peroxide and its relevance in oxygen insertion reactions catalyzed by chloroperoxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1547, 408–417.
80. Shevelkova, A.N., and Ryabov, A.D. (1996). Irreversible inactivation of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase by hydrogen peroxide. A kinetic study in chloride and bromide systems. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 665–670.
81. Seelbach, K., van Deurzen, M.P.J., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., and Kragl, V. (1997). Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed oxidation. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 283–288.
82. Ortiz de Montellano, P.R. (1986). *Cytochrome P450, Structure, Mechanism and Biochemistry*. (New York: Plenum Press).
83. Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D., and Dawson, J.H. (1996). Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2841–2887.
84. Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A.M., Maves, S.A., Benson, D.E., Sweet, R.M., Ringe, D., Petsko, G.A., and Sligar, S.G. (2000). The catalytic pathway of cytochrome P450cam at atomic resolution. *Science* 287, 1615–1622.
85. Capdevila, J., Estabrook, R.W., and Prough, R.A. (1980). Differences in the mechanism of NADPH- and cumene hydroperoxide-supported reactions of cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* 200, 186–195.
86. He, K., Bornheim, L.M., Falick, A.M., Maltby, D., Yin, H.Q., and Correia, M.A. (1998). Identification of the heme-modified peptides from cumene hydroperoxide-inactivated cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* 37, 17448–17457.
87. Karuzina, I.I., Zgoda, V.G., Kuznetsova, G.P., Samenkova, N.F., and Archakov, A.I. (1999). Heme and apoprotein modification of cytochrome P450 2B4 during its oxidative inactivation in monooxygenase reconstituted system. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 620–632.
88. Davies, M.J. (1988). Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with heme-proteins by electron spin resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 964, 28–35.
89. Barr, D.P., and Mason, R.P. (1995). Mechanism of radical production from the reaction of cytochrome c with organic hydroperoxides—an ESR spin-trapping investigation. *J. Biol. Chem.* 270, 12709–12716.
90. Villegas, J.A., Mauk, A.G., and Vazquez-Duhalt, R. (2000). A cytochrome c variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide. *Chem. Biol.* 7, 237–244.
91. Deterding, L.J., Barr, D.P., Mason, R.P., and Tomer, K.B. (1998). Characterization of cytochrome c free radical reactions with peptides by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 273, 12863–12869.
92. Barr, D.P., Gunther, M.R., Deterding, L.J., Tomer, K.B., and Mason, R.P. (1996). ESR spin-trapping of a protein-derived tyrosyl radical from the reaction of Cytochrome c with hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 271, 15498–15503.
93. Busi, E., Howes, B.D., Pogni, R., Basosi, R., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. (2000). Modified cytochrome c/H₂O₂ system: spectroscopic EPR investigation of the biocatalytic behaviour. *J. Mol. Cat. B Enz.* 9, 39–48.
94. Shikama, K. (1998). The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: a venerable puzzle. *Chem. Rev.* 98, 1357–1373.
95. Sugawara, Y., and Shikama, K. (1980). Autoxidation of native

