

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA
CLOROPEROXIDASA Y BIOCATÁLISIS
EN SOLVENTES ORGÁNICOS**

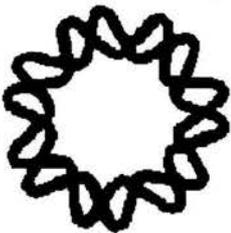
TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

I. BQ. ADRIANA MARGARITA LONGORIA HERNÁNDEZ

TUTOR: DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT



CUERNAVACA, MORELOS

2004



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.

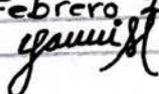
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: ADRIANA MARGARITA

LONGORIA HERNÁNDEZ

FECHA: 9 Febrero 2004

FIRMA: 

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Rafael Vázquez Duhalt.

Los estudios de maestría fueron posibles gracias a las becas otorgadas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

A mis padres Rodolfo y Margarita con amor. Gracias por su apoyo y por permitirme llegar hasta donde estoy pues he tenido la oportunidad de vivir un sin fin de experiencias.

A mis hermanas Elsa, Minerva, Tania, Xóchitl, María del Carmen, Juanita y a mi hermano Eder. Gracias por su apoyo y cariño.

A Raunel con admiración y cariño. Gracias por los consejos, enseñanzas y apoyo incondicional durante la realización de este sueño.

A mis amigas Berenice y Ericka. Gracias por creer en mí y apoyarme en todo lo que hago, las quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial, le agradezco al Dr. Rafael Vázquez Duhalt todas las enseñanzas y la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

Al M. en B. Raunel Tinoco por el entrenamiento, apoyo técnico y académico durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Michael Pickard por la donación de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*.

A los miembros del Comité Tutorial: Dr. Agustín López Munguía-Canales y Dr. Humberto Flores Soto por contribuir a mi formación profesional.

A los miembros del jurado revisor: Dra. Amelia Farrés González-Saravia, Dra. María del Refugio Trejo Hernández, Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera y Dr. Eduardo Torres Ramírez. Gracias por las sugerencias para que éste documento fuese mejor.

Al Ing. Ildelfonso Pérez Yáñez por su apoyo en la fase final de la licenciatura.

A la Biol. Rosa Román por el apoyo técnico brindado en el laboratorio.

A los recalcitrantes Raunel, Rosa, Marcela, Humberto, Juan, Gabriela, Nuria, Gustavo, Jorge, Carmen, Rosalía, Paloma y Juan Carlos por las experiencias compartidas y las cosas que he aprendido de cada uno de ellos.

A mis compañeros de generación y a todas y cada una de las personas que contribuyeron de alguna manera a la realización de este trabajo.

INDICE

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. ANTECEDENTES	4
1.1 IMPACTO AMBIENTAL DE LOS COMBUSTIBLES FÓSILES	4
1.2 DESULFURACIÓN DE LOS COMBUSTIBLES FÓSILES	9
1.2.1 Hidrodesulfuración.....	11
1.2.2 Alternativas biológicas.....	12
1.3 CLOROPEROXIDASA DEL HONGO <i>CALDARIOMYCES FUMAGO</i>	17
1.3.1 Origen	18
1.3.2 Actividades catalíticas.....	18
1.3.3 Ciclo catalítico.....	20
1.3.4 Comparación con otras peroxidasas	22
1.3.5 Desulfuración enzimática y transformación de asfaltenos.....	23
1.4 BIOCATALISIS EN SOLVENTES ORGÁNICOS.....	28
1.5 MODIFICACIÓN QUÍMICA.....	32
1.5.1 Generalidades.....	32
1.5.2 Pegilación.....	33
1.6 PLÁSTICOS BIOCATALÍTICOS	36
1.7 INMOVILIZACIÓN EN CELITA	38

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1 REACTIVOS Y ENZIMA	40
3.2 EQUIPO	40
3.3 MÉTODOS	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA CLOROPEROXIDASA.....	46
4.1.1 Pegilación de los grupos amino.....	48
4.1.2 Pegilación de los grupos carboxilo	52
4.2 COPOLIMERIZACIÓN DE LA CLOROPEROXIDASA CON POLIURETANO.....	56
4.3 INMOVILIZACIÓN DE LA CLOROPEROXIDASA EN CELITA	58
4.4 EFECTO DE LAS DIFERENTES PREPARACIONES DE LA CLOROPEROXIDASA SOBRE SU ACTIVIDAD EN SOLVENTES ORGÁNICOS, TERMOESTABILIDAD Y PERFIL DE pH.....	59
5. CONCLUSIONES.....	68
6. PERSPECTIVAS.....	69
7. REFERENCIAS	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.1	Mezclas mexicanas de crudo preparadas para exportación	5
Tabla 1.2.1	Nomenclatura y tipo de compuestos organoazufrados presentes en el petróleo	10
Tabla 1.3.2.1	Actividades catalíticas de la cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i>	19
Tabla 1.3.4.1	Sulfoxidación de metil fenil sulfuro por diferentes peroxidasas	23
Tabla 1.3.5.1	Oxidación enzimática y destilación de diesel primario	25
Tabla 1.4.1	Causas del decremento de la actividad de las enzimas en solventes orgánicos comparada con la actividad en agua y alternativas de solución	30
Tabla 4.1.1.1	Modificación química sobre los grupos carboxilo de la cloroperoxidasa con hexandiamina mediada por etilencarbodiimida	49
Tabla 4.1.1.2	Pegilación de los grupos amino de la cloroperoxidasa	50
Tabla 4.1.2.1	Pegilación de los grupos carboxilo de la cloroperoxidasa	54
Tabla 4.4.1	Actividad específica de las diferentes preparaciones de la cloroperoxidasa en medio con 10% de <i>tert</i> -butanol	59
Tabla 4.4.2	Actividad específica máxima de las diferentes preparaciones de la cloroperoxidasa en medio acuoso	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.1	Contenido de azufre de los crudos mexicanos	5
Figura 1.1.2	Emisiones antropogénicas de azufre durante los últimos años	6
Figura 1.2.2.1	Vía de desulfuración del dibenzotiofeno por <i>Rhodococcus erythropolis</i>	14
Figura 1.3.1	Estructura de la cloroperoxidasa del hongo <i>Caldariomyces fumago</i>	17
Figura 1.3.3.1	Ciclo catalítico de la cloroperoxidasa	20
Figura 1.3.5.1	Cromatogramas del diesel primario, (a) antes y (b) después del tratamiento enzimático con cloroperoxidasa	24
Figura 1.3.5.2	Porfina	26
Figura 1.3.5.3	Espectro UV-visible de una fracción de asfaltenos rica en petroporfirinas con y sin cloroperoxidasa y H ₂ O ₂	27
Figura 1.6.1	Unión covalente de las enzimas dentro de espumas de poliuretano	37
Figura 4.1.1	Mecanismo de reacción de carbodiimidas con grupos carboxilo de proteínas	48
Figura 4.1.1.1	Perfil de elución en una columna de intercambio aniónico de la cloroperoxidasa y las preparaciones obtenidas empleando metoxipolietilenglicol	51
Figura 4.1.2.1	Perfil de elución en una columna de intercambio aniónico de la cloroperoxidasa y las preparaciones obtenidas empleando metoxipolietilenglicol amino	53
Figura 4.1.2.2	Sitio activo de la cloroperoxidasa	55
Figura 4.4.1	Actividad de la cloroperoxidasa y sus modificaciones en solvente orgánico	61
Figura 4.4.2	Termoestabilidad de la cloroperoxidasa y sus modificaciones	63
Figura 4.4.3	Perfil de pH de actividad halogenasa para las diferentes modificaciones de la cloroperoxidasa	65
Figura 4.4.4	Perfil de pH de actividad peroxidasa para las diferentes modificaciones de la cloroperoxidasa	66

ABREVIATURAS

BDS	Biodesulfuración.
CAT	Catecol.
CPO	Cloroperoxidasa.
CPO-Celita	Cloroperoxidasa inmovilizada en celita.
CPO-HEX-PEG	Cloroperoxidasa modificada químicamente con hexandiamina seguida de otra modificación con metoxipolietilenglicol.
CPO-PEG	Cloroperoxidasa modificada sobre sus grupos amino con metoxipolietilenglicol.
CPO-PEGNH₂	Cloroperoxidasa modificada sobre sus grupos carboxilo con metoxipolietilenglicol amino.
CPO-PU	Cloroperoxidasa copolimerizada con poliuretano.
ECD	Hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida ó etilencarbodiimida.
HDS	Hidrodeshulfuración.
HEX	1,6-hexandiamina.
MCD	Monoclorodimedona.
OPA	o-Ftalaldehído.
PEG	Metoxipolietilenglicol.
PEGNH₂	Metoxipolietilenglicol amino.

RESUMEN

La cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* presenta características atractivas para su posible aplicación en un proceso de biodesulfuración para la industria petrolera. Esta enzima cataliza la oxidación de compuestos organoazufrados presentes en el diesel primario a sus correspondientes sulfóxidos y sulfonas, que pueden ser removidos por destilación. Sin embargo, al igual que otras enzimas, la cloroperoxidasa pierde su actividad catalítica en condiciones típicas de los procesos de la industria petrolera, como son altas temperaturas y la presencia de solventes orgánicos.

Con el propósito de aumentar la tolerancia a la presencia de altos porcentajes de solvente orgánico en el medio de reacción, en este trabajo se sometió a la cloroperoxidasa a procesos tales como la modificación covalente con polietilenglicol, la copolimerización con poliuretano y la inmovilización en celita. Se determinaron los perfiles de pH, la actividad en solventes orgánicos y la termoestabilidad de las preparaciones obtenidas para compararlas con la cloroperoxidasa no modificada.

Las preparaciones presentaron menor actividad halogenasa que la cloroperoxidasa nativa. Parece ser que la modificación con polietilenglicol ocurre sobre grupos funcionales importantes para la catálisis provocando la pérdida de actividad, mientras que la reacción de copolimerización con poliuretano es exotérmica, lo que también provoca pérdida de actividad.

La cloroperoxidasa copolimerizada con poliuretano presentó mayor termoestabilidad que la enzima nativa, pues mantuvo el 92% de su actividad halogenasa después de una hora de incubación a 50°C, comparado con el 77% de la enzima nativa. Esto puede deberse a que la unión covalente a la red polimérica de varios residuos de la proteína retardan el proceso de desnaturalización provocado por la temperatura. Estas uniones no parecen ser suficientes para lograr la estabilización de la cloroperoxidasa a temperaturas mayores a 50°C.

Mientras que el perfil de pH de actividad halogenasa de las preparaciones fue similar al de la enzima nativa, éstas presentaron actividad peroxidasa a pH 7, condición en la cual la cloroperoxidasa se inactiva. Las diferentes preparaciones presentaron un perfil de actividad en solvente orgánico similar al de la cloroperoxidasa nativa.

En conclusión, las preparaciones obtenidas en este trabajo no presentaron características muy diferentes a las de la cloroperoxidasa que permitan su aplicación en la industria petrolera. Sin embargo, las técnicas de modificación química empleadas en el presente trabajo pueden ser aplicadas a otros sistemas enzimáticos.

INTRODUCCIÓN

El uso de combustibles fósiles crea muchos problemas de contaminación, entre ellos, la emisión de óxidos de azufre, que son transformados a ácidos por la química de la atmósfera. Estos ácidos forman parte de la lluvia ácida. Los crudos mexicanos sobrepasan la media mundial en contenido de azufre, lo que representa serios problemas para su refinación y comercialización. Se ha patentado un proceso enzimático de biodesulfuración, en el cual la cloroperoxidasa cataliza la oxidación específica de compuestos azufrados presentes en el diesel primario a los correspondientes sulfóxidos y sulfonas. Posteriormente, la mayoría de ellos son removidos por destilación. Sin embargo, este proceso se realiza en un medio de reacción acuoso y con bajo contenido de solvente orgánico. Es necesario entonces, que la cloroperoxidasa sea estable y activa en solventes orgánicos y de ser posible, utilizarla en el diesel con muy bajas concentraciones de agua.

Se ha reportado que la modificación química de hemoenzimas y hemoproteínas con moléculas anfifílicas tales como el polietilenglicol, incrementa la solubilidad de las proteínas en solventes orgánicos, mejora sus propiedades catalíticas e incrementa su número de sustratos. Por otro lado, se ha demostrado la actividad en solventes orgánicos de enzimas copolimerizadas con poliuretano e inmovilizadas en celita. Dado que la modificación química es una alternativa para mejorar las propiedades catalíticas de la enzima con la finalidad de ser usada como catalizador en un proceso de biodesulfuración aplicable en la industria petrolera, en este trabajo se planteó el objetivo principal de estudiar el efecto de diferentes preparaciones de la cloroperoxidasa sobre su actividad en solvente orgánico, termoestabilidad y perfil de pH.

1. ANTECEDENTES

1.1 Impacto ambiental de los combustibles fósiles

El uso de combustibles fósiles derivados del petróleo está muy generalizado en la vida moderna. El petróleo es la principal fuente de energía primaria y de él se obtiene gasolina, keroseno y diesel, entre otros, que son los combustibles para automóviles, tractores, camiones, aviones y barcos. El gas natural y el petróleo se emplean en la generación de calor en casas y edificios comerciales, además de que se utilizan para generar electricidad. Muchos productos derivados del petróleo sirven como materias primas para la elaboración de una serie de materiales como fibras sintéticas para ropa y plásticos, pinturas, fertilizantes, insecticidas, jabones y gomas sintéticas.

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos lineales y aromáticos con cantidades significativas de compuestos orgánicos que contienen azufre, oxígeno y nitrógeno en su estructura, así como trazas de algunos metales, particularmente, vanadio, níquel, hierro y cobre [1]. El contenido de azufre es un indicador de la calidad del petróleo y oscila entre 0.05 y 5%, dependiendo de la fuente de origen [1]. En general, la distribución de azufre en los crudos es tal que la proporción aumenta conforme se incrementa el punto de ebullición de la fracción destilada [2]. Los crudos mexicanos sobrepasan la media mundial en contenido de azufre (Figura 1.1.1), lo que aumenta los problemas durante su refinación y comercialización.

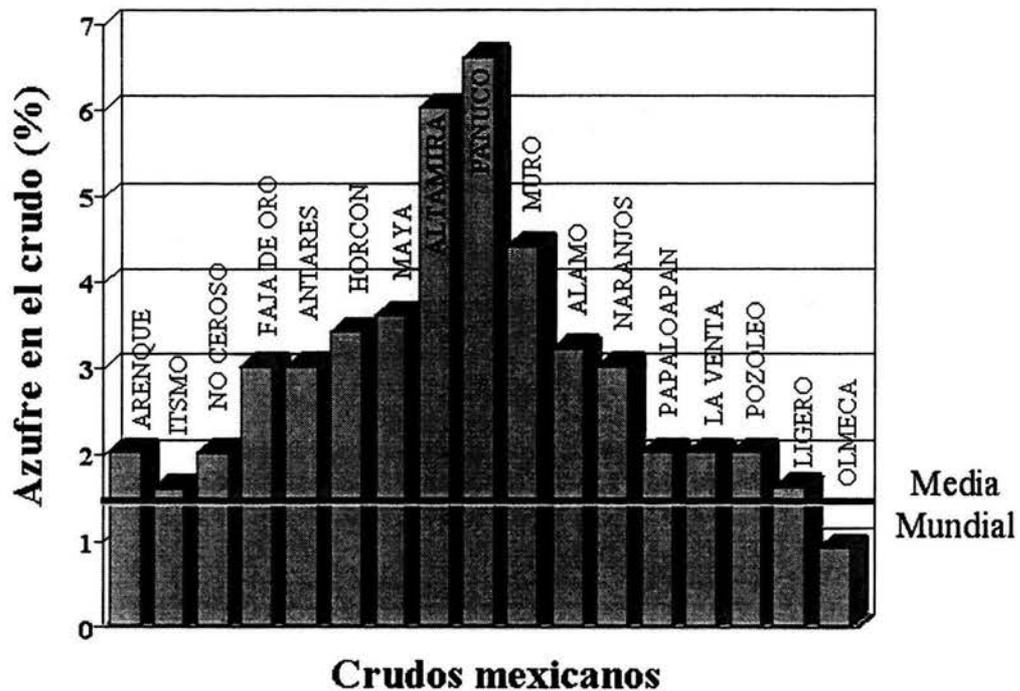


Figura 1.1.1. Contenido de azufre de los crudos mexicanos.