137

- oxymyoglobin. Thermodynamic analysis of the pH profile. *Eur. J. Biochem.* **110**, 241–246.
96. Rabani, J., and Nielsen, S.O. (1969). Absorption spectrum and decay kinetics of O_2^- and HO_2 in aqueous solutions by pulse radiolysis. *J. Phys. Chem.* **73**, 3736–3744.
 97. Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 147–159.
 98. Gunther, M.R., Sturgeon, B.E., and Mason, R.P. (2000). A long-lived tyrosyl radical from the reaction between horse metmyoglobin and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 709–719.
 99. Gunther, M.R., Tschirret-Guth, R.A., Witkowska, H.E., Fann, Y.C., Barr, D.P., Ortiz de Montellano, P.R., and Mason, R.P. (1998). Site-specific spin trapping of tyrosine radicals in the oxidation of metmyoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **330**, 1293–1299.
 100. Gunther, M.R., Kelman, D.J., Corbett, J.T., and Mason, R.P. (1995). Self-peroxidation of metmyoglobin results in formation of an oxygen-reactive tryptophan-centered radical. *J. Biol. Chem.* **270**, 16075–16081.
 101. Svistunenko, D.A. (2001). An EPR study of the peroxy radicals induced by hydrogen peroxide in the haem proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1546**, 365–378.
 102. Patel, R.P., Svistunenko, D.A., Darley-Usmar, V.M., Symons, M.C., and Wilson, M.T. (1996). Redox cycling of human met-haemoglobin by H_2O_2 yields persistent ferryl iron and protein based radicals. *Free Radic. Res.* **25**, 117–123.
 103. Tew, D., and Ortiz de Montellano, P.R. (1988). The myoglobin protein radical. Coupling of Tyr-103 to Tyr-151 in the H_2O_2 -mediated cross-linking of sperm whale myoglobin. *J. Biol. Chem.* **263**, 17880–17886.
 104. Sugiyama, K., Hight, R.J., Woods, A., Cotters, R.J., and Osawa, Y. (1997). Hydrogen peroxide-mediated alteration of the heme prosthetic group of metmyoglobin to an iron chlorin product: evidence for a novel oxidative pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 796–801.
 105. Cantoni, L., Gibbs, A.H., and De Matteis, F. (1981). Loss of haem and haemoproteins during the generation of superoxide anion and hydrogen peroxide: a pathway not involving production of carbon monoxide. *Int. J. Biochem.* **13**, 823–830.
 106. Nakajima, R., and Yamazaki, I. (1987). The mechanism of oxyperoxidase formation from ferryl peroxidase and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **262**, 2576–2581.
 107. Keilin, D., and Mann, T. (1937). On the haematin compound of peroxidase. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **122**, 119–133.
 108. Wu, G., Wei, C., Kulmacz, R.J., Osawa, Y., and Tsai, A. (1999). A mechanistic study of self-inactivation of the peroxidase activity in prostaglandin H synthase-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 9231–9237.
 109. Hiner, A.N., Hernandez-Ruiz, J., Garcia-Canovas, F., Smith, A.T., Arnao, M.B., and Acosta, M. (1995). A comparative study of the inactivation of wild-type, recombinant and two mutant horseradish peroxidase isoenzymes C by hydrogen peroxide and m-chloroperoxybenzoic acid. *Eur. J. Biochem.* **234**, 506–512.
 110. Hernandez-Ruiz, J., Arnao, M.B., Hiner, A.N.P., Garcia-Canovas, F., and Acosta, M. (2001). Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H_2O_2 . *Biochem. J.* **354**, 107–114.
 111. Nagababu, E., and Rifkin, J.M. (2000). Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **273**, 839–845.
 112. Catalano, C.E., Choe, Y.S., and Ortiz de Montellano, P.R. (1989). Reactions of the protein radical in peroxide-treated myoglobin. Formation of a heme-protein cross-link. *J. Biol. Chem.* **264**, 10534–10541.
 113. Spector, A., Zhou, W., Ma, W.C., Chignell, C.F., and Reszka, K.J. (2000). Investigation of the mechanism of action of microperoxidase-11, (MP11), a potential anti-cataract agent, with hydrogen peroxide and ascorbate. *Exp. Eye Res.* **71**, 183–194.
 114. Lambair, A.M., and Dunford, H.B. (1985). Oxygen binding to dithionite-reduced chloroperoxidase. *Eur. J. Biochem.* **147**, 93–96.
 115. Mahy, J.P., Gaspard, S., Delaforge, M., and Mansuy, D. (1994). Reactions of prostaglandin-H synthase with monosubstituted hydrazines and diazenes—formation of iron(II)-diazene and iron(III)- σ -alkyl or iron(III)- σ -aryl complexes. *Eur. J. Biochem.* **226**, 445–457.
 116. Sigman, J.A., Wang, X., and Lu, Y. (2001). Coupled oxidation of heme by myoglobin is mediated by exogenous peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6945–6946.
 117. O'Carra, P. (1975). Heme-cleavage: biological systems and chemical analogs. In *Porphyrin and Metalloporphyrins*, K. Smith, ed., (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Scientific Publishing), pp. 123–153.
 118. Brown, S.B. (1976). A model for the formation of bile-pigments isomers *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.* **159**, 23–27.
 119. Cai, D.Y., and Tien, M. (1989). On the reactions of lignin peroxidase compound III (isozyme H8). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **162**, 464–469.
 120. Dordick, J.S., Klibanov, A.M., and Marletta, M.A. (1986). Horseradish peroxidase catalyzed hydroxylations: mechanistic studies. *Biochemistry* **25**, 2946–2951.
 121. Baynton, K.J., Bewtra, J.K., Biswas, N., and Taylor, K.E. (1994). Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Biochim. Biophys. Acta* **1206**, 272–278.
 122. Arnao, M.B., Acosta, M., del Rio, J.A., and Garcia-Canovas, F. (1990). Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochim. Biophys. Acta* **1038**, 85–89.
 123. Adediran, S.A. (1996). Kinetics of the formation of p-670 and of the decay of Compound III of horseradish peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **327**, 279–284.
 124. Ximenes, V.F., Catalani, L.H., and Campa, A. (2001). Oxidation of melatonin and tryptophan by and HRP cycle involving Compound III. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **287**, 130–134.
 125. DeGray, J.A., Lassmann, G., Curtis, J.F., Kennedy, T.A., Marnett, L.J., Eling, T.E., and Mason, R.P. (1992). Spectral analysis of the protein-derived tyrosyl radicals from prostaglandin H synthase. *J. Biol. Chem.* **267**, 23583–23588.
 126. Shi, W., Hoganson, C.W., Espe, M., Bender, C.J., Babcock, G.T., Palmer, G., Kulmacz, R.J., and Tsai, A. (2000). Electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopic identification and characterization of the tyrosyl radicals in prostaglandin H synthase 1. *Biochemistry* **39**, 4112–4121.
 127. Primus, J.L., Grunenwald, S., Hagedoorn, P.-L., Albrecht-Gary, A.-M., Mandon, D., and Veeger, C. (2002). The nature of the intermediates in the reactions of Fe(III)- and Mn(III)-microperoxidase-8 with H_2O_2 : a rapid kinetics study. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 1214–1221.
 128. Blodig, W., Doyle, W.A., Smith, A.T., Winterhalter, K., Choinowski, T., and Piontek, K. (1998). Autocatalytic formation of a hydroxy group at C beta of Trp171 in lignin peroxidase. *Biochemistry* **37**, 8832–8838.
 129. Doyle, W.A., Blodig, W., Veitch, N.C., Piontek, K., and Smith, A.T. (1998). Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **37**, 15097–15105.
 130. Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K.H., and Piontek, K. (1999). The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxyl group on the C-beta of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle. *J. Mol. Biol.* **286**, 809–827.
 131. Prutz, W.A. (1990). Free radical transfer involving sulphur peptide functions. In *Sulfur-Centered Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*, C. Chatgililoglu and K.D. Asmus, eds. (New York: Plenum Press), pp. 389–399.
 132. Wilks, A., and Ortiz de Montellano, P.R. (1992). Intramolecular translocation of the protein radical formed in the reaction of recombinant sperm whale myoglobin with H_2O_2 . *J. Biol. Chem.* **267**, 8827–8833.
 133. Giulivi, C., and Cadenas, E. (1998). Heme protein radicals: formation, fate, and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 269–279.
 134. Davies, M.J., and Puppo, A. (1992). Direct detection of a globin-