Fuente: Instituto Mexicano del Petróleo.

Para fines comerciales y asegurar un mejor valor económico, se preparan mezclas de crudos con diferente contenido de azufre y densidad para ser vendidos nacional e internacionalmente [3]. Las tres mezclas típicas que se preparan para exportación se muestran en la Tabla 1.1.1.

Tabla 1.1.1. Mezclas mexicanas de crudo preparadas para exportación [3].

Mezcla	Densidad (Grados API*)	Contenido de azufre (% en peso)
Itsmo	33.6	1.3
Maya	22.0	3.3
Olmeca	39.3	0.8

* Grados API. Parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo que permite diferenciar la calidad de los crudos.

Durante la combustión del petróleo se generan gases que son liberados a la atmósfera y que se componen en gran parte de óxidos de azufre (SO_x) y óxidos de nitrógeno (NO_x). Los SO_x que son emitidos a la atmósfera han desestabilizado el equilibrio natural de la tierra con respecto al contenido de azufre. Hasta 1993, entraban aproximadamente 100 millones de toneladas de azufre por año en la atmósfera debido a actividades antropogénicas, principalmente como SO_2 derivado de la combustión de combustibles fósiles y carbón [4]. La cantidad de azufre adicionada por procesos biológicos era de 1 millón de toneladas por año [4]. Como se puede observar en la Figura 1.1.2, la cantidad de azufre liberada a la atmósfera debida a actividades antropogénicas ha aumentado considerablemente en los últimos años y ha superado los niveles naturales de azufre en la tierra.

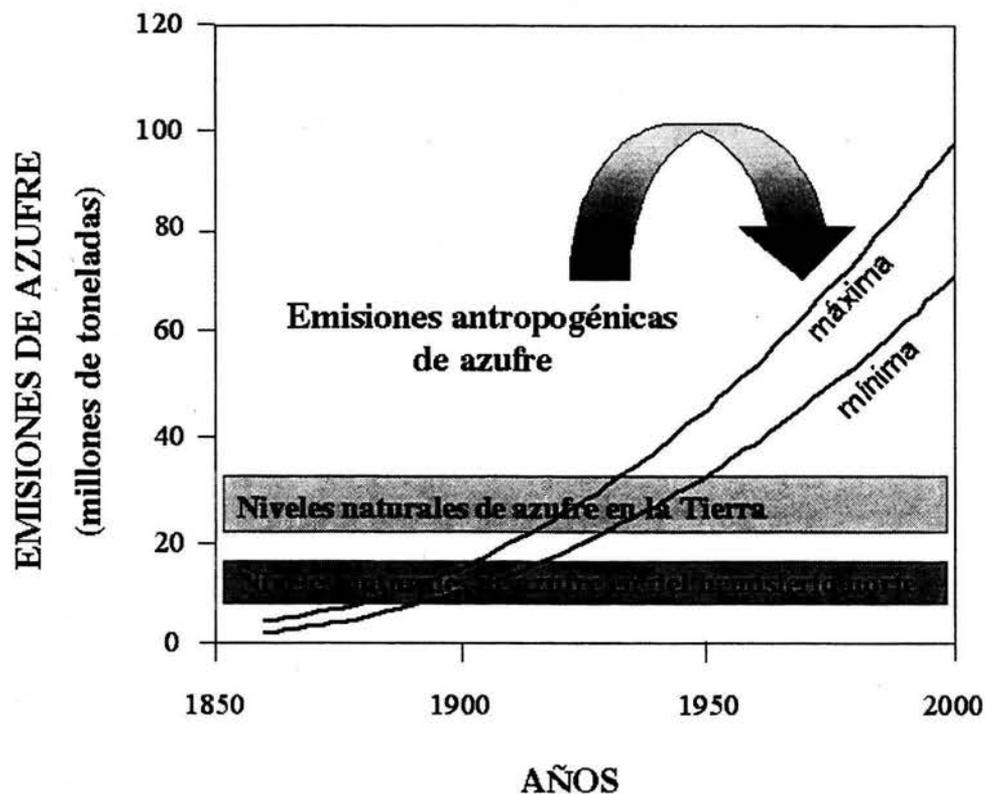


Figura 1.1.2. Emisiones antropogénicas de azufre durante los últimos años.

Los SO_x , además de los NO_x reaccionan en la atmósfera y forman ácido sulfúrico, ácido nítrico, sales de sulfato y amonio. Los ácidos mencionados, sumados al ácido clorhídrico provocan una precipitación ácida que se ha convertido en el mayor problema de contaminación en algunos lugares. A dicha precipitación ácida se le conoce de manera común como lluvia ácida y el término aplica para cualquier precipitación acuosa y ácida, incluyendo niebla, rocío o nieve. En un sentido más amplio, la deposición ácida se refiere a la deposición en la superficie de la tierra de ácidos acuosos, gases ácidos (como SO_2) y sales ácidas (tales como NH_4HSO_4) [4].

A pesar de que la lluvia ácida se debe principalmente a las actividades industriales y el consumo de combustibles fósiles, es posible encontrarla en lugares apartados de dichas fuentes. Esto se debe a la movilidad de las corrientes de aire, de tal manera que la lluvia ácida se vuelve un problema de contaminación global.

Existen amplias evidencias acerca de los efectos dañinos de la lluvia ácida [4], entre los que se pueden mencionar los siguientes:

- Fitotoxicidad directa sobre plantas por concentraciones excesivas de ácidos.
- Fitotoxicidad de gases que forman ácidos, particularmente SO_2 y NO_2 , que acompañan a la lluvia ácida.
- Fitotoxicidad indirecta, tal como la del Al^{3+} liberado en suelos acidificados.
- Daño de bosques.
- Efectos respiratorios nocivos sobre humanos y algunos animales.
- Acidificación del agua de los lagos con efectos tóxicos sobre la flora y fauna presentes.

- Corrosión de estructuras expuestas, relevadores eléctricos, equipo y materiales ornamentales. La piedra caliza (CaCO_3) es especialmente susceptible al daño por la lluvia ácida debido al efecto del ión hidrógeno, $2\text{H}^+ + \text{CaCO}_3(s) \rightarrow \text{Ca}^{2+} + \text{CO}_2(g) + \text{H}_2\text{O}$. Esto provoca serios daños a los monumentos y edificios históricos.

Dada la importancia del problema de contaminación representado por la lluvia ácida, la mayoría de los países han impuesto regulaciones para controlar la liberación de SO_x a la atmósfera. En Estados Unidos, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) establece un límite de 120 ppm en el 2004 en el contenido de azufre en gasolinas y de 30 ppm para el 2006, mientras que el límite para diesel será de 15 ppm en el 2007 [5]. En Europa han sido más exigentes y el límite de azufre establecido para diesel y gasolina será <10 ppm para el 2005 [5]. Mientras tanto en México, Petróleos Mexicanos tiene en fase de estudio un proyecto de reducción de azufre en tres etapas [6]. En la primera etapa se modificará la especificación vigente de 500 ppm por un máximo de 500 y un promedio de 300 ppm. La segunda etapa contempla modificar los valores antes citados por un máximo de 300 ppm y un promedio de 150 ppm. En la tercera etapa se cambiarán estos límites por un valor máximo de 30 y un promedio de 15 ppm.

La situación actual de México con respecto a la emisión de SO_x está definida por los siguientes puntos [6]:

- México produce 2% del total mundial de emisiones contaminantes.
- El diesel actual contiene 500 ppm de azufre.
- Hay refinerías que todavía proveen diesel con 600 ppm de azufre.

- El diesel que se consume en Guadalajara y Monterrey tiene entre 420 y 380 ppm de azufre.

Como ya se ha mencionado, la emisión de SO_x provoca problemas importantes de contaminación ambiental, de tal manera que es indispensable la remoción de azufre del petróleo para que al ser sometido al proceso de combustión se eviten los altos costos sobre el equilibrio ecológico que representa actualmente.

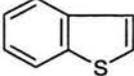
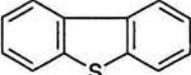
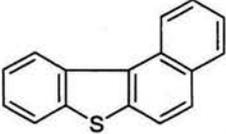
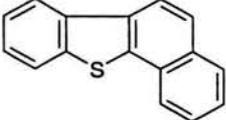
1.2 Desulfuración de los combustibles fósiles

El decremento en la disponibilidad de crudos con bajo contenido de azufre ha resultado en la necesidad de refinar crudos pesados y con alto contenido de azufre [7, 8]. Como se mencionó anteriormente, la legislación en diversos países impone reducciones anuales progresivas en los niveles de azufre que contienen los combustibles fósiles [5], lo cual compromete a la industria petrolera con la obtención de productos de alta calidad, es decir, con bajo contenido de azufre.

Durante la década de los años 1990s se gastaron decenas de millones de dólares en el desarrollo de nuevas tecnologías para mejorar la calidad de los combustibles fósiles [9]. Cada día, se extraen cerca de 80 millones de barriles de crudo en el mundo. Las estimaciones acerca de las reservas de combustibles fósiles indican que las reservas probadas de gas natural, crudos, bitumen y carbón son suficientes para seguir con esta velocidad de extracción por los siguientes 70 años [10].

En el petróleo, además del azufre elemental, se encuentran diversos compuestos orgánicos que contienen azufre, Tabla 1.2.1 [1]. El contenido de azufre en las fracciones del crudo generalmente se incrementa conforme aumenta su punto de ebullición [2], al tiempo que los compuestos presentes en dichas fracciones se distribuyen de la siguiente manera: saturados < aromáticos < resinas ≤ asfaltenos [11].

Tabla 1.2.1. Nomenclatura y tipo de compuestos organoazufrados presentes en el petróleo [1].

R_1SH	Tioles (Mercaptanos)
R_1SR_2	Sulfuros
	Sulfuros cíclicos
R_1SSR_2	Disulfuros
	Tiofenos
	Benzotiofenos
	Dibenzotiofenos
	Naftobenzotiofenos
	

Actualmente, las refinerías remueven el azufre orgánico de los combustibles derivados del crudo por medio del proceso de hidrodesulfuración, un proceso fisicoquímico que resulta ineficiente cuando se trata de remover compuestos azufrados heterocíclicos de fracciones

pesadas del crudo [8, 12, 13]. Se vuelve atractivo el desarrollo de procesos de desulfuración biológica debido a la alta especificidad por los sustratos y las condiciones relativamente suaves de los procesos biológicos, lo cual los hace más seguros y menos costosos energéticamente [8]. Los microorganismos han evolucionado diversas estrategias bioquímicas para tratar con el azufre, de tal manera que se puede hacer uso de estos mecanismos específicos para tratar problemas ambientales relacionados con el azufre.

1.2.1 Hidrodesulfuración

La hidrodesulfuración (HDS) es un proceso catalítico que convierte el azufre orgánico a sulfuro de hidrógeno gaseoso, $H_2S_{(g)}$, por la reacción de las fracciones del crudo con hidrógeno a presiones entre 150 y 3000 lb/pulg² y temperaturas entre 290°C y 455°C, dependiendo de la alimentación y el nivel de desulfuración requerido [14]. En este proceso se emplean catalizadores metálicos como tungsteno, níquel, cobalto, molibdeno y platino inmovilizados en diferentes soportes, siendo el más común la alúmina [1]. Los catalizadores se envenenan durante el proceso y deben ser regenerados, lo cual aumenta el costo total de desulfuración. Actualmente existen más de 35 unidades de HDS en el mundo con la capacidad de desulfurar 1.5 millones de barriles al día [15] y se trabaja en el desarrollo de mejores catalizadores para el proceso [16].

En las fracciones del petróleo con bajo punto de ebullición se encuentran compuestos azufrados tales como tioles, sulfuros y tiofenos, los cuales son removidos fácilmente por el proceso de HDS. En cambio, las fracciones medias a pesadas contienen cantidades considerables de compuestos heterocíclicos como benzotiofenos y difenzotiofenos que a su

vez presentan sustituciones adyacentes al átomo de azufre [17]. Estos compuestos son bastante resistentes a las técnicas normales de HDS [16], puesto que las sustituciones adyacentes al átomo de azufre provocan impedimentos estéricos que limitan el contacto de los compuestos con la superficie del catalizador [13].

El interés original en la HDS se estimuló por la obtención de hidrógeno a través de la refinación. Sin embargo, ahora la demanda de hidrógeno por la HDS y el hidrotratamiento es más de lo que puede ser generado por refinación. Debido a esto, la mayoría de las refinerías reciclan el hidrógeno formado de las reacciones laterales de deshidrogenación. Dado que el hidrógeno es un producto de alto costo de obtención, es muy importante llevar a cabo los procesos de HDS e hidrotratamiento a sus condiciones óptimas de reducción de costos [18].

1.2.2 Alternativas biológicas

Durante el proceso de búsqueda y desarrollo de aplicaciones relacionadas con los combustibles fósiles se han identificado microorganismos capaces de llevar a cabo procesos de desulfuración reductiva u oxidativa, eliminación de nitrógeno, remoción de metales, craqueo y remoción de ceras [19]. Los procesos biológicos representan alternativas para el procesamiento de los crudos con aplicación potencial en la industria petrolera.

Existen diversas estrategias para llevar a cabo un proceso de biodesulfuración (BDS), entre las que se pueden contar: la eliminación de azufre por procesos reductivos, la degradación microbiana no específica para azufre, la eliminación microbiana específica para azufre y la eliminación de azufre por procesos oxidativos.

Los procesos reductivos para la eliminación de azufre emplean bacterias anaeróbicas reductoras de sulfato. Estas bacterias obtienen energía al reducir el sulfato a H_2S . Por otro lado, la ausencia de oxígeno evita la oxidación inespecífica de hidrocarburos, lo cual representa una ventaja, pues se mantiene la capacidad energética de los combustibles. Aunque se ha reportado que estas bacterias son capaces de llevar a cabo un proceso de biodesulfuración de combustibles fósiles, no se ha observado una disminución significativa en el contenido total de azufre bajo condiciones anaeróbicas bien controladas [20].

Algunos microorganismos son capaces de degradar compuestos orgánicos que contienen azufre. Unos rompen la molécula para liberar el átomo de azufre [11]. Otro ejemplo, es la destrucción del anillo aromático del dibenzotiofeno por oxidación y la formación eventual de compuestos organoazufrados solubles en agua [21]. Con este proceso se pierde una cantidad importante de hidrocarburos por solubilización en la fase acuosa. Los procesos degradativos de desulfuración microbiana no son rentables comercialmente debido a la pérdida significativa de carbono, lo que reduce el valor energético de los combustibles fósiles [20].

Otro tipo de microorganismos remueve específicamente el átomo de azufre sin dañar la parte hidrocarbonada del compuesto. De este tipo de microorganismos, el más estudiado ha sido *Rhodococcus erythropolis* cepa IGTS8, patentado por el Institute of Gas Technology, que a su vez autorizó a Energy Biosystems Corporation en 1991 para desarrollarlo con fines comerciales [20]. Esta bacteria emplea tres enzimas para descomponer el dibenzotiofeno (DBT) en 2-hidroxibifenilo (2HBF) y sulfato (Figura 1.2.2.1).

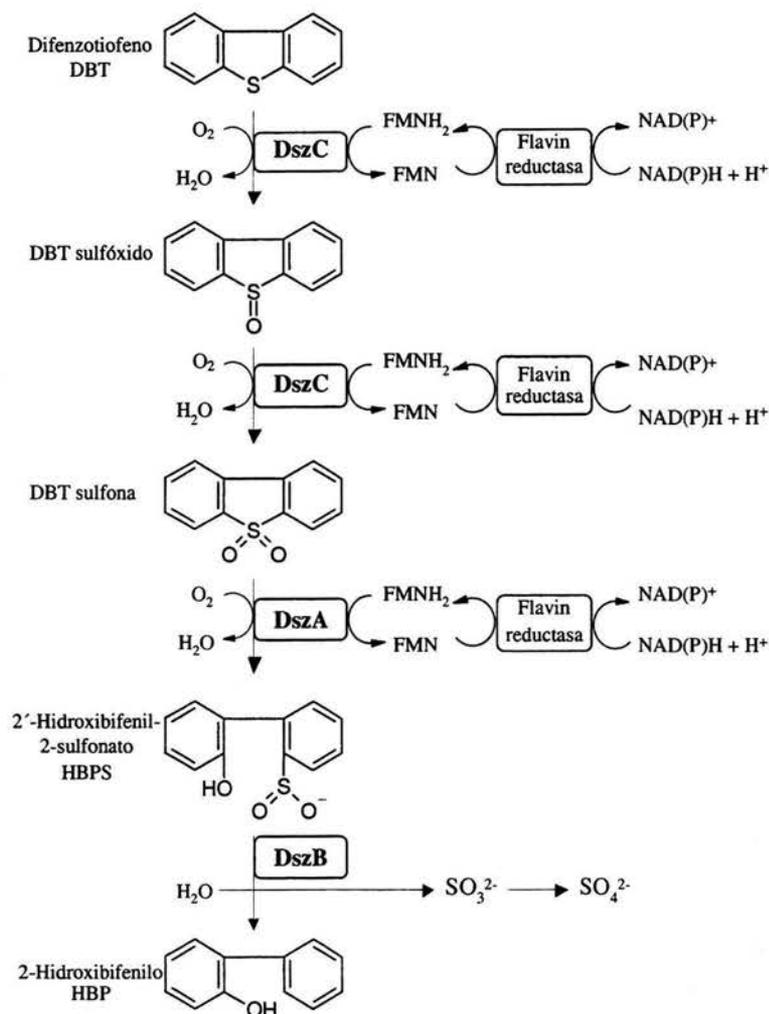


Figura 1.2.2.1. Vía de desulfuración del dibenzotiofeno por *Rhodococcus erythropolis*.

La primera de estas enzimas es una monooxigenasa (DszC) dependiente de flavinmononucleótido reducido (FMNH_2) que cataliza consecutivamente la oxidación del DBT al sulfóxido y después a la sulfona. La segunda es otra monooxigenasa (DszA) que cataliza la conversión de la sulfona a 2'-hidroxibifenil-2-sulfonato. La tercera es una sulfinasa (DszB) que cataliza el paso final para producir 2-hidroxibifenilo y sulfito, el cual se oxida espontáneamente y produce sulfato [20]. Esta última reacción es el paso limitante del proceso. La ventaja de este proceso es que no mineraliza el hidrocarburo, dado que la bacteria lo

emplea como fuente de azufre pero no de carbono. El 2-HBF es soluble en el petróleo, de tal manera que no se pierde poder energético y el azufre liberado es asimilado a través de otras rutas metabólicas de la bacteria [20].

Para que los compuestos azufrados interactúen con las células se requiere la dispersión del combustible en una fase acuosa. Un factor limitante en este tipo de procesos es la transferencia de los compuestos azufrados desde la fase orgánica a la fase acuosa y después al interior de la célula [22]. El uso de solventes orgánicos permite aumentar la cantidad de combustible soluble en el medio de reacción, pero su presencia resulta tóxica para las bacterias. *R. erythropolis* se encuentra entre las bacterias menos tolerantes a solventes orgánicos y su eficiencia para realizar el proceso de desulfuración se ha mejorado empleando diversas estrategias. Estas incluyen la optimización del medio de cultivo, la clonación del operon *dsz* en el cromosoma de diferentes cepas de *Pseudomonas* que presentan mayor tolerancia a solventes orgánicos [8], la duplicación de genes, la alteración de promotores y la eliminación de la enzima *DszB* que cataliza el paso limitante del proceso. Entre 1990 y 1998 la actividad de este biocatalizador recombinante ha aumentado 200 veces [20].

Otra opción para el proceso de BDS es la oxidación de compuestos azufrados para formar sulfóxidos y sulfonas, que pueden ser removidos por adsorción o extracción con solventes [15]. Las monooxigenasas de *R. erythropolis* responsables de la oxidación del DBT se purificaron y caracterizaron recientemente [23]. La monooxigenasa *DszC*, que cataliza la oxidación secuencial del DBT hasta la sulfona, también es capaz de catalizar la oxidación de DBT's sustituidos. Como ya se ha mencionado, estos compuestos son más difíciles de remover mediante el proceso de HDS [16].

El empleo de enzimas puras para llevar a cabo la oxidación de los compuestos azufrados presenta ciertas ventajas sobre el uso de microorganismos. Primera, no es necesario trabajar con células completas. Esto elimina la necesidad de emplear una fuente de carbono y otros nutrientes para mantener a la maquinaria celular. Segunda, es posible que la concentración de los sustratos y productos alcance niveles que resultarían tóxicos para las células. Tercera, los problemas de transferencia de masa pueden disminuirse inmovilizando la enzima en un soporte adecuado. Por último, es posible mejorar las enzimas mediante modificación química y manipulación genética para aumentar el número de compuestos que oxidan, la termoestabilidad y la estabilidad en solventes orgánicos [8, 20, 24, 25].

En contraste con la monooxigenasa DszC de *Rhodococcus*, la cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* no requiere de cofactores costosos que deban regenerarse. Esta enzima cataliza la oxidación de varios compuestos azufrados, incluyendo sulfuros alquilados y sulfuros aromáticos [26-28]. Estos estudios se realizaron en el contexto de transformaciones selectivas con aplicación en la síntesis orgánica. Recientemente, se demostró la capacidad de la cloroperoxidasa para catalizar la oxidación de los compuestos azufrados presentes en el diesel primario [29, 30]. Este resultado define a la cloroperoxidasa como una enzima con un alto potencial de aplicación en la industria petrolera. Sin embargo, la cloroperoxidasa presenta bajas actividades en sistemas no acuosos y baja estabilidad a las condiciones de reacción, como son temperaturas mayores a 80°C y valores extremos de pH. La justificación para este trabajo es el desarrollo de un biocatalizador que sea estable y activo en medios con altas concentraciones solventes orgánicos para que pueda ser aplicado a la industria petrolera.

1.3 Cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*

La cloroperoxidasa (E. C. 1.11.1.10, cloruro:hidrógeno-peróxido oxidoreductasa) es una enzima glicosilada que contiene de 25 a 30% de carbohidratos [31]. El patrón de glicosilación depende de la cepa y del medio de cultivo. La enzima que se utilizó para llevar a cabo el presente estudio contiene principalmente manosa y glucosa y en menor proporción glucosamina, xilosa y galactosa [32, 33]. La cloroperoxidasa (Figura 1.3.1) es una proteína monomérica con un peso molecular de 42 kDa, contiene una ferriprotoporfirina IX como grupo prostético y un alto contenido de residuos de aminoácidos tales como ácido glutámico, ácido aspártico, serina y prolina que representan el 45% del total de aminoácidos [31].

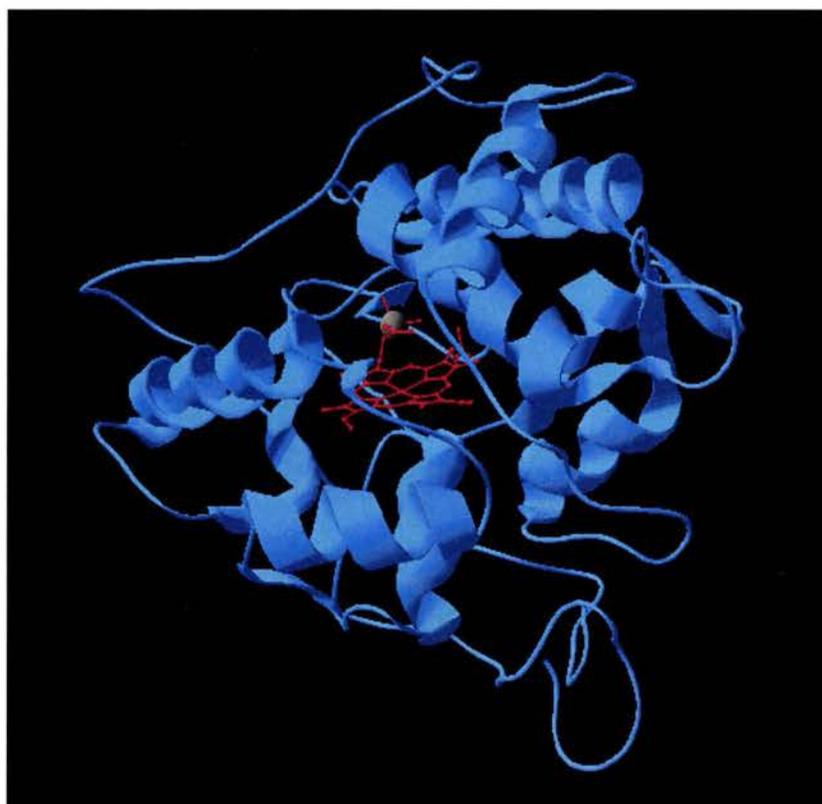


Figura 1.3.1. Estructura de la cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*.
Fuente: Protein Data Bank, 1-CPO.

1.3.1 Origen

La cloroperoxidasa es una enzima extracelular producida por el hongo filamentoso *Caldariomyces fumago*. Fue aislada y caracterizada en los años 1960's por el grupo de Lowell P. Hager. Hager tenía interés en el estudio de los mecanismos biosintéticos involucrados en la incorporación de halógenos a compuestos orgánicos [34]. El hongo *Caldariomyces fumago* se eligió como organismo de estudio debido al reporte previo de la detección de un metabolito clorado llamado caldariomicina en el medio de cultivo de este hongo [35]. La caldariomicina (1,1-dicloro-2,5-dihidroxiciclopentano) presenta actividad antimicrobiana. El trabajo del grupo de Hager llevó primero a la identificación y caracterización parcial de la enzima encargada de la reacción de halogenación [36] y dada su función como peroxidasa, aunada a su habilidad para catalizar la formación de un enlace carbono-halógeno, se denominó cloroperoxidasa. Posteriormente tuvo lugar su purificación y caracterización [31, 37].

1.3.2 Actividades catalíticas

La cloroperoxidasa participa *in vivo* en la ruta de biosíntesis del antibiótico caldariomicina, catalizando la reacción de halogenación de dicho metabolito. *In vitro*, la cloroperoxidasa presenta actividad halogenasa, peroxidasa, catalasa y peroxigenasa [38] (Ver Tabla 1.3.2.1).

Halogenación oxidativa. La cloroperoxidasa puede catalizar la formación peroxidativa de un enlace carbono-halógeno con una variedad de nucleófilos en presencia de iones haluro (Cl^- , Br^- , ó I^- , pero no F^-). Generalmente, esta reacción no es selectiva. La cloroperoxidasa presenta la actividad catalítica más alta de todas las haloperoxidasas [39].

Deshidrogenación oxidativa. Esta reacción es típica de las peroxidasa. Involucra la transferencia de electrones con la consecuente formación de radicales. Los productos obtenidos son el resultado del acoplamiento de los radicales formados. La cloroperoxidasa es capaz de catalizar la N-desmetilación de una serie de N-metil arilaminas [40].

Descomposición de peróxido. La descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno es catalizada por varias peroxidasa. A diferencia de la catalasa, la cloroperoxidasa puede descomponer alquil hidroperóxidos y perácidos para formar oxígeno molecular [38].

Transferencia de oxígeno. La cloroperoxidasa cataliza una serie de reacciones que involucran la inserción de oxígeno, que se pueden clasificar como: oxidación de heteroátomos (S- y N-oxidación), epoxidación y oxidación de enlaces C-H. Además puede catalizar la sulfoxidación enantioselectiva de sulfuros [27, 28, 41], la oxidación de N-arilaminas a sus correspondientes compuestos nitrosos [42, 43], la epoxidación enantioselectiva de olefinas [44-47], la hidroxilación bencílica y alílica de hidrocarburos [48, 49], la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos [38, 50] y la oxidación de indoles a oxindoles [51].

Tabla 1.3.2.1. Actividades catalíticas de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*.

Actividad enzimática	Reacción que cataliza	Sustratos
Halogenación oxidativa (halogenasa)	$RH + H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow RCl + 2H_2O$	Dicetonas cíclicas, fenoles, ésteres fenólicos
Deshidrogenación oxidativa (peroxidasa)	$2RH + H_2O_2 \rightarrow 2R^* + H_2O$	Metoxifenoles, anilinas, indol
Descomposición de peróxido (catalasa)	$2ROOH \rightarrow O_2 + 2ROH$	Peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos
Transferencia de oxígeno (peroxigenasa)	$R + H_2O_2 \rightarrow RO + H_2O$	Tioanisoles, alquenos, bencilos

1.3.3 Ciclo catalítico

De acuerdo con la revisión y análisis realizados anteriormente acerca de la evidencia experimental existente [52], parece ser que la enzima sigue el ciclo catalítico que se muestra en la Figura 1.3.3.1. 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 del enlace oxígeno-oxígeno del peróxido requiere de dos electrones, por lo que debe ocurrir un rearrreglo electrónico intramolecular. En la cloroperoxidasa, así como en la mayoría de las peroxidasas, 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 [53].

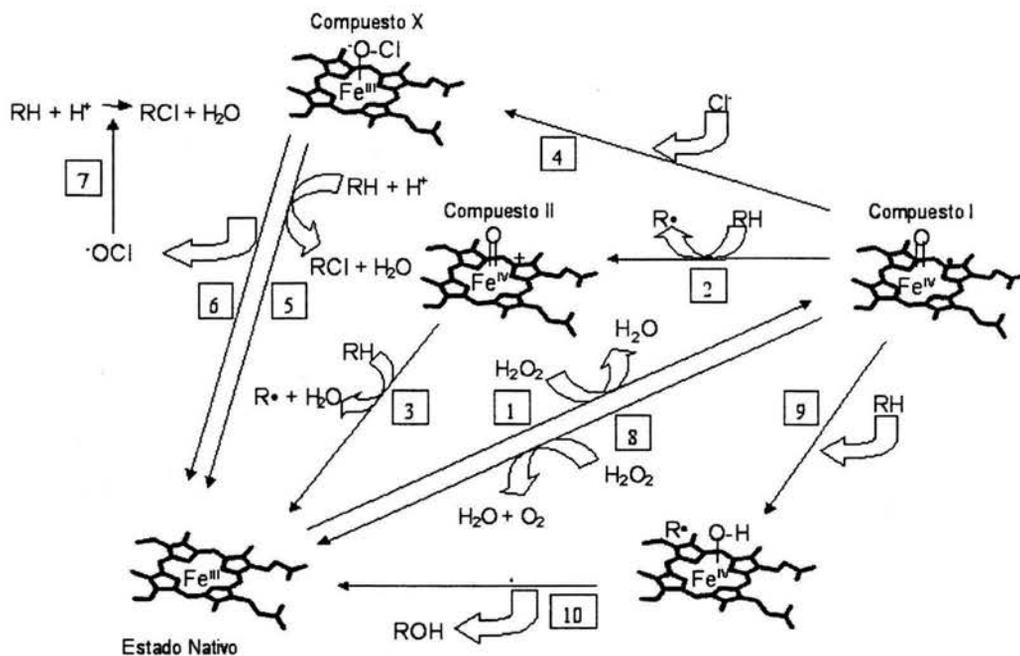


Figura 1.3.3.1. Ciclo catalítico de la cloroperoxidasa.