138

- derived radical in leghaemoglobin treated with peroxides. *Biochem. J.* 281, 197–201.
135. Pfister, T.D., Gengenbach, A.J., Syn, S., and Lu, Y. (2001). The role of redox-active amino acids on compound I stability, substrate oxidation, and protein cross-linking in yeast cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* 40, 14942–14951.
 136. Lardinois, O.M., Medzihradsky, K.F., and Ortiz de Montellano, P.R. (1999). Spin trapping and protein cross-linking of the lactoperoxidase protein radical. *J. Biol. Chem.* 274, 35441–35448.
 137. Lardinois, O.M., and Ortiz de Montellano, P.R. (2000). EPR spin-trapping of a myeloperoxidase protein radical. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 270, 199–202.
 138. Tobin, M.B., Gustafsson, C., and Huisman, G.W. (2000). Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 421–427.
 139. Bornscheuer, U.T., and Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 137–143.
 140. Çelik, A., Cullis, P.M., Sutcliffe, M.J., Sangar, R., and Raven, E.L. (2001). Engineering the active site of ascorbate peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 268, 78–85.
 141. Kim, Y.H., Berry, A.H., Spencer, D.S., and Stites, W.E. (2001). Comparing the effect on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins. *Protein Eng.* 14, 343–347.
 142. Li, Q.S., Ogawa, J., and Shimizu, S. (2001). Critical role of the residue size at position 87 in H₂O₂-dependent substrate hydroxylation activity and H₂O₂ inactivation of cytochrome P450BM-3. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 280, 1258–1261.
 143. Balagopalakrishna, C., Abugo, O.O., Horsky, J., Manoharan, P.T., Nagababu, E., and Rifkind, J.M. (1998). Superoxide produced in the heme pocket of the beta-chain of hemoglobin reacts with the beta-93 cysteine to produce a thiyl radical. *Biochemistry* 37, 13194–13202.
 144. Miyazaki, C., and Takahashi, H. (2001). Engineering of the H₂O₂-binding pocket region of a recombinant manganese peroxidase to be resistant to H₂O₂. *FEBS Lett.* 509, 111–114.
 145. Wan, L., Twitchett, M.B., Ellis, L.D., Mauk, A.G., and Smith, M. (1990). *In vitro* evolution of horse heart myoglobin to increase peroxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12825–12831.
 146. Iffland, A., Tafelmeyer, P., Saudan, C., and Johnsson, K. (2000). Directed molecular evolution of cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* 39, 10790–10798.
 147. Joo, H., Lin, Z., and Arnold, F.H. (1999). Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature* 399, 670–673.
 148. Dexter, A.F., and Hager, L.P. (1995). Transient heme n-alkylation of chloroperoxidase by terminal alkenes and alkynes. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 817–818.
 149. van de Velde, F., Bakker, M., van Rantwijk, F., Rai, G.P., Hager, L.P., and Sheldon, R.A. (2001). Engineering chloroperoxidase for activity and stability. *J. Mol. Cat. B Enz.* 11, 765–769.
 150. Cherry, J.R., Lamsa, M.H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., and Pedersen, A.H. (1999). Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nat. Biotechnol.* 17, 379–384.
 151. Davies, M.J., and Dean, R.T. (1997). Radical-Mediated Protein Oxidation. From Chemistry to Medicine. (New York: Oxford Science Publications).
 152. Wu, G., Vuletic, J.L., Kulmacz, R.J., Osawa, Y., and Tsai, A. (2001). Peroxidase self-inactivation in prostaglandin H synthase-1 pretreated with cyclooxygenase inhibitors or substituted with manganese porphyrin IX. *J. Biol. Chem.* 276, 19879–19888.
 153. Henriksen, A., Mirza, O., Indiana, C., Teilum, K., Smulevich, G., Welinder, K., and Gajhede, M. (2001). Structure of soybean seed coat peroxidase: a plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Sci.* 10, 108–115.
 154. Ostergaard, L., Teilum, K., Mirza, O., Mattsson, O., Petersen, M., Welinder, K.G., Mundy, J., Gajhede, M., and Henriksen, A. (2000). *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Mol. Biol.* 44, 231–243.
 155. Henriksen, A., Welinder, K.G., and Gajhede, M. (1998). Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9 Å resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH. *J. Biol. Chem.* 273, 2241–2248.
 156. Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T., and Poulos, T.L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4, 1032–1038.
 157. Schuller, D.J., Ban, N., Huystee, R.B., McPherson, A., and Poulos, T.L. (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* 4, 311–321.
 158. Mirza, O., Oestergaard, L., Welinder, K.G., Henriksen, A., and Gajhede, M. (2000). *Arabidopsis thaliana* peroxidase N: structure of a novel neutral peroxidase. *Acta Crystallogr. D* 56, 372–375.
 159. Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M.H., and Poulos, T.L. (1994). Preliminary crystallographic analysis of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Mol. Biol.* 238, 845–848.
 160. Fukuyama, K., Kunishima, N., Amada, F., Kubota, T., and Matsumura, H. (1995). Crystal structures of cyanide- and triiodide-bound forms of *Arthromyces ramosus* peroxidase at different pH values. Perturbations of active site residues and their implication in enzyme catalysis. *J. Biol. Chem.* 270, 21884–21892.
 161. Fitzgerald, M.M., Musah, R.A., Mcree, D.E., and Goodin, D.B. (1996). A ligand-gated, hinged loop rearrangement opens a channel to a buried artificial protein cavity. *Nat. Struct. Biol.* 3, 626–631.
 162. Patterson, W.R., and Poulos, T.L. (1995). Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry* 34, 4331–4341.
 163. Sundaramoorthy, M., Turner, J., and Poulos, T.L. (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure* 3, 1367–1377.
 164. Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F., and Mcree, D.E. (2000). Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol. Cell* 5, 121–131.
 165. Sevrioukova, I.F., Li, H., Zhang, H., Peterson, J.A., and Poulos, T.L. (1999). Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1863–1868.
 166. Hasemann, C.A., Ravichandran, K.G., Peterson, J.A., and Deisenhofer, J. (1994). Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 236, 1169–1185.
 167. Park, S.Y., Shimizu, H., Adachi, S., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nakahara, K., Shoun, H., Obayashi, E., Nakamura, H., Iizuka, T., et al. (1997). Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *Nat. Struct. Biol.* 4, 827–832.
 168. Podust, L.M., Poulos, T.L., and Waterman, M.R. (2001). Crystal structure of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylase (Cyp51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3068–3073.
 169. Yano, J.K., Koo, L.S., Schuller, D.J., Li, H., Ortiz de Montellano, P.R., and Poulos, T.L. (2000). Crystal structure of a thermophilic cytochrome P450 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.* 275, 31086–31092.
 170. Poulos, T.L., and Howard, A.J. (1987). Crystal structures of metyrapone- and phenylimidazole-inhibited complexes of cytochrome P-450cam. *Biochemistry* 26, 8165–8174.
 171. Lide, D.R. (2000). Handbook of Chemistry and Physics. (Boca Raton, FL: CRC Press LLC).