El Compuesto I puede seguir diversos caminos. Primero, puede sufrir la reducción de un electrón para formar el Compuesto II mediante la oxidación de una molécula de algún 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 peroxidasas 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 peroxidasas que utilizan peróxido para catalizar la deshidrogenación de dos moléculas de sustrato formando radicales libres, los cuales generalmente reaccionan entre sí formando un polímero.

Segundo, puede ocurrir que el Compuesto I reaccione en presencia de iones haluro para formar un intermediario halogenante (ruta 4). 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 6 y 7. Esto se debe principalmente a que no se observa enantioselectividad en los productos y éstos son idénticos a los que se obtienen cuando la reacción se lleva a cabo químicamente adicionando HOCl [54]. Recientemente se detectó un intermediario enzimático durante la halogenación (Compuesto X) [55]; aunque esta evidencia fortalece un mecanismo de reacción como el de la ruta 5, todavía quedan dudas por resolver y no existe un consenso en la comunidad científica al respecto.

Tercero, el Compuesto I puede reaccionar con una segunda molécula de peróxido para formar oxígeno molecular y agua o el alcohol correspondiente en caso de reaccionar con un peróxido orgánico (ruta 8). Las rutas 1 y 8 corresponden a la actividad catalasa. Las

peroxidasas comunes catalizan esta reacción con un 0.01% de la reactividad de una catalasa clásica. Aunque la cloroperoxidasa no es tan eficiente como una catalasa típica, presenta un 20% de actividad catalasa en presencia de cloruro y peróxido de hidrógeno [38].

Por último, puede ser que el Compuesto I reaccione con una molécula de sustrato unida en el sitio activo, cerca del hierro del grupo hemo. En este caso el átomo de oxígeno se transfiere directamente al sustrato (rutas 9 y 10).

1.3.4 Comparación con otras peroxidasas

La cloroperoxidasa presenta un plegamiento único que no se puede sobreponer con el de otras peroxidasas o con el citocromo P450, aunque comparte ciertas características estructurales importantes con ambos tipos de enzimas [56]. En las peroxidasas, el hierro del grupo hemo se encuentra pentacoordinado con los cuatro nitrógenos pirrólicos y con el nitrógeno de una histidina. En el caso de la cloroperoxidasa, este residuo es una cisteína [57]. Es posible que este ligando inusual estabilice al Compuesto I y sea el responsable del gran poder oxidativo de la enzima [56], aunque esta hipótesis no ha sido probada. Además de la diferencia en el ligando del hierro, la cloroperoxidasa presenta otras diferencias estructurales con las peroxidasas y similitudes con el citocromo P450, lo que la define como un híbrido estructural de ambas enzimas.

La mayor desventaja de todas las peroxidasas hemo-dependientes es su baja estabilidad operacional debida a su inactivación en presencia de H_2O_2 . La cloroperoxidasa presenta un mayor tiempo de vida media en presencia de H_2O_2 que la mayoría de las peroxidasas, lo que tal vez se relacione con el hecho de que su actividad catalasa es mayor al resto de ellas [38].

Con todo y eso, dicha estabilidad no es suficiente para la aplicación de la enzima a nivel industrial. La cloroperoxidasa es la única de las peroxidases que oxida enlaces C-H. Cataliza la hidroxilación bencílica y alílica de hidrocarburos [48, 49], la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos [38, 50] y la oxidación de indoles a oxindoles [51]. En comparación con otras peroxidases, la cloroperoxidasa cataliza con mayor eficiencia y enantioselectividad la oxidación de sulfuros [58], como se muestra en la Tabla 1.3.4.1.

Tabla 1.3.4.1. Sulfoxidación del metil fenil sulfuro por diferentes peroxidases [58].

Enzima	Tiempo de reacción (min)	Rendimiento (%)	ee ^a (%)	Número de recambio ^b
Cloroperoxidasa	60	100	98 (R)	63000
Peroxidasa de rábano blanco	60	95	46 (S)	29
Lignino peroxidasa	105	50	52 (R)	57
Citocromo c peroxidasa	No reportado	No reportado	2 (S)	<300
Microperoxidasa	45	45	3 (S)	3

a, exceso enantiomérico; b, moles de producto/mol de enzima.

1.3.5 Desulfuración enzimática y transformación de asfaltenos

En esta sección se describen los procesos de desulfuración enzimática del diesel primario [29] y la transformación de asfaltenos [59] realizados por la cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*. Ambos son antecedentes importantes que definen a la cloroperoxidasa como una enzima con aplicación potencial en la industria petrolera.

Existen diferentes hemoproteínas y hemoenzimas como la lignino peroxidasa del hongo *Phanerochaete chrysosporium* [60-62], el citocromo P450 [63], la hemoglobina [64, 65], el citocromo c [64, 66, 67] y la cloroperoxidasa [27, 30] con la capacidad para oxidar *in*

vitro tiofenos, dibenzotiofeno y otros, que son del tipo de compuestos azufrados presentes en los crudos. De todas ellas, la cloroperoxidasa es la única que ha demostrado su capacidad para catalizar la oxidación de los compuestos azufrados presentes en diesel primario [29].

En la Figura 1.3.5.1 se muestran los cromatogramas resultantes de una corrida en el cromatógrafo de gases empleando dos detectores distintos: uno específico para compuestos azufrados y otro general donde se detectaron todos los compuestos carbonados presentes en el diesel.

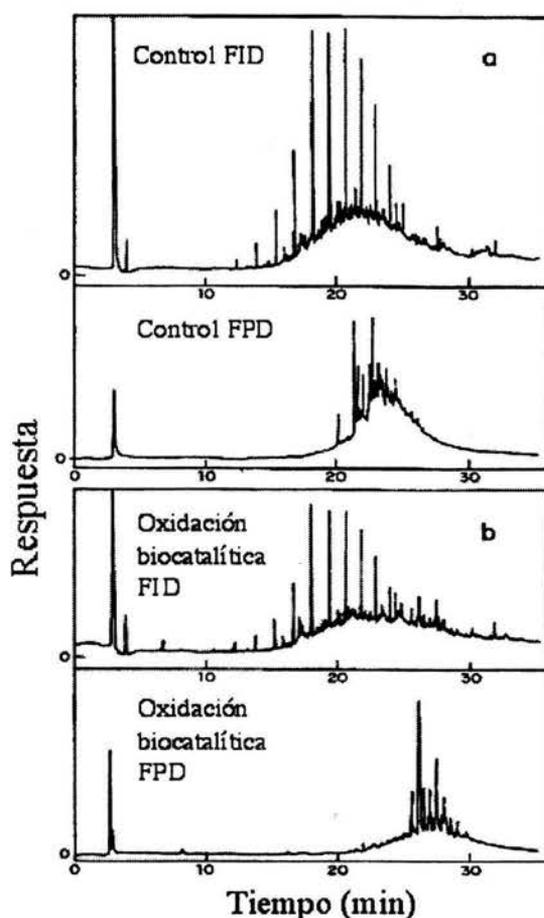


Figura 1.3.5.1. Cromatogramas del diesel primario, (a) antes y (b) después del tratamiento enzimático con cloroperoxidasa [29].
FID, detector general. FPD, detector de azufre.

En el panel A se observan los perfiles tanto de los compuestos azufrados como la totalidad de éstos antes de ser sometidos al tratamiento enzimático con la cloroperoxidasa. En el panel B se puede observar que después del tratamiento enzimático el perfil de la totalidad de los compuestos no cambió significativamente mientras que existió un cambio notorio en el perfil de los compuestos azufrados. La oxidación enzimática de una serie de compuestos organoazufrados puros permitió determinar que los productos obtenidos son sulfóxidos, los cuales sufren una oxidación espontánea para dar lugar a las sulfonas correspondientes. Un espectro IR del diesel oxidado presentó dos fuertes bandas a 1385 y 1464 cm^{-1} , las cuales indican la presencia de sulfóxidos y sulfonas.

Conociendo la naturaleza de los productos obtenidos y observando cómo la oxidación enzimática cambió considerablemente el perfil de los compuestos organoazufrados, se llevó a cabo la microdestilación tanto del diesel tratado enzimáticamente como del que no lo fue a una temperatura 57°C menor que el proceso tomado como control. Como resultado se logró una disminución del 83% del azufre en el diesel (Tabla 1.3.5.1).

Tabla 1.3.5.1. Oxidación enzimática y destilación de diesel primario.

	Control	Destilación	Oxidación enzimática + destilación
PFD^a	382°C	325°C	325°C
% Hidrocarburos^b	100	83	71
% Sulfuros^c	1.60	1.27	0.27

a, punto final de destilación; b, respuesta FID; c, respuesta FPD.

Con base en estos resultados, se propuso un proceso de biodesulfuración que consiste en la oxidación enzimática del diesel primario seguido de un proceso de destilación para remover los compuestos oxidados. Este proceso fue patentado [68] y se presenta como un

método alternativo para llevar a cabo la desulfuración de combustibles fósiles. La oxidación enzimática se realizó en un medio de reacción que contenía 20% de solvente orgánico, que fue necesario para solubilizar el diesel. De tal manera que el reto es mejorar las características de la cloroperoxidasa para aumentar su actividad en un mayor contenido de solvente orgánico.

Como ya se ha mencionado, el petróleo es una mezcla compleja que contiene un gran número de compuestos orgánicos. Entre éstos se encuentran las petroporfirinas, las cuales con frecuencia se acomplejan con metales tales como vanadio, níquel, hierro y cobre [1]. Las petroporfirinas, cuya estructura básica es la porfina (Figura 1.3.5.2), se asocian normalmente con la fracción insoluble en pentano del petróleo conocida como asfaltenos, la cual consiste en una diversidad de compuestos de alto peso molecular que contienen constituyentes aromáticos, alifáticos, heteroátomos y metales [1].



Figura 1.3.5.2. Porfina.

Una serie de porfirinas puras y una fracción de asfaltenos de bajo peso molecular rica en petroporfirinas del crudo Cold Lake se sometieron a un tratamiento enzimático con la cloroperoxidasa [59]. Las reacciones se realizaron en un sistema ternario tolueno, isopropanol, amortiguador fosfatos pH 3. Como se observa en la Figura 1.3.5.3, después del proceso enzimático disminuyó la absorbancia de la banda Soret de la fracción de asfaltenos. Dicha disminución fue totalmente dependiente de la presencia de peróxido de hidrógeno y

cloruro. Lo mismo ocurrió con el tratamiento enzimático de las porfirinas puras níquel octaetilporfina (NiOEP) y vanadio octaetilporfina (VaOEP).

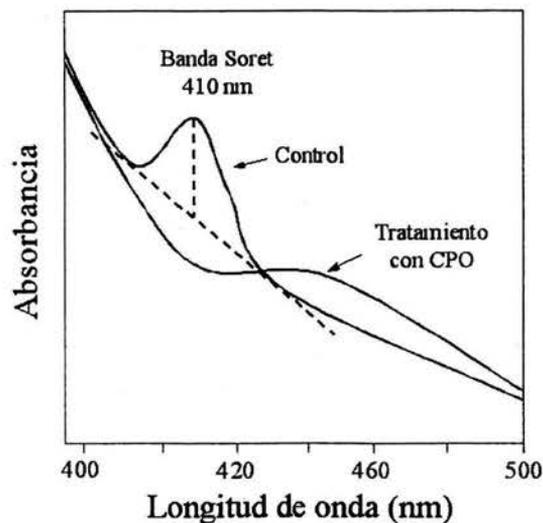


Figura 1.3.5.3. Espectro UV-visible de una fracción de asfaltenos rica en petroporfirinas con y sin cloroperoxidasa y H_2O_2 [59].

Un análisis del contenido de metales, tanto de la fase orgánica como de la fase acuosa de la reacción, mostró la remoción del 93% del níquel de NiOEP, 53% del vanadio de VaOEP y 20% del total de níquel y vanadio de la fracción de asfaltenos. En este trabajo se concluyó que la cloroperoxidasa es capaz de remover metales de porfirinas puras y de una fracción de asfaltenos rica en petroporfirinas.

Para que la cloroperoxidasa pueda ser aplicada en la industria petrolera, debe ser resistente a condiciones extremas de operación tales como: altas temperaturas, pH extremos, alta presión y salinidad, además de ser tolerante a cantidades importantes de solventes orgánicos. La modificación química puede ser una alternativa para obtener un biocatalizador activo en altas concentraciones de solvente orgánico que permita el escalamiento de un proceso enzimático para su aplicación en la industria petrolera.

1.4 Biocatálisis en solventes orgánicos

En los últimos años, la biocatálisis en medios no acuosos ha tenido un gran auge debido principalmente a que el agua no es el mejor de los solventes para un gran número de aplicaciones en la industria química. Muchos compuestos orgánicos de interés comercial son poco solubles o insolubles y a menudo inestables en soluciones acuosas, de tal forma que el empleo de solventes orgánicos en la catálisis enzimática ofrece un amplio espectro de posibilidades a explorar.

Lejos de la creencia de que las reacciones biológicas sólo podían ocurrir en medio acuoso, existe actividad enzimática en medios con bajo contenido de agua. Se ha encontrado que las enzimas adquieren termoestabilidad y mantienen sus conformaciones activas en solventes orgánicos, en contradicho con la certeza que se tenía de que las enzimas se desnaturalizarían en la presencia de éstos. El uso de enzimas en medios no acuosos no se restringe a aplicaciones sintéticas, puesto que muchas enzimas o complejos multienzimáticos incluyendo lipasas, esterasas, deshidrogenasas y otras responsables del metabolismo de compuestos xenobióticos (como el citocromo P-450) funcionan en ambientes hidrofóbicos, usualmente en presencia o inmovilizadas en una membrana [69, 70]. La concentración de agua en la cercanía de estas enzimas es significativamente menor que la concentración de 55 M en soluciones acuosas [71]. Se ha determinado que la presencia de una capa delgada de agua alrededor de una enzima es suficiente para preservar su estructura tridimensional en una forma catalíticamente activa. Dicha cantidad de agua podría ser cercana a 1,000 moléculas por molécula de enzima, aproximadamente una monocapa de agua en la superficie [72].