ACADEMIC
PRESS

Biochemical and Biophysical Research Communications 295 (2002) 828–831

BBRC

www.academicpress.com

Cross-linked crystals of chloroperoxidase

Marcela Ayala,* Eduardo Horjales, Michael A. Pickard, and Rafael Vazquez-Duhalt

Institute of Biotechnology, UNAM. Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

Received 14 June 2002

6 Abstract

7 Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* was crystallized. The crystals were modified with several cross-linkers, but only
8 glutaraldehyde was able to produce catalytically active and insoluble crystals. Unlike other immobilized chloroperoxidase prepa-
9 rations, these catalytic crystals are more thermostable than the unmodified soluble enzyme. The enhanced stability is probably due
10 to the structure conservation in the crystalline matrix. In addition, non-cross-linked chloroperoxidase crystals retained more activity
11 than the soluble enzyme after incubation in an organic solvent with low water content. Although the cross-linked crystals were
12 catalytically active, they showed lower specific activity than the soluble enzyme. This low activity may be due to non-specific re-
13 actions between the cross-linker and essential residues for catalysis. Alternative cross-linking strategies are discussed. © 2002
14 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

15 **Keywords:** Biocatalysis; Chloroperoxidase; CLEC; Cross-linked crystals; Stability

16 Protein stability is one of the major challenges for
17 large-scale use of enzymes. Cross-linked enzyme crystals
18 are a suitable preparation that confers structural resis-
19 tance to proteins by stabilization of the crystalline matrix
20 [1,2]. In crystals, protein molecules are symmetrically
21 arranged and their native conformation is stabilized [3].
22 These crystalline biocatalysts are more stable than soluble
23 enzymes when exposed to organic solvents and high
24 temperatures, conditions normally found in many in-
25 dustrial processes. Moreover, cross-linked enzyme crys-
26 tals are mechanically resistant and can be recycled and
27 reused. Although there are several cross-linked crystals
28 commercially available, most of them are prepared with
29 hydrolytic enzymes, but few are available for other reac-
30 tions such as redox processes.

31 Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* is the
32 most versatile and unusual heme-peroxidase. In vitro,
33 chloroperoxidase shows halogenase-, peroxidase-, cata-
34 lase-, and cytochrome P450-like activities [4]. This en-
35 zyme has wide potential applications, ranging from
36 synthesis of optically pure compounds [5] to environ-
37 mentally related processes [6]. In spite of this, few re-
38 ports dealing with chloroperoxidase immobilization are

available [7–9]. Immobilized forms of chloroperoxidase 39
have shown some advantages over the soluble form [10– 40
12], nevertheless no improved stability was conferred by 41
the immobilization procedure. Chloroperoxidase in both 42
soluble and immobilized preparations is readily inacti- 43
vated above 50 °C [13], limiting its use in many fields. 44

This is the first report of a cross-linked crystal of a 45
peroxidase. The chloroperoxidase cross-linked crystals 46
showed lower activity but increased thermostability 47
when compared to the soluble enzyme. 48

Materials and methods 49

Chemicals. 1,6-Hexandiamine, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) 50
carbodiimide hydrochloride, glutaraldehyde, cacodylic acid, thioani- 51
sole, and thianthrene were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, 52
MO). Zinc acetate was obtained from Fluka Chemie GmbH (Buchs, 53
Switzerland). Polyethylene glycol 8000 was purchased from Hampton 54
Research (Laguna Niguel, CA). Buffer salts and organic solvents were 55
obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). Chloroperoxidase from 56
C. fumago CMI 89362 was obtained and purified as previously re- 57
ported [14]. The $R_z (A_{403}/A_{280})$ of the enzyme was 1.42. 58

Crystallization of chloroperoxidase. The enzyme was crystallized in 59
sitting drops using the vapor diffusion method. Thirty microliters of a 60
7 mg/mL chloroperoxidase solution in 10 mM phosphate buffer, pH 5 61
was mixed with 30 μ L of the crystallization solution. The crystalliza- 62
tion solution contained 14% polyethylene glycol 8000, 0.1 M zinc ac- 63
etate, and 0.1 M sodium cacodylate, pH 5.5. The reservoir contained 64

* Corresponding author. Fax: +52-777-317-2388.
E-mail address: maa@ibt.unam.mx (M. Ayala).

65 1 mL of the crystallization solution. The drops were equilibrated for
66 15 days at 18 °C and microseeded with 1 μ L of crushed crystals. Fine
67 needles 25–50 μ m wide grew under these conditions and after 10 days
68 the crystallization was complete. The crystals were recovered and
69 washed with a solution containing 25% polyethylene glycol 8000, 0.1 M
70 zinc acetate, and 0.1 M sodium cacodylate, pH 5.5.

71 **Chemical modification of crystals.** To increase the number of amino
72 groups of chloroperoxidase molecules inside the crystals, a chemical
73 modification was performed using carbodiimide chemistry. The crystals
74 were washed in a solution containing 25% polyethylene glycol
75 8000, 0.075 M zinc sulfate, and 0.1 M sodium cacodylate, pH 5.5. Zinc
76 acetate was replaced by the sulfate salt as carboxylate groups interfere
77 with the reaction. Hexandiamine (250 M excess) and carbodiimide
78 (500 M excess) were prepared separately and the pH was adjusted to
79 pH 5.5. The reactants were added to the crystals and the reaction
80 mixture was gently stirred for 2 h at room temperature. Crystals were
81 recovered by gentle centrifugation and washed with the original solution
82 containing acetate salt.

83 **Cross-linking of crystals.** The crystals were washed in a solution
84 containing 25% polyethylene glycol 8000, 0.1 M zinc acetate, and 0.1 M
85 sodium cacodylate, pH 6.5. Different proportions of glutaraldehyde
86 were added and the reaction was gently stirred for 1 h at room temperature.
87 Crystals were recovered and washed as described above.

88 **Enzymatic activity measurements.** The oxidation of thioanisole and
89 thianthrene was followed spectrophotometrically at 250 nm
90 ($\epsilon = 8050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and 254 nm ($\epsilon = 35,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) respectively.
91 Reactions were performed in 1 mL containing 20 mM KCl and 20%
92 *tert*-butanol in 60 mM citrate buffer, pH 3. The reaction was started by
93 adding 1 mM H_2O_2 . The reaction was stopped after 1 min by adding an
94 excess of Na_2SO_3 and initial rates were calculated using the difference
95 between the initial and final absorbance. H_2O_2 dismutation due to
96 catalase-like activity of chloroperoxidase was measured at pH 4 by
97 following the loss of absorbance at 240 nm ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [15].
98 Residual activity was measured with monochlorodimedone, as described
99 by Hollenberg and Hager [16]. Reported values are the mean of
100 three replicates. Crystals were recovered from the reaction mixture by
101 centrifugation. For protein determination of the crystals, a modified
102 version of Lowry's method was used according to Spilburg et al. [17].

103 **Determination of free amino groups.** A fluorescent method was used
104 to measure free amino groups in chloroperoxidase. Briefly, after the
105 chemical modification procedure the crystals were dissolved in buffer.
106 The same amount of unmodified and modified protein was treated with
107 *o*-phthalaldehyde and the resulting complex was detected as described
108 by Benson and Hare [18]. The degree of modification was
109 calculated based on the difference between the fluorescence intensity of
110 the unmodified and modified enzyme.