Desde el punto de vista biotecnológico, existen numerosas ventajas para el empleo de solventes orgánicos en la catálisis enzimática [71, 73-76], entre las cuales se pueden mencionar las siguientes:

- Alta solubilidad de compuestos no polares.
- Habilidad para que ocurran reacciones hidrolíticas reversas.
- Posibilidad de disminuir reacciones laterales indeseables, así como la inhibición por producto o sustrato.
- Facilidad relativa para recuperar el producto y el biocatalizador.
- Posibilidad de cambiar el equilibrio termodinámico de muchas reacciones enzimáticas para favorecer la formación del producto deseado.
- Eliminación de la contaminación bacteriana de los equipos y sistemas.
- Ocurrencia de reacciones que serían imposibles cinética o termodinámicamente en agua.
- Las enzimas presentan una mayor termoestabilidad en solventes orgánicos.
- Mayor quimio-, regio-, enantio- y estereo- selectividad que en agua.

A pesar de todas las ventajas presentadas por el empleo de las enzimas en solventes orgánicos, existe una pérdida importante de la actividad catalítica con respecto a la actividad en medio acuoso [77]. Esto puede deberse a diversas razones, incluyendo la pérdida de actividad inducida por liofilización [78] y/o cambios estructurales provocados por el solvente en el sitio activo [79], la deshidratación de regiones críticas de las enzimas [80], la estabilización del estado basal de sustratos hidrofóbicos [81] y la pobre compatibilidad entre el solvente y el estado de transición [82]. Se han empleado muchas estrategias para incrementar la actividad catalítica de las enzimas en solventes orgánicos anhidros, incluyendo la ingeniería

de proteínas [83, 84], la impresión molecular [85], la amortiguación orgánica [86], la adición de cosolventes desnaturizantes al solvente orgánico para incrementar la flexibilidad de las enzimas [87], la incorporación de carbohidratos, polímeros y sales inorgánicas durante el proceso de liofilización [88, 89] y el uso de concentraciones desnaturizantes de urea [90].

Tabla 1.4.1. Causas del decremento de la actividad de las enzimas en solventes orgánicos comparada con la actividad en agua y alternativas de solución [77].

Causa	Comentarios	Soluciones
Limitaciones difusionales	No es tan probable.	Agitación vigorosa, empleo de partículas pequeñas.
Bloqueo del sitio activo	Responsable de no más de unos cuantos ordenes de magnitud en la reducción de la actividad enzimática.	Si ocurre, usar partículas enzimáticas cristalinas más que amorfas.
Cambios conformacionales	Ocurren durante la liofilización u otros métodos de deshidratación. Esto se evita empleando CLEC's*. Normalmente no ocurre por contacto con el solvente.	Usar lioprotectores, alternativamente, preparar complejos enzima-amfifílicos solubles en solventes orgánicos, uso de enzimas CLEC's.
Energética desfavorable de la solvatación del sustrato	Severa con sustratos hidrofóbicos. Puede ser responsable por lo menos de una reducción de 100 veces de la actividad.	Seleccionar el solvente que no promueva las interacciones solvente-sustrato.
Desestabilización del estado de transición	Probablemente puede ser aumentada cuando el estado de transición está expuesto parcialmente al solvente.	Seleccionar el solvente esperando un rendimiento favorable de interacciones con el estado de transición.
Reducción de la movilidad conformacional	Severo en solventes anhidros hidrofílicos debido a la remoción de agua esencial unida a la enzima. Puede ser responsable de al menos una reducción de 100 veces de la actividad.	Optimizar la actividad de agua (a_w), hidratar el solvente, usar solventes hidrofóbicos, usar cosolventes desnaturizantes y que imiten las propiedades del agua.
Condición subóptima de pH	Puede ser responsable de al menos una disminución de 100 veces de la actividad.	Deshidratar la enzima en una solución acuosa con el pH óptimo para la actividad, usar amortiguadores para la fase orgánica.

* CLEC's (por sus siglas en inglés), cristales enzimáticos entrecruzados.

En la Tabla 1.4.1 se muestra una serie de posibles causas de la caída de actividad de las enzimas en solventes orgánicos y propuestas de solución para cada una de ellas [77]. Aunque es importante notar que para una aplicación específica, el punto medular es que la actividad enzimática sea suficientemente alta para el desarrollo de dicha aplicación y no cómo se compara con su actividad en agua [77].

Otro punto importante a discutir con respecto a la actividad de las enzimas en solventes orgánicos es el efecto del sustrato en el sistema de reacción. En sistemas acuosos la interacción entre el sitio activo de la enzima y el medio se favorece conforme se incrementa la hidrofobicidad del sustrato, siempre y cuando el ambiente protéico del sitio activo sea hidrofóbico. El resultado es una mayor afinidad de la enzima por el sustrato y por lo tanto, una mayor actividad catalítica [91-93]. Por otro lado, en la biocatálisis en solventes orgánicos ocurre lo contrario: el aumento de la hidrofobicidad del sustrato disminuye la interacción con el sitio activo de la enzima [94], de tal forma que la catálisis enzimática se ve limitada por la partición favorable hacia el solvente. Esto disminuye la afinidad por el sustrato y al mismo tiempo la actividad catalítica de las enzimas [81, 95].

El proceso de biocatálisis en solventes orgánicos depende del solvente, del sustrato y de la hidrofobicidad del sitio activo [95]. De tal manera que si aumenta la hidrofobicidad del sustrato, disminuye la eficiencia catalítica de la enzima en un solvente hidrofóbico (el sustrato se particiona favorablemente hacia el solvente). En cambio, si se trata de un solvente hidrofílico (como el agua, acetona, alcoholes, etc.), se favorece la partición del sustrato hacia el sitio activo de la enzima. Es posible emplear estrategias como la ingeniería de solventes [96], la ingeniería de proteínas [96] o la modificación química [24, 97] para favorecer la partición de sustratos muy hidrofóbicos hacia el sitio activo de las enzimas.

El conocimiento acerca de los fenómenos que ocurren en un proceso de catálisis enzimática en solventes orgánicos aumenta cada día y proporciona herramientas para elegir las mejores condiciones para una aplicación dada (por ejemplo, la elección del mejor solvente). Sin embargo, no existen a la fecha, reglas generales que garanticen el éxito de dicha elección, pero sin duda alguna, el estudio de este tipo de procesos permitirá tener cada vez mayor certeza sobre el comportamiento del sistema sustrato-enzima-solvente orgánico.

1.5 Modificación química

Inicialmente, las técnicas de modificación química de proteínas se emplearon en investigación debido a su utilidad en la caracterización de proteínas, principalmente en la identificación de estructura primaria. En los últimos años se han empleado con diferentes propósitos y se han obtenido resultados tales como el aumento en el número de sustratos que una enzima es capaz de oxidar [24], el aumento de la solubilidad de una enzima en solventes orgánicos [97] y la reducción de la inmunogenicidad y el aumento de la vida media de anticuerpos [98, 99].

1.5.1 Generalidades

La modificación química sitio-específica se define estrictamente como un proceso que rinde una proteína estequiométricamente alterada con la derivatización cuantitativa covalente de un único residuo de aminoácido sin la modificación de cualquier otro residuo de aminoácido o cambio conformacional [100]. Sin embargo, este objetivo raramente se logra debido a que existen diversos problemas que lo impiden. Primero, existe un número limitado

de reactivos específicos para un determinado grupo funcional. Segundo, incluso si un reactivo parece ser específico para un grupo funcional, la modificación de un solo residuo entre varios con el mismo grupo funcional es cierta cuando dicho residuo es el único reactivo. Finalmente, es poco probable que la modificación sitio-específica se logre sin ningún cambio conformacional.

El resultado de un proceso de modificación química es afectado por las condiciones de reacción tales como el pH, la temperatura, el tipo de solvente o amortiguador empleado, el grado de iluminación, entre otros [100]. El hecho de establecer la estequiometría no necesariamente significa que la modificación ocurre en un único residuo (único en términos de posición en una cadena peptídica lineal- no necesariamente único con respecto a reactividad). Esto es útil si hay un cambio en la actividad biológica (catálisis, unión a sustrato, unión de iones, etc.) que ocurre concomitantemente con la modificación química [100]. En conclusión, la modificación química de proteínas es, en general, un proceso inespecífico.

1.5.2 Pegilación

La pegilación es un procedimiento de creciente interés para aumentar el potencial terapéutico y biotecnológico de péptidos y proteínas. Cuando el PEG se une covalentemente a un polipéptido, cambian muchas de sus características, mientras que pueden mantenerse las principales funciones biológicas, tales como la actividad enzimática o el reconocimiento de un receptor [101]. Existen diversos factores que influyen en las propiedades de un polipéptido modificado con PEG como son: el número de cadenas de PEG unidas al péptido, el peso

molecular y la estructura de las cadenas de PEG, la ubicación de los sitios de pegilación en la cadena peptídica y la química empleada para unir el PEG al polipéptido [102].

Propiedades del PEG. Las cadenas de PEG con pesos moleculares menores de 1000 son líquidos incoloros y viscosos, los de pesos moleculares mayores son sólidos blancos y cerosos. El punto de fusión del sólido es proporcional al peso molecular, que se aproxima a una meseta a la temperatura de 67°C [103]. Para propósitos de modificación de péptidos y proteínas, el rango útil de pesos moleculares es de 2 a 20 kDa. Otras de sus propiedades se listan a continuación [103]:

- Soluble en agua, tolueno, diclorometano y muchos otros solventes orgánicos.
- Insoluble en éter etílico, hexano y etilenglicol.
- Insoluble en agua a elevadas temperaturas.
- Solubilidad y partición controladas haciendo derivados.
- Forma complejos con metales catiónicos.
- Alta movilidad; gran volumen de exclusión en agua.
- No tóxico; aprobado por la FDA para consumo humano.

Si se une covalentemente:

- Solubiliza otras moléculas.
- Mueve moléculas a través de membranas celulares.

Muchos péptidos retienen y en algunos casos mejoran su solubilidad en agua al ser conjugados con PEG, además de adquirir solubilidad en solventes orgánicos. Comparado con otros polímeros, el PEG tiene una baja polidispersión (M_w/M_n) en el rango de 1.01 para pesos

moleculares bajos (<5 kDa) a 1.1 para pesos moleculares altos (>50 kDa). Estudios acerca del PEG en solución muestran que éste une de 2 a 3 moléculas de agua por unidad de óxido de etileno. Debido a la alta flexibilidad de la cadena carbonada y la capacidad de enlazar agua, las moléculas de PEG actúan como si tuvieran 10 veces su peso molecular real [103].

Para acoplar una molécula de PEG a otra molécula cualquiera (por ejemplo: polipéptidos, polisacáridos, polinucleótidos), es necesario activarla preparando un derivado del PEG que tenga un grupo funcional en uno o ambos extremos. El grupo funcional se elige con base en los grupos funcionales de la molécula a la cual se desea acoplar el PEG. En el caso de proteínas, los aminoácidos reactivos incluyen lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, treonina, tirosina, carboxilo y amino terminales. En el caso de glicoproteínas se pueden modificar los grupos hidroxilo [103].

La pegilación de enzimas crece en importancia dadas las propiedades anfifílicas del PEG. La modificación de la peroxidasa de rábano blanco con PEG, mejoró su termoestabilidad y su resistencia a la desnaturalización por pHs extremos [104]. La pegilación de la lignino peroxidasa aumentó su capacidad para biodegradar pentaclorofenol en mezclas agua-solvente orgánico [105]. El citocromo c de corazón de caballo también fue modificado con PEG y se obtuvo un catalizador con mayor actividad catalítica y la capacidad de oxidar el doble de hidrocarburos poliaromáticos que la proteína nativa [24]. Además, el citocromo c modificado presentó mayor termoestabilidad, pues después de 7 horas de incubación a 80°C en presencia del sustrato, mantuvo el 100% de su actividad [25].

1.6 Plásticos biocatalíticos

Existen diversos métodos para la incorporación de una enzima dentro de una matriz de soporte, entre los que se incluyen atrapamiento, unión covalente y adsorción. En estos métodos se puede emplear una amplia variedad de materiales naturales y sintéticos como soporte. En su mayoría, las enzimas inmovilizadas tienen aplicación en medios acuosos y los métodos de inmovilización aprovechan la gran solubilidad de las enzimas en agua y la insolubilidad de los polímeros, ya sean naturales o sintéticos. Estos polímeros confieren a las enzimas inmovilizadas ciertas características como integridad mecánica, térmica y resistencia química, además de un adecuado grado de hidrofobicidad/hidrofilicidad [106].

Los problemas que se presentan durante el proceso de inmovilización de una enzima dentro de una matriz polimérica, se pueden reducir mediante la incorporación de la enzima durante el proceso de polimerización, si es que éste se lleva a cabo a través de la formación de radicales libres [106]. Casi todos los polímeros de vinilo, particularmente los que confieren un alto grado de resistencia mecánica son insolubles en agua, de tal modo que disminuyen la efectividad de la interacción entre la enzima y la matriz polimérica en crecimiento. Este problema podría ser superado, en principio, si la enzima fuese soluble en un solvente orgánico.

Se han desarrollado técnicas para incrementar la solubilidad de las enzimas en solventes orgánicos. Por ejemplo, la unión covalentemente de PEG a las enzimas, con lo que se han alcanzado solubilidades de 1 mg/ml [107]. Este enfoque se ha empleado para incorporar subtilisina y termolisina dentro de polímeros acrílicos para usarse tanto en medio acuoso como en medio orgánico. Otro enfoque ha sido la variación de las proporciones de solventes miscibles, de tal manera que la partición de la enzima en las dos fases permite

obtener catalizadores con diferentes propiedades. Las enzimas α -quimiotripsina y subtilisina han sido incorporadas en materiales como polimetil metacrilato, estireno, acetato de vinilo, entre otros. Estos catalizadores alcanzaron cargas de 50% en peso de proteína [106].

Un enfoque distinto para la obtención de plásticos catalíticos es la unión covalente de enzimas dentro de espumas de poliuretano. Este proceso fue desarrollado y patentado por Wood y colaboradores [108]. El método involucra la mezcla de un prepolímero de poliuretano con grupos isocianato (Hypol) y una solución de enzima. La reacción del prepolímero es acompañada por la reacción de los grupos isocianato con los grupos amino e hidroxilo de la enzima, que con esto se une a la matriz polimérica. El agua que se introduce con la solución de enzima reacciona con los grupos isocianato para formar CO_2 (Figura 1.6.1). Las propiedades físicas de la espuma de poliuretano pueden ser influenciadas por la adición de diferentes cantidades de aditivos, tales como iniciadores, surfactantes y agentes espumantes.

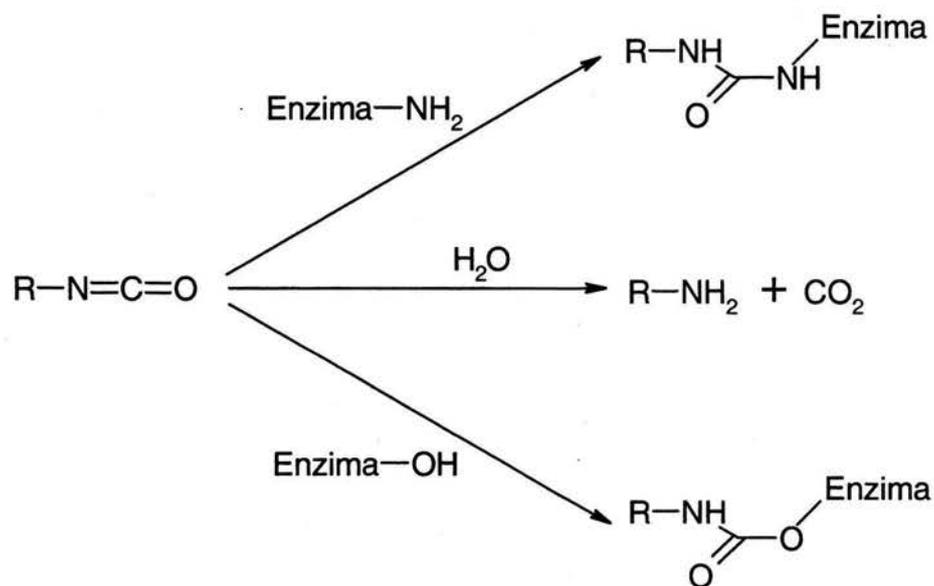


Figura 1.6.1 Unión covalente de las enzimas dentro de espumas de poliuretano.