111 Results and discussion

112 Protein crystals are porous materials in which the
113 diffusion of small molecules is possible. To avoid mass
114 transfer limitations, microcrystals less than 100 μ m in
115 one-dimension are preferred [1,19]. Chloroperoxidase
116 was crystallized and the microcrystals retained catalytic
117 activity which were suitable in size for biocatalytic applications (Fig. 1).
118 Symmetrical arrangement of molecules confers structural stability to proteins [3].
119 The benefit of an ordered matrix is reflected by the higher
120 residual activity of non-cross-linked crystals after incubation in *tert*-butanol
121 with low water content, as shown in Table 1.

124 Several bifunctional agents such as glutaraldehyde,
125 adipoyl chloride, and carbodiimide plus diamines of dif-

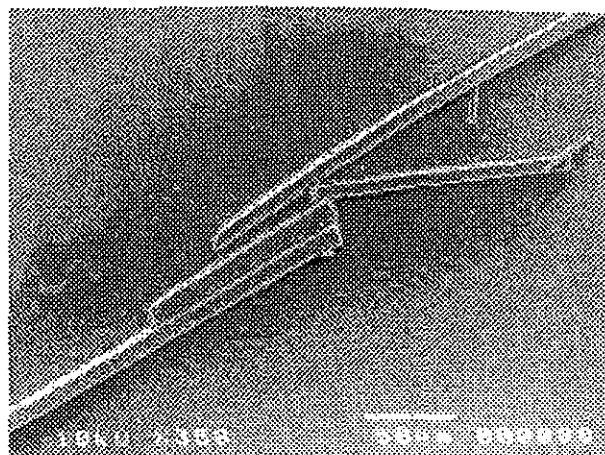


Fig. 1. Scanning electron micrograph of chloroperoxidase microcrystals.

Table 1
Residual activity of soluble and crystalline native chloroperoxidase after 1 h incubation in 99% *tert*-butanol and 1% acetate buffer, pH 6

Temperature (°C)	Soluble enzyme (% residual activity)	Unmodified crystals (% residual activity)
30	31	50
40	28	51
50	7	38

ferent length were assayed to stabilize the crystalline
matrix by intermolecular cross-linking. However, only
glutaraldehyde produced water-insoluble crystals. This
may be due to the ability of glutaraldehyde to form different
sized polymers in solution, with the advantage that
the distance between two amino acids can be covered by
one of those species [20]. In contrast, other cross-linkers
lacking this property might not have the appropriate
length to form bonds between two amino acids.

Glutaraldehyde is not a specific reagent for a particular
amino acid. The reaction involves a nucleophilic attack and
generally lysines are the target for glutaraldehyde as they
are strong nucleophiles under alkaline pH. However, because
chloroperoxidase suffers an irreversible inactivation at pH
above 7.5, the cross-linking reactions were performed at
pH 6.5 under conditions where lysines are protonated and
are not strong nucleophiles. The combination of these inherent
properties of the enzyme resulted in a requirement of high
concentrations of glutaraldehyde in the reaction to produce
insoluble crystals. Fig. 2A shows the decreased activity of
the crystals as the concentration of glutaraldehyde increased.
An amino acid analysis of cross-linked crystals indicated that
not only lysines but also serines and arginines were modified
(data not shown). The enzyme seems to be inactivated by
glutaraldehyde reactions with amino acid residues which are
essential for activity.

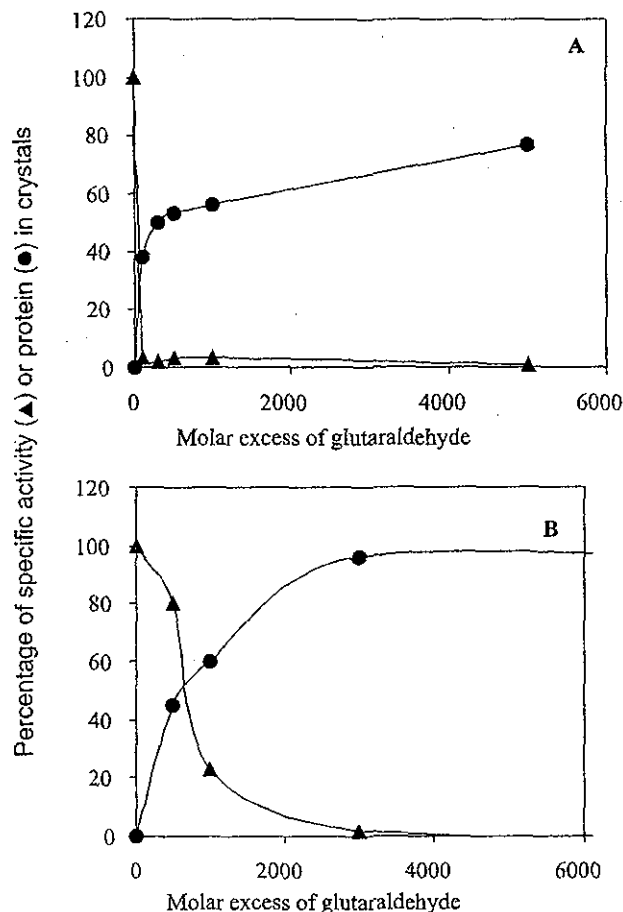


Fig. 2. Activity (▲) and solubility (●) of unmodified (A) and chemically modified (B) crystals after cross-linking with different amounts of glutaraldehyde.