El Hypol es un poliuretano hidrofílico desarrollado por W. R. Grace durante los años 1970s y 1980s [109]. El Hypol se distribuye como una resina de prepolímero que contiene moléculas de PEG, trimetilolpropano y un exceso de tolueno-2,6-diisocianato [110]. Este prepolímero forma una espuma al adicionar de 0.5 a 2.5 partes de agua [109].

El proceso de copolimerización con poliuretano se ha empleado en la inmovilización de células no viables de *Rhizopus oryzae* para la absorción de cobre [109], la inmovilización de bacterias para llevar a cabo transformaciones anaeróbicas [111] y para la inmovilización de enzimas como la fosfotriesterasa [112], la aminoacilasa de *Aspergillus melleus*, la fitasa de *Aspergillus ficuum*, la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, la peroxidasa de soya y la CPO [110, 113-115] con diferentes propósitos.

1.7 Inmovilización en celita

La celita es un derivado de tierra de diatomeas de plankton de agua dulce. Se ha empleado como filtro ayuda en muchas aplicaciones. En años recientes, la celita se ha empleado como soporte para la inmovilización de enzimas con aplicación en solventes orgánicos [116, 117]. Las enzimas inmovilizadas en celita muestran actividad en solventes anhidros, lo que es de potencial aplicación para solucionar el problema de accesibilidad de los sustratos muy hidrofóbicos al sitio activo de las enzimas.

El proceso de inmovilización de las enzimas ocurre por un fenómeno de adsorción física en la superficie de las partículas de celita. Se ha reportado que la superficie de la celita es hidrofóbica y por lo tanto puede favorecer la actividad enzimática en solventes orgánicos anhidros [118].

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Nuevas preparaciones de la cloroperoxidasa obtenidas por modificación química o inmovilización física permitirán obtener transformaciones enzimáticas más eficientes en sistemas conteniendo solvente orgánico y en condiciones de alta temperatura y amplio rango de pH.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la modificación química o inmovilización física sobre la actividad y estabilidad en solventes orgánicos de la cloroperoxidasa.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1 Modificar los grupos amino de la cloroperoxidasa.
Incrementar el número de aminos primarios de la cloroperoxidasa.
Efectuar una segunda modificación sobre los grupos amino con metoxipolietilenglicol.
- 2 Modificar los grupos carboxilo de la cloroperoxidasa.
Modificar los grupos carboxilo de la cloroperoxidasa con metoxipolietilenglicol amino.
- 3 Analizar el grado de modificación de la cloroperoxidasa.
- 4 Obtener el copolímero cloroperoxidasa-poliuretano.
- 5 Inmovilizar a la cloroperoxidasa en celita.
- 6 Determinar los perfiles de pH, actividad en solventes orgánicos y termoestabilidad de las diferentes preparaciones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y enzima

La cloroperoxidasa fue donada por el Dr. Michael Pickard de la Universidad de Alberta, Canada. Esta enzima proviene de la cepa CMI 89362 del hongo *Caldariomyces fumago* y tiene un R_z de 1.41. El coeficiente de Reinheitszahl (R_z) se define por el valor $A_{403\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ y se utiliza como un índice de pureza. El R_z para la cloroperoxidasa pura es de 1.44 [31].

Los compuestos monoclorodimedona, peróxido de hidrógeno, catecol, tiantreno, hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, 1,6-hexandiamina, brij-35, 2-mercaptoetanol, o-ftalaldehído, metoxipolietilenglicol y metoxipolietilenglicol amino fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH. El *tert*-butanol, los ácidos acético, bórico, cítrico, fosfórico, nítrico y sulfúrico y las sales fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, acetato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de cobalto, cloruro de sodio fueron adquiridos de J.T. BAKER. El acetonitrilo y el etanol grado HPLC fueron suministrados por Fisher Scientific, la Celita 500 por Fulka Chemika y el Hydropol 6B fue obtenido de Mace Company.

3.2 Equipo

Los ensayos en los cuales se midió absorbancia 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 equipado con un detector de arreglo de

diodos modelo LC-235C. La determinación de grupos amino por fluorescencia se realizó en un espectrofotómetro luminiscente de Perkin Elmer modelo LS-50B. Para los procesos de secado se empleó una liofilizadora LABCONCO modelo Freeze dryer 8. Las deshidrataciones a vacío se realizaron en un Savant de Eppendorf modelo Vacufuge.

3.3 Métodos

Modificación química de la cloroperoxidasa

Modificación química con metoxipolietilenglicol y metoxipolietilenglicol amino mediada por etilencarbodiimida. Las reacciones de modificación química de la CPO con PEG y PEGNH₂ se realizaron en volúmenes totales de 1 y 2 mL respectivamente, empleando diferentes excesos molares de ECD. Se prepararon soluciones de PEG, PEGNH₂ y ECD por separado. En un vial se mezclaron 100 nmoles de CPO (239 µL de solución 419 µM) y los volúmenes de solución de PEG ó PEGNH₂ correspondientes. La reacción se inició con la adición de la solución de ECD. Después de 3 horas de agitación suave, la mezcla de reacción se dializó exhaustivamente contra amortiguador fosfatos pH 5, 60 mM.

Modificación química con hexandiamina mediada por etilencarbodiimida. Las reacciones de modificación se realizaron en un volumen total de 1 mL, empleando diferentes excesos molares de HEX y ECD. Se prepararon soluciones de HEX y ECD por separado y se ajustó el pH de la solución de HEX a 5 con H₂SO₄ diluído. En un vial se mezclaron 42 nmoles de CPO (100 µL de solución 419 µM) y el volumen correspondiente de la solución de HEX. La reacción inició con la adición de la solución de ECD. Después de 3 horas en agitación suave, la mezcla se dializó exhaustivamente contra amortiguador fosfatos pH 5, 60 mM.

Determinación del grado de modificación química

Intercambio aniónico. Se pasaron las diferentes preparaciones de la CPO a través de una columna de intercambio aniónico Econo-Pac Q con dimensiones 50 μm , 4 x 1.5 cm de BIO-RAD empleando las siguientes condiciones: flujo de 1 mL/min y un programa de 2 min de fase de baja fuerza iónica (amortiguador fosfatos 10 mM, pH 6), 10 min de gradiente lineal hasta una concentración de 0.5 M de NaCl (solución en el mismo amortiguador) seguido de 5 min de fase con alta fuerza iónica (amortiguador fosfatos 10 mM, pH 6 con 0.5 M de NaCl) y detectando absorbancia a 280 nm.

Titulación de aminos libres con o-ftalaldehído. Para la determinación de grupos amino se utilizó OPA. El OPA reacciona con grupos amino primarios en medio alcalino y en presencia de un agente reductor para formar un compuesto fluorescente. Se mezclaron 30 mL de amortiguador boratos 50 mM pH 10, 500 μL de 2-mercaptoetanol (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ en etanol), 500 μL de OPA (10 mg/mL en etanol) [119]. Esta mezcla se dejó reposar 20 min. A 0.5 nmoles de enzima (en 100 μL de amortiguador fosfatos pH 5, 60 mM) se les agregaron 10 μL de Brij (100 mg/mL) y 1 mL de la mezcla que se preparó anteriormente. Después de 3 min de reacción, se leyó la intensidad de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 440 \text{ nm}$, slit = 2 nm). Se comparó la intensidad de fluorescencia de la CPO y la CPO modificada con HEX.

Copolimerización de la cloroperoxidasa con poliuretano

Para obtener el copolímero CPO-PU se precalentó 1 g de Hydropol 6B (prepolímero de poliuretano) a 37 °C durante 20 min. Por otro lado, se mezclaron 750 μL de una solución de CPO (419 μM) con 100 μL de Brij (4% en agua) y 38 μL de CoCl_2 (1 mM). Enseguida se

agregó esta mezcla al Hydropol 6B precalentado y se agitó vigorosamente durante 1 min. Después de esperar a que cesase el aumento de volumen (2 min) se colocó la espuma en baño de hielo durante 1 hora 40 min. Se lavó la espuma 3 veces con amortiguador citratos 50 mM, pH 5 (25 mL cada vez). Se colectó el volumen de lavado para la determinación de proteína y actividad halogenasa. La espuma se exprimió, se cortó en trozos pequeños y se congeló con nitrógeno líquido para pulverizarla en mortero. Finalmente se liofilizó y se almacenó a 4 °C.

Inmovilización en celita

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se pesaron 100 mg de celita y se le agregaron 250 μ L de solución de CPO (419 μ M). Enseguida se secó la mezcla en una centrífuga a vacío (Savant) durante dos horas a 30°C. En este caso particular, no se pierde proteína en el experimento, por lo tanto, la cantidad de CPO es igual a la cantidad agregada inicialmente.

Determinación de actividad halogenasa y peroxidasa

La actividad halogenasa se determinó en una mezcla de reacción que consistió en 0.1 mM de MCD, 1 mM de H₂O₂, 20 mM de KCl en amortiguador acetatos 60 mM, pH 3. La reacción se inició con la adición del H₂O₂ y se siguió espectrofotométricamente la desaparición de la MCD midiendo la absorbancia a 278 nm (coeficiente de extinción molar, $\epsilon=12,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [31]). La actividad peroxidasa se determinó en una mezcla de reacción que contenía 3 mM de CAT, 1 mM de H₂O₂ en amortiguador fosfatos 60 mM, pH 6. La reacción inició con la adición de H₂O₂ y se siguió espectrofotométricamente la aparición de producto midiendo la absorbancia a 388 nm ($\epsilon=1,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [120]).

Las determinaciones de actividad halogenasa y peroxidasa de la CPO y CPO-PEGNH₂ se realizaron en un volumen de 1 mL y se emplearon de 2 a 4 picomoles de enzima. En el caso de las actividades de CPO-PU y CPO-Celita las reacciones se realizaron en vasos de precipitado con agitación magnética vigorosa. Se emplearon 2 mg de CPO-PU en 50 mL y 1 mg de CPO-Celita en 400 mL. Se tomaron volúmenes pequeños a intervalos de tiempo regulares para seguir espectrofotométricamente la reacción, retornando dicho volumen cada vez.

Determinación del contenido de proteína

Para determinar la concentración de CPO se empleó el método de Bradford con una curva estándar de Albúmina de suero bovino (BSA). Se preparó la muestra enzimática en 800 μ L de amortiguador fosfatos pH 5, 60 mM y se añadieron 200 μ L del reactivo de BIO-RAD. Después de 5 min de reacción se leyó la absorbancia a 595 nm. También se determinó la concentración de proteína (especialmente de la CPO modificada) siguiendo la absorbancia de la banda Soret (a 398 nm) de la CPO, empleando el valor de $\epsilon=85,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [120].

Determinaciones realizadas a las diferentes preparaciones de la CPO

Efecto del solvente orgánico. Se realizaron ensayos de actividad en un medio de reacción con diferentes porcentajes de *tert*-butanol empleando tiantreno como sustrato y manteniendo la temperatura constante a 30°C. En el caso de la CPO y CPO-PEGNH₂ el ensayo se realizó en la siguiente mezcla de reacción: 20 μ M de tiantreno, 1 mM de H₂O₂, 2 a 40 picomoles de enzima con porcentajes de *tert*-butanol de 10 a 90 % en amortiguador acetatos pH 3, 60 mM, 20 mM de KCl en un volumen de 1 mL. La velocidad de la reacción se

determinó siguiendo espectrofotométricamente la desaparición del tiantreno midiendo la absorbancia a 254 nm ($\epsilon=35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [52]). La actividad de la CPO-PU se determinó empleando las mismas mezclas de reacción pero en un volumen total de 50 mL.

Dado que la celita presenta absorbancia en la región ultravioleta del espectro de luz, no fue posible seguir la reacción espectrofotométricamente. Por lo tanto, la actividad de la CPO-Celita se determinó empleando las mismas mezclas de reacción para los casos anteriores y preparación enzimática en un rango de 0.55 a 4 mg y diluciones de 1:10 y 1:100 para cada caso. La reacción se inició con la adición de H_2O_2 y después de un lapso de tiempo (30 a 75 s) que se adaptó para cada condición, se agregó 1 mL de acetonitrilo para detener la reacción. Después se monitoreó por HPLC la pérdida de absorbancia a 255 nm, empleando una columna C_{18} ODS Hypersil con dimensiones 5 μm , 100 x 2.1 mm de Hewlett Packard y una fase móvil de acetonitrilo-agua (70:30 v/v). Los cálculos de actividad específica se basaron en la relación de áreas entre el pico del sustrato en el tiempo cero y el tiempo final de cada reacción.

Perfil de pH. Para la determinación de perfiles de pH se analizaron las actividades de halogenación y peroxidación para la CPO, CPO-PEGNH₂ y CPO-PU en un rango de pH de 2 a 8 utilizando amortiguadores de acetatos (2-4) y fosfatos (5-8) con una concentración de 60 mM. El amortiguador a pH 2 se ajustó con HNO_3 .

Termoestabilidad. Se incubaron las diferentes preparaciones de la CPO en volúmenes pequeños de amortiguador fosfatos pH 5 a diferentes temperaturas (en un rango de 30 a 60°C) durante 1 hora y se midió la actividad halogenasa residual a 30 °C.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El principal desafío para la aplicación de un proceso enzimático en la industria petrolera, es el de contar con un biocatalizador activo y estable a las condiciones que comúnmente se encuentran en las refinerías como son temperaturas mayores de 80°C y sistemas no acuosos. Con el propósito de mejorar la actividad de la CPO en presencia de solventes orgánicos, se desarrollaron una serie de estrategias que incluyeron la modificación química con PEG, la copolimerización con poliuretano y la inmovilización en celita. Después de obtener cada una de las preparaciones, se realizaron ensayos para determinar algunas características de cada una de ellas.

4.1 Modificación química de la cloroperoxidasa

La modificación química de enzimas con PEG (pegilación) es un proceso que ha permitido obtener biocatalizadores con mejores propiedades que las enzimas nativas en presencia de solventes orgánicos. Por ejemplo, la modificación química del citocromo c de corazón de caballo incrementó su actividad catalítica y su capacidad para oxidar un mayor número de hidrocarburos poliaromáticos que el citocromo c no modificado en presencia de 15% de acetonitrilo [24], además de que aumentó su termoestabilidad [25]. Al modificar a la peroxidasa de rábano blanco se logró su estabilización en un amplio rango de pH y una mayor termoestabilidad [104]. La pegilación de la lignino peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* aumentó su actividad sobre el pentaclorofenol en presencia de 15% de acetonitrilo [105].

En los casos anteriores, las reacciones de modificación estuvieron dirigidas a los grupos amino de las proteínas, específicamente a residuos de lisina, y se realizaron en medios de reacción con pH de 7 o mayores. Estas condiciones no son adecuadas para la CPO ya que se inactiva con valores de $\text{pH} \geq 7$ [121, 122]. Además, existe un número importante de compuestos con grupos funcionales que reaccionan eficientemente con grupos amino de residuos de lisina [100, 101]. El PEG puede ser derivatizado con cualesquiera de éstos grupos, lo que permite tener una cantidad importante de opciones para modificar grupos amino. Sin embargo, la CPO cuenta con sólo 5 grupos amino provenientes de residuos de lisina, de los cuales 3 se encuentran en la superficie, mientras que contiene 37 grupos carboxilo de residuos de aminoácidos como el ácido glutámico y el ácido aspártico, de los cuales, 25 están expuestos al solvente. Por lo tanto, era mejor buscar una metodología adecuada para la pegilación de grupos carboxilo y que además pudiera realizarse a pH 5, condición en la cual la CPO es estable.

Se ha reportado que el uso de carbodiimidas, en presencia de un nucleófilo adecuado, ha resultado un proceso bastante eficiente para la modificación de grupos carboxilo [101]. Una razón importante para el empleo de carbodiimidas, es la posibilidad de llevar a cabo las reacciones de modificación en medio con pH de 5. En presencia de una amina u otro nucleófilo, la carbodiimida promueve la formación de una amida en dos pasos [100]. Inicialmente, la carbodiimida reacciona con un grupo carboxilo para formar un intermediario reactivo O-acil-urea (Figura 4.1.1). Posteriormente, el intermediario reacciona con la amina para formar la amida correspondiente.

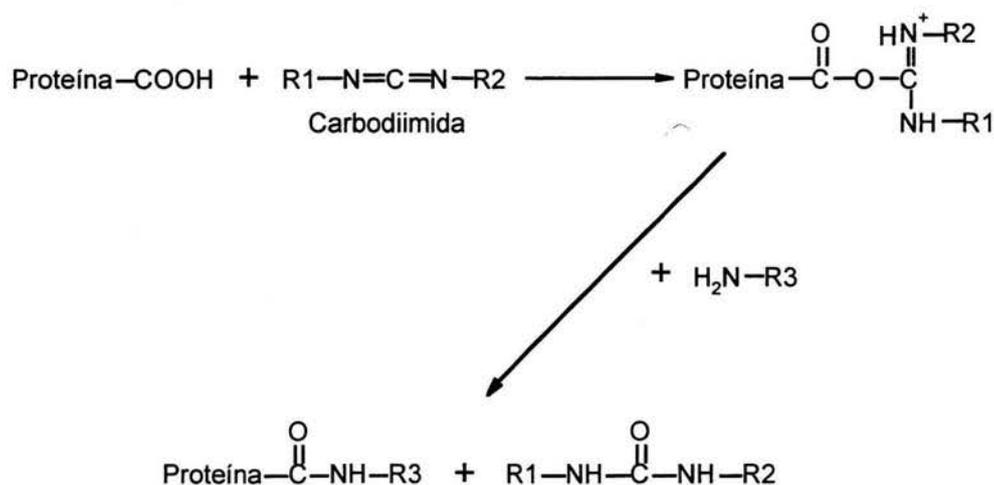


Figura 4.1.1. Mecanismo de reacción de las carbodiimidas con grupos carboxilo de proteínas [100].

4.1.1 Pegilación de los grupos amino

Puesto que la CPO tiene un número reducido de grupos amino superficiales, la primera tarea que se realizó fue el incremento de los grupos amino por medio de la modificación de sus grupos carboxilo, para lo cual se empleó una carbodiimida soluble en agua (ECD) y una diamina (HEX). Con la finalidad de determinar el efecto que pudieran ejercer tanto la ECD como la HEX en la reacción de modificación y al mismo tiempo, encontrar las condiciones en las cuales se obtenía la CPO con un mayor grado de modificación, se realizaron una serie de ensayos con diferentes excesos molares de ambos reactivos. La determinación del grado de modificación se realizó por medio de una titulación por fluorescencia de grupos amino primarios tal como se describe en la metodología. También se determinó la actividad halogenasa para cada preparación. En la Tabla 4.1.1.1 se pueden observar los resultados obtenidos con la modificación química de la CPO para incrementar los grupos amino.

De acuerdo con los resultados que se muestran en la Tabla 4.1.1.1, independientemente de los excesos molares de HEX y ECD empleados en la reacción, el número de grupos amino se mantiene alrededor de 9. Recordando que la CPO tiene 5 grupos amino libres provenientes de lisinas, con esta estrategia se obtienen aproximadamente 4 grupos más, los cuales representan una eficiencia de reacción muy baja puesto que la enzima tiene 37 grupos carboxilo. Los procesos de modificación química son inespecíficos, de tal manera que los valores obtenidos para el número de grupos amino representan un valor promedio de las especies moleculares presentes. Es decir, es posible que algunas moléculas de la enzima tengan unidas 3, 4 ó 5 moléculas de HEX.

Tabla 4.1.1.1. Modificación química sobre los grupos carboxilo de la cloroperoxidasa con hexandiamina mediada por etilencarbodiimida.

Exceso molar ^a		Actividad específica ^b		Número de grupos amino ^c
HEX	ECD	(s ⁻¹)	(%)	
CPO sin modificación		1039	100	5.00
4000	1755	981	94.4	8.65
1000	2000	939	90.3	9.15
4000	8000	463	44.5	9.05

a, Exceso molar sobre molécula de CPO; b, Actividad halogenasa; c, Valor determinado como se describe en la metodología.

Llama fuertemente la atención el hecho de que sólo se usaron 4 moléculas de HEX a la CPO sin importar los excesos molares de HEX y ECD que se adicionaron a la mezcla de reacción. Las reacciones de modificación se realizaron en medio con pH de 5, puesto que la CPO es estable a ese pH. Una posibilidad para explicar el hecho de no aumentar el grado de modificación al incrementar los excesos molares de los reactivos es que las moléculas de HEX ($pK_a = 10.4$) están protonadas a pH 5 y no están disponibles para reaccionar con los grupos

carboxilo de la CPO. La reacción con carbodiimidas (Figura 4.1.1) requiere la presencia del grupo funcional amino y del grupo funcional carboxilo, si éstos están ionizados, no ocurre la reacción.

Luego del proceso para aumentar los grupos amino, la intención era comparar la eficiencia del proceso de pegilación de la CPO con un mayor número de grupos amino y la CPO no modificada. Dado que los diferentes excesos molares de HEX no aumentaron el grado de modificación de la CPO (Tabla 4.1.1.1), se eligió la preparación que conservó mayor actividad específica para realizar el proceso de pegilación. Esta actividad fue de 981 s^{-1} que representa el 94.4% de la actividad de la CPO sin modificar.

A las muestras pegiladas se les determinó actividad halogenasa. Después del proceso de pegilación, la CPO modificada previamente con HEX mantuvo hasta un 56% de la actividad específica, mientras que la CPO pegilada directamente sobre sus grupos amino conservó 44.7% de su actividad específica (Tabla 4.1.1.2).

Tabla 4.1.1.2. Pegilación de los grupos amino de la cloroperoxidasa.

Exceso molar ^a		Actividad específica ^b		Grado de Modificación
		(s^{-1})	(%)	
CPO		1039	100	No modificada ^c
CPO-PEG^c				
PEG	ECD	465	44.7	Baja ^e
370	3700			
CPO-HEX-PEG^d				
PEG	ECD	582	56.0	Notable ^e
100	1000			

a, Exceso molar sobre molécula de CPO; b, Actividad halogenasa; c, CPO modificada con PEG; d, CPO modificada con PEG después de la modificación con HEX; e, Ver detalles en la Figura 4.1.1.1.

En la Figura 4.1.1.1 se muestran los cromatogramas de intercambio iónico de la CPO pegilada sin y con incremento de grupos amino. En estos cromatogramas se observa la presencia de una especie molecular con propiedades iónicas distintas a las de la CPO, puesto que no se retuvo en la columna y que aumentó de manera considerable cuando se realizó la pegilación de la CPO previamente modificada con HEX (Figura 4.1.1.1).

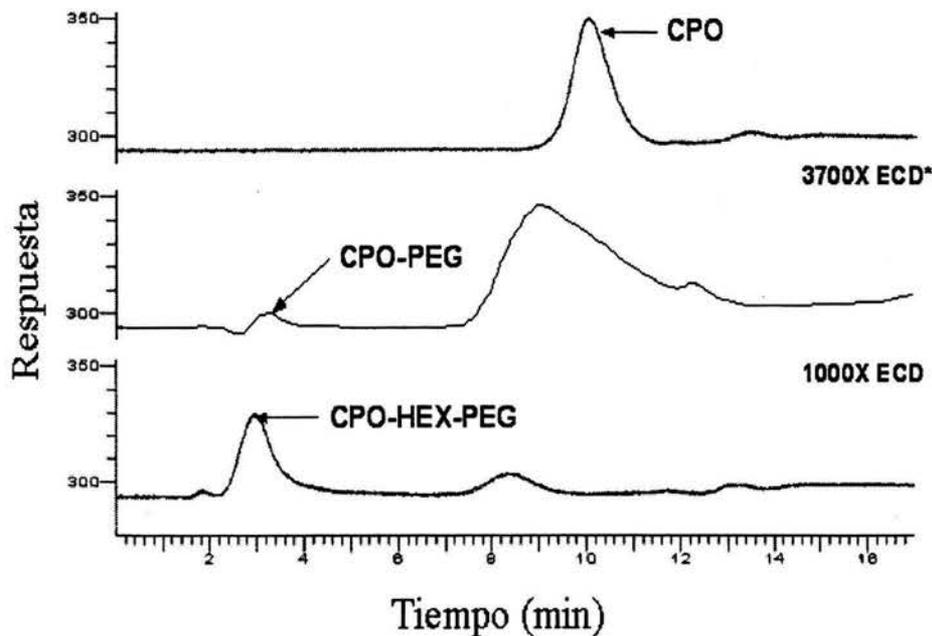


Figura 4.1.1.1. Perfil de elución en una columna de intercambio aniónico de la cloroperoxidasa y las preparaciones obtenidas empleando metoxipoli(etilenglicol).

* Exceso molar de ECD por molécula de CPO.

Es visible que la fracción de CPO modificada aumenta al incrementar el número de grupos amino (Figura 4.1.1.1), aunque la pérdida de actividad es cercana al 50% con respecto a la enzima no modificada (Tabla 4.1.1.2). Además de esto no se obtuvo un aumento considerable en el aumento de grupos amino, pues sólo se obtienen 4 grupos amino más. Con esto, parecía interesante la opción de la pegilación directa de los grupos carboxilo, ya que la CPO cuenta con 37 de tales grupos. Para tal propósito se empleó un PEG derivatizado con un

grupo amino (PEG-NH₂) con el objetivo de que el amino del PEG reaccionara con los carboxilos de la CPO por medio de química de carbodiimidas (Figura 4.1.1) y de esta manera comparar la eficiencia de esta reacción con la reacción de modificación para aumentar grupos amino seguida del proceso de pegilación.

4.1.2 Pegilación de los grupos carboxilo

Con el propósito de encontrar las mejores condiciones de modificación de los grupos carboxilo de la CPO con PEGNH₂, se realizaron ensayos con diferentes excesos molares de ECD manteniendo constante el exceso molar de PEGNH₂. Al igual que la CPO pegilada sobre grupos amino, se determinó la actividad halogenasa de las diferentes preparaciones y éstas se pasaron a través de una columna de intercambio aniónico.

Recordando que la CPO tiene un alto contenido de grupos carboxilo, su carga neta es negativa, de tal forma que si se están modificando algunos de estos grupos, el resultado esperado es que su carga negativa cambie. Para comprobar si esto ocurría, se pasaron las distintas muestras pegiladas a través de una columna de intercambio aniónico. Como se puede observar en la Figura 4.1.2.1, la CPO sin modificación se retuvo en la columna de intercambio aniónico, mientras que al modificar la CPO con PEGNH₂ aparece una nueva fracción que no se retuvo en la columna, indicando el cambio en las propiedades iónicas de la CPO atribuido a la disminución de cargas negativas por la unión covalente de moléculas de PEGNH₂ a los grupos carboxilo.

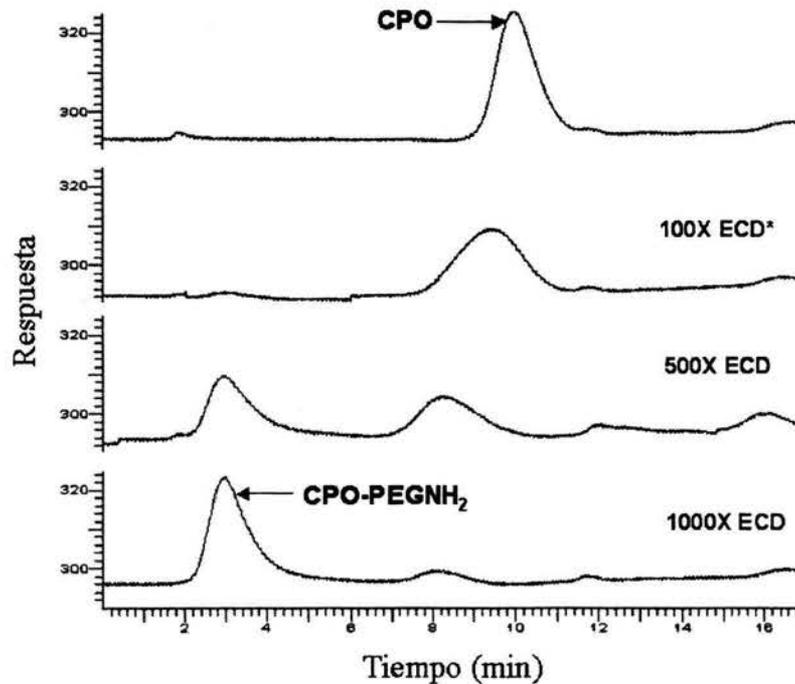


Figura 4.1.2.1. Perfil de elución en una columna de intercambio aniónico de la cloroperoxidasa y las preparaciones obtenidas empleando metoxipolietilenglicol amino.
* Exceso molar de ECD por molécula de CPO.

Continuando con la Figura 4.1.2.1, es visible que al aumentar el exceso molar de ECD aumentó la fracción de CPO modificada al tiempo que disminuyó la actividad específica (Tabla 4.1.2.1). El valor de actividad específica representa el número de moléculas de MCD transformadas por molécula de CPO durante un segundo. Este valor es un promedio de la actividad de todas las moléculas de CPO presentes en la mezcla de reacción. En la Figura 4.1.2.1 también se observa que en las diferentes preparaciones, se encuentran presentes dos especies moleculares en diferentes proporciones: la CPO y la CPO modificada, de tal manera que el valor de actividad específica representa la actividad de ambas especies moleculares. Al emplear un exceso molar de ECD igual a 1000 se observó que la fracción que no se retiene en la columna fue la especie iónica mayoritaria en la mezcla, por lo que en tal caso se hace evidente la pérdida de actividad debida al proceso de modificación química de la CPO.

Tabla 4.1.2.1. Pegilación de los grupos carboxilo de la cloroperoxidasa.

Exceso molar ^a		Actividad específica ^b		Grado de Modificación
PEGNH ₂	ECD	(s ⁻¹)	(%)	
CPO sin modificación		1039	100	No modificada ^c
100	100	944	90.9	Baja ^c
100	500	824	79.2	Media ^c
100	1000	659	63.4	Notable ^c

a, Exceso molar sobre molécula de CPO; b Actividad halogenasa; c Ver detalles en la Figura 4.1.2.1.