153 There are five lysines in chloroperoxidase; only three
154 of them are on the surface of the protein and they are
155 not homogeneously distributed [21]. To enhance the
156 intermolecular cross-linking and reduce the inactivation
157 of the enzyme, a chemical modification was performed
158 to increase the amount of amino groups on the protein
159 surface. Hexandiamine moieties were covalently coupled
160 to free carboxylic groups by carbodiimide chemistry.
161 The activity and solubility profiles of the crystals after
162 treatment with different amounts of glutaraldehyde were
163 significantly altered once the chemical modification was
164 performed (Fig. 2B). The chemical modification with

hexandiamine increased the number of free amino
groups per chloroperoxidase molecule to 10, and the
activity retained in the crystals increased; nevertheless, a
major portion of the enzyme was still inactivated.

Kinetic constants of cross-linked crystals and soluble
chloroperoxidase for the sulfoxidation of thianthrene and
thioanisole and the dismutation of H_2O_2 are shown in
Table 2. Thianthrene and thioanisole are model com-
pounds for sulfur-containing organic molecules present in
fuels such as diesel; the oxidation of such compounds is a
key step in enzymatic biodesulfurization processes [6,22].
The activity of the cross-linked crystals was lower than
that of the soluble enzyme. However, the activity was
lowest for the more voluminous substrate and it increased
as the size of the substrate decreased. For thianthrene,
thioanisole, and H_2O_2 the catalytic efficiency of cross-
linked crystals was three, two, and one order of magnitude
lower than that of the soluble enzyme, respectively. These
results might reflect accessibility problems for bulky
substrates to the interior of the crystals, thus lowering the
catalytic efficiency of the cross-linked crystals.

These cross-linked crystals of chloroperoxidase
showed improved stability to temperature. Fig. 3 shows
the residual activity of the crystalline and soluble en-
zyme after 1 h of incubation at different temperatures.
Clearly the crystals retained most of its catalytic activity
at temperatures up to 70 °C. This results from the
structural stability of protein molecules inside the crys-
talline array. The increased stability may come from
both the pre-ordered arrangement of the molecules and
the rigidity of the three-dimensional structure of mole-
cules caused by cross-linking. In solution and in the
absence of such stabilizing factors, the native confor-
mation is readily lost and enzyme is inactivated.

A more refined cross-linking strategy could be envis-
aged as an alternative to stabilize chloroperoxidase crys-
tals. Chloroperoxidase contains a large number of
superficial aspartic and glutamic amino acids. It could be
feasible to design a bifunctional amine to form intermo-
lecular bonds between carboxylic groups using carbodi-
imide as a zero-length cross-linker. The three-dimensional
arrangement of protein molecules in the crystal must be
known to carry out such procedure. Based on the infor-
mation given by X-ray diffraction, it might be possible to
find an appropriate diamine to cover the distance between
two carboxylic groups in adjacent protein molecules.

Table 2
Kinetic constants for the oxidation of thianthrene and thioanisole, and the dismutation of H_2O_2

Substrate	Soluble			Cross-linked crystals		
	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
Thianthrene	555	0.0033	1.6×10^8	0.85	0.0073	1.1×10^5
Thioanisole	4170	1.75	2.3×10^6	28	2.2	1.2×10^4
H_2O_2	1670	10	1.6×10^5	55	4.6	1.2×10^4

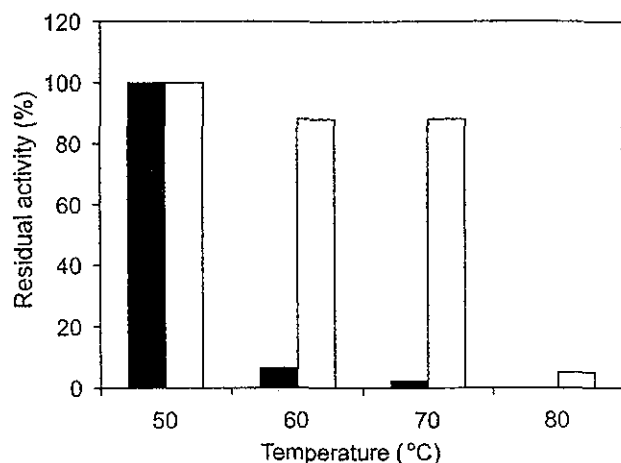


Fig. 3. Residual activity of cross-linked crystals of chloroperoxidase (□) and soluble enzyme (■) after a 1 h incubation at different temperatures.

211 In conclusion, this is the first report of cross-linked
212 crystals of a peroxidase. Unmodified crystals of chlor-
213 operoxidase retained more activity than soluble enzyme
214 upon exposure to a water-miscible organic solvent with
215 low water content, which reflects the benefit of an or-
216 dered arrangement of molecules. In contrast to other
217 immobilization procedures, crystal cross-linking yielded
218 a chloroperoxidase preparation with enhanced thermal
219 resistance. Substrate accessibility problems may reduce
220 the number of effective active sites available for cataly-
221 sis, thus lowering the observed specific activity of the
222 cross-linked crystals. The crystals lost activity as a result
223 of the cross-linking treatment with glutaraldehyde.
224 Chloroperoxidase crystal structure information is cur-
225 rently used to design a better cross-linker to minimize
226 the activity loss.

227 Acknowledgments

228 This work was supported by a grant from the Mexican Petroleum
229 Institute (FIES 98-110-VI) and from the National Council for Science
230 and Technology of Mexico (Grant 33611-U).

231 References

- 232 [1] A.L. Margolin, Novel crystalline catalysts, Trends Biotechnol. 14
233 (1996) 223–230.
234 [2] M.A. Navia, N.L. St.Clair, J.P. Griffith, Crosslinked enzyme
235 crystals as immobilized enzyme particles, in: W.J.J. van den Tweel,
236 A. Harder, R.M. Buitelaar (Eds.), Stability and Stabilization of
237 Enzymes, Elsevier, Maastricht, The Netherlands, 1992, pp. 63–73.

- [3] B. Shenoy, Y. Wang, W. Shan, A.L. Margolin, Stability of 238
crystalline proteins, Biotechnol. Bioeng. 73 (2001) 358–369. 239
[4] S. Colonna, N. Gaggero, C. Richelmi, P. Pasta, Recent biotech- 240
nological developments in the use of peroxidases, Trends Bio- 241
technol. 17 (1999) 163–168. 242
[5] F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Selective oxygen transfer catal- 243
ysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects, 244
Curr. Opin. Biotechnol. 11 (2000) 554–564. 245
[6] M. Ayala, R. Tinoco, V. Hernandez, P. Bremauntz, R. Vazquez- 246
Duhalt, Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to 247
biodesulfurization, Fuel Process. Technol. 57 (1998) 101–111. 248
[7] T.A. Kadima, M.A. Pickard, Immobilization of chloroperoxidase 249
on aminopropyl-glass, Appl. Environ. Microbiol. 56 (1990) 3473– 250
3477. 251
[8] S. Aoun, C. Chebli, M. Baboulene, Noncovalent immobilization 252
of chloroperoxidase onto talc: catalytic properties of a new 253
biocatalyst, Enzyme Microb. Technol. 23 (1998) 380–385. 254
[9] M. Bakker, F. van de Velde, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, 255
Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into 256
polyurethane foams, Biotechnol. Bioeng. 70 (2000) 342–348. 257
[10] S. Aoun, M. Baboulene, Regioselective bromohydroxylation of 258
alkenes catalyzed by chloroperoxidase: advantages of the immo- 259
bilization of enzyme on talc, J. Mol. Catal. B: Enzymatic 4 (1998) 260
101–109. 261
[11] F. van de Velde, M. Bakker, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, 262
Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidations in hydro- 263
phobic organic media, Biotechnol. Bioeng. 72 (2001) 523–529. 264
[12] F. van de Velde, N.D. Lourenco, M. Bakker, F. van Rantwijk, 265
R.A. Sheldon, Improved operational stability of peroxidases by 266
coimmobilization with glucose oxidase, Biotechnol. Bioeng. 69 267
(2000) 286–291. 268
[13] M.A. Pickard, A. Hashimoto, Stability and carbohydrate com- 269
position of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in a 270
fructose-salts medium, Can. J. Microbiol. 34 (1988) 998–1002. 271
[14] M.A. Pickard, T.A. Kadima, R.D. Carmichael, Chloroperoxidase, 272
a peroxidase with potential, J. Ind. Microbiol. 7 (1991) 235–242. 273
[15] M.B. Arano, M. Acosta, J.A. del Río, R. Varón, F. García- 274
Cánovas, A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase 275
by hydrogen peroxide, Biochim. Biophys. Acta 1041 (1990) 43–47. 276
[16] P.F. Hollenberg, L.P. Hager, Purification of chloroperoxidase from 277
Caldariomyces fumago, Methods Enzymol. 52 (1978) 521–529. 278
[17] C.A. Spilburg, J.L. Bethune, B.L. Vallee, Kinetic properties of 279
crystalline enzymes. Carboxypeptidase A, Biochemistry 16 (1977) 280
1142–1150. 281
[18] J.R. Benson, P.E. Hare, *o*-Phthalaldehyde: fluorogenic detection 282
of primary amines in the picomole range. Comparison with 283
fluorescamine and ninhydrin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 284
(1975) 619–622. 285
[19] W. Fischer, V. Kasche, Immobilized enzymes: crystals or carriers? 286
Trends Biotechnol. 17 (1999) 326–335. 287
[20] D.R. Walt, V.I. Agayn, The chemistry of enzyme and protein 288
immobilization with glutaraldehyde, Trends Anal. Chem. 13 289
(1994) 425–430. 290
[21] M. Sundaramoorthy, J. Terner, T.L. Poulos, The crystal structure 291
of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 func- 292
tional hybrid, Structure 3 (1995) 1367–1377. 293
[22] M. Ayala, N.R. Robledo, A. Lopez-Munguia, R. Vazquez- 294
Duhalt, Substrate specificity and ionization potential in chlorop- 295
eroxidase-catalyzed oxidation of diesel fuel, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 2804–2809. 296
297