Ahora, comentando de manera general los resultados de la modificación química sobre grupos carboxilo, incluyendo la modificación con HEX y la modificación con PEGNH₂, se observó que el aumento en los excesos molares de los reactivos disminuyó la actividad de la CPO (Tablas 4.1.1.1 y 4.1.2.1). Si bien se ha reportado la modificación química de enzimas sin pérdida apreciable en su actividad catalítica [105], ésto no es una regla en el proceso de modificación química de enzimas, ya que en ocasiones dicho proceso promueve la pérdida de actividad catalítica. Esta pérdida de actividad en las enzimas se ha atribuido a la modificación de residuos importantes para la catálisis. Un ejemplo, es el reporte acerca de la modificación química de la lisozima donde se sugiere que la modificación selectiva de un residuo de ácido aspártico, el cual participa en el sitio de unión del sustrato, se refleja en la pérdida considerable de actividad enzimática [123]. En el caso particular de la CPO, existe un residuo de ácido glutámico (Glu183) que forma parte del sitio activo (Figura 4.1.2.2) y que juega un papel importante en la catálisis de la enzima. El Glu183 tiene la función de la histidina distal al hierro del grupo hemo en las peroxidasas [57]. Esta histidina distal funciona como catalizador ácido-base facilitando el rompimiento del enlace O-O del peróxido de hidrógeno,

dando lugar a la formación del compuesto I (ver el ciclo catalítico de la CPO). Se ha propuesto que dicha histidina ayuda a enlazar el peróxido aniónico al hierro del grupo hemo actuando como catalizador básico mientras acepta un protón del peróxido de hidrógeno neutral cuando éste se enlaza al hierro y actuando como un catalizador ácido donando un protón al hidróxido aniónico saliente [124].

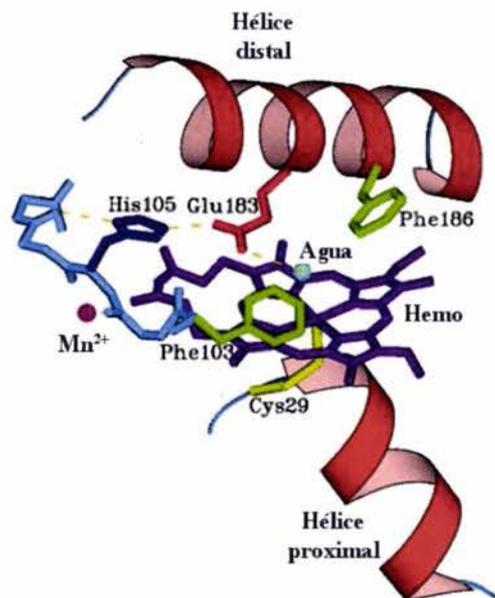


Figura 4.1.2.2 Sitio activo de la cloroperoxidasa [57].

En un trabajo reciente, se cambió al Glu183 por una histidina y se observó una caída del 85% de la actividad halogenasa de la CPO y un aumento de 2.5 veces en su actividad de epoxidación [125]. Esto muestra que el Glu183 es importante pero no esencial para la actividad halogenasa de la CPO. Por otro lado, en la entrada del canal que conduce hacia el sitio activo de la enzima, se encuentran los residuos de ácido glutámico 69 y 266 [57]. Si estos grupos fuesen modificados pudieran provocar problemas de accesibilidad de los sustratos al sitio activo de la enzima. Dado que existen residuos de aminoácidos con grupos

carboxilo con importancia en la catálisis y notando que la modificación química es un proceso inespecífico, es muy posible que algunos de estos residuos se estén modificando y como consecuencia, disminuya la actividad catalítica de la CPO, aunque es claro que se requieren mayores estudios para establecer con precisión las causas que provocaron la pérdida de actividad halogenasa de la CPO modificada.

Con base en los resultados obtenidos para las 5 preparaciones pegiladas de la CPO, incluyendo tanto las modificaciones sobre grupos amino como de grupos carboxilo, se decidió someter a la preparación con PEGNH₂, en la cual se empleó ECD en un exceso molar de 1000 (Tabla 4.1.2.1), a ensayos de termoestabilidad, actividad en solventes orgánicos y perfiles de pH para determinar el efecto de la pegilación sobre la CPO, ya que esta preparación resultó ser la más homogénea de todas las obtenidas por pegilación (muestra una especie molecular mayoritaria, Figura 4.1.2.1). A esta preparación se le nombró CPO-PEGNH₂. La CPO-PEGNH₂ mantuvo una actividad específica de 659 s⁻¹, que representa el 63.4% de la actividad de la CPO sin modificar.

4.2 Copolimerización de la cloroperoxidasa con poliuretano

La copolimerización con poliuretano se ha empleado para inmovilizar desde enzimas hasta microorganismos viables y no viables para aplicarlos en diferentes procesos biocatalíticos [109-115]. Durante el proceso de formación de la espuma, los grupos isocianato del prepolímero de poliuretano reaccionan con grupos amino e hidroxilo de las enzimas (ver Figura 1.6.1), además de reaccionar con agua para formar CO₂, el cual favorece el aumento del volumen de la espuma de poliuretano.

La eficiencia de inmovilización, que representa la actividad residual de la enzima enlazada al polímero [113], está dada por la relación:
$$\frac{\text{U / g enzima inmovilizada}}{\text{U / g enzima libre}}$$

Se ha reportado que la eficiencia de inmovilización aumenta cuando se emplean enzimas glicosiladas, dado que se incrementa considerablemente la cantidad de grupos hidroxilo disponibles para la reacción de polimerización [113]. La CPO tiene un contenido de carbohidratos de 25-30% [31]. Las moléculas de carbohidratos están distribuidas de manera relativamente uniforme en la superficie de la enzima, por lo cual se espera que esté unida a la matriz polimérica a través de diferentes puntos de su estructura. El copolímero CPO-poliuretano (CPO-PU) se obtuvo con una carga de 12.2 mg de CPO g⁻¹ de CPO-PU, que es muy similar a la carga de 16.4 mg de CPO g⁻¹ de CPO-PU reportada anteriormente [110, 115]. La CPO-PU presentó una actividad halogenasa igual a 0.7 μmol MCD·mg⁻¹ CPO-PU·min⁻¹. Esto representa una eficiencia de inmovilización de 3.86%. La pérdida en la eficiencia de inmovilización se ha atribuido principalmente a la inactivación de las enzimas durante el proceso de polimerización dado que se trata de una reacción exotérmica y al amontonamiento de las moléculas en la matriz polimérica [113]. En este caso, se liofilizó la espuma para secarla y es posible que este proceso haya contribuido a la inactivación de la enzima y por lo tanto, con la pérdida en la eficiencia de inmovilización. Otros autores ha secado la espuma en atmósfera de P₂O₅ sin pérdida de actividad considerable [110, 113, 115]. La preparación enzimática que se obtuvo fue adecuada para realizar ensayos a nivel laboratorio, puesto que una mayor actividad requeriría de una mayor cantidad de los reactivos necesarios para realizar los diferentes ensayos. La CPO-PU se almacenó a 4°C y después de 11 meses de almacenamiento mantuvo el 100% de su actividad.

4.3 Inmovilización de la cloroperoxidasa en celita

La inmovilización en celita no es un proceso de modificación química, pero si es una alternativa para lograr actividad enzimática en solventes hidrofóbicos [116, 117]. Este tipo de inmovilización ocurre por un fenómeno de adsorción de las moléculas de CPO sobre la superficie de la celita. La preparación que se obtuvo en este trabajo presentó una actividad halogenasa de $8.83 \mu\text{mol MCD mg}^{-1} \text{CPO-Celita min}^{-1}$.

Existe un interés especial en la modificación química de proteínas con agentes químicos muy hidrofóbicos, como la trimetilsilil acetamida, que sólo es posible realizarlas en medios con bajo contenido de agua. En estudios previos, se resuspendió la CPO en un amortiguador adecuado y se midió la actividad halogenasa residual después de someterla a procesos como la precipitación con acetona y la liofilización. Luego del proceso de precipitación con acetona se recuperó un 10% de la actividad y 78% en el caso de la liofilización. Con la finalidad de comparar la capacidad de la inmovilización en celita para mantener la actividad de la CPO también se resuspendió la enzima y se midió la actividad halogenasa, obteniendo una recuperación de 90% de la actividad. Estos resultados muestran que la CPO no sufre una pérdida drástica de actividad al inmovilizarla en celita. Es posible que la adsorción de la CPO en la superficie de la celita evite la desnaturalización de la enzima por el proceso de deshidratación al que es sometida. Por lo tanto, la inmovilización de la CPO en celita se muestra como un proceso adecuado para deshidratar a la proteína sin pérdidas considerables en la actividad enzimática, de tal manera que pueda ser sometida a procesos más drásticos de modificación química.

4.4 Efecto de las diferentes preparaciones de la cloroperoxidasa sobre su actividad en solventes orgánicos, termoestabilidad y perfil de pH

Actividad en solventes orgánicos. Con la finalidad de observar el efecto de la presencia del solvente orgánico sobre la actividad de las diferentes preparaciones de la CPO se realizaron ensayos de actividad enzimática en mezclas con concentraciones crecientes de solvente orgánico. Para realizar dichos ensayos se eligió al *tert*-butanol, que es miscible en agua y a diferencia de otros alcoholes no es sustrato para la CPO. Este solvente ha sido empleado en reacciones de sulfoxidación selectiva con CPO y se ha demostrado que es adecuado para este tipo de reacciones [88, 112]. Por otro lado, se empleó al tiantreno como sustrato modelo dado que es un compuesto azufrado e hidrofóbico que además se encuentra presente en el diesel. En la Tabla 4.4.1 se muestran los valores de actividad específica obtenidos para cada una de las preparaciones. Los valores de actividad específica de la CPO-PU y la CPO-Celita están reportados en relación a la CPO inmovilizada en cada caso.

Tabla 4.4.1. Actividad específica de las diferentes preparaciones de la cloroperoxidasa en medio con 10% de *tert*-butanol.

Preparación enzimática	Actividad específica (s ⁻¹) ^a
CPO	300 ± 21
CPO-PEGNH ₂	333 ± 1
CPO-PU	14.55 ± 1.24 ^b
CPO-Celita	19.34 ± 1.06 ^b

a, Actividad medida empleando como sustrato al tiantreno como se describe en la metodología; b, Actividad calculada en relación a la enzima inmovilizada en el soporte. Los valores reportados son el promedio de ensayos realizados por triplicado.

Como se observa en la Tabla 4.4.1 la CPO mantuvo su actividad en 10% de *tert*-butanol al ser pegilada. Esto es muy interesante, puesto que perdió 36.6% de su actividad halogenasa (Tabla 4.1.2.1). Se ha reportado que el fenómeno de partición entre el sitio activo y el solvente parece ser un factor importante en la biocatálisis cuando se emplean sustratos hidrofóbicos [94]. La modificación química del citocromo c con PEG aumentó la cantidad de hidrocarburos poliaromáticos que pudo oxidar al tiempo que se incrementó su actividad catalítica con respecto al citocromo no modificado [25]. Estas mejoras en la actividad catalítica del citocromo c modificado se atribuyeron al aumento en la hidrofobicidad de la cavidad del sitio activo provocando a su vez la partición favorable de sustratos hidrofóbicos hacia el sitio activo [25]. Así que un cambio en la hidrofobicidad del sitio activo de la enzima podría explicar que la CPO-PEGHN₂ mantuviera su actividad contra tiantreno (sustrato hidrofóbico) aún cuando disminuyó su actividad sobre la MCD, que es un sustrato hidrofílico.

En el caso de la CPO-PU la actividad es aproximadamente un 5% de la actividad mostrada por la CPO en las mismas condiciones. Una de las razones de dicho resultado es la baja eficiencia de inmovilización que se obtuvo, puesto que hay mucha enzima en la espuma que no es activa. Otro problema pudiera ser la existencia de problemas de difusión del tiantreno hacia el sitio activo de la enzima. Por otro lado, la actividad tan baja de la CPO-Celita, que es aproximadamente el 6% de la actividad de la CPO, también puede deberse a problemas difusionales, aunque se necesitan más estudios para determinar las causas que provocan la pérdida tan drástica de actividad de la CPO-PU y la CPO-Celita.

En la Figura 4.4.1 se muestra el comportamiento en concentraciones crecientes de solvente orgánico para las diferentes preparaciones de la CPO. Los valores de actividad se reportaron como porcentajes para poder observar de una forma más clara las diferencias o similitudes en el comportamiento de las diferentes preparaciones con respecto a la CPO. No se determinó la actividad de las diferentes preparaciones de la CPO con 0% de *tert*-butanol ya que el tiantreno es insoluble en agua, de tal forma que se reportó el valor de actividad obtenido con 10% de *tert*-butanol como el 100% de actividad para cada preparación.

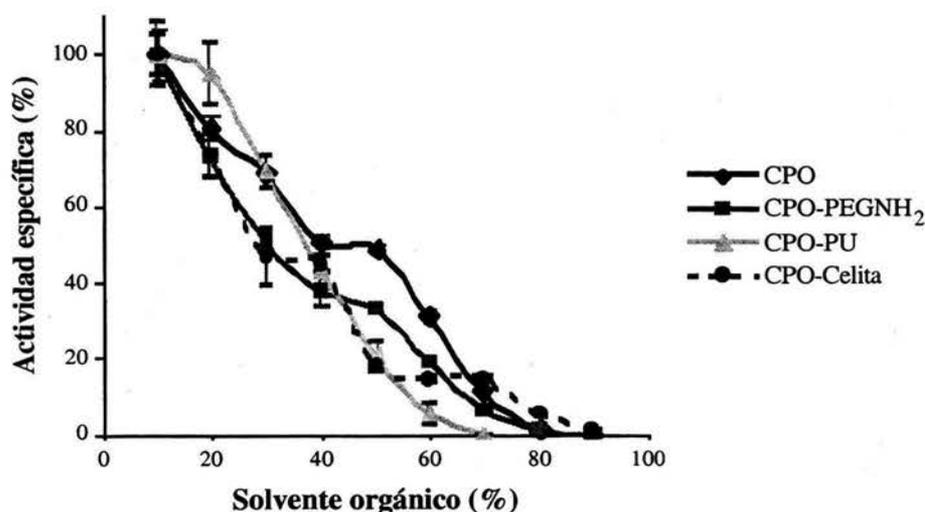


Figura 4.4.1. Actividad de la cloroperoxidasa y sus modificaciones en solvente orgánico.

Mezcla de reacción: 20 μ M de tiantreno, 1 mM de H₂O₂ y diferentes porcentajes de *tert*-butanol en amortiguador acetatos pH 3, 60 mM, 20 mM KCl.

Cada ensayo se realizó por triplicado.

La copolimerización con poliuretano mejoró la actividad de la CPO en un contenido de 20% de *tert*-butanol en el medio de reacción (Figura 4.4.1) mientras que el resto de las preparaciones y la CPO pierden aproximadamente el 20% en las mismas condiciones. Después, la actividad enzimática de la CPO-PU cayó drásticamente, mientras que la CPO

mantuvo el 50% de su actividad con un 50% de *tert*-butanol en el medio de reacción. La CPO-PEGNH₂ presentó un perfil de actividad muy similar al de la CPO, aunque ésta fue un poco mejor en todo el rango de condiciones analizadas. El caso de la CPO-Celita también fue muy similar a la CPO. Se reportado que la actividad de las enzimas normalmente cae cuando aumenta el contenido de solventes orgánicos en la mezcla de reacción [77].

Es claro que ninguna de las preparaciones presenta un comportamiento con diferencias marcadas con respecto a la CPO (Figura 4.4.1), aunque existen resultados interesantes como el caso de la CPO-PEGNH₂ que mantuvo el mismo valor de actividad que la CPO en medio con 10% de *tert*-butanol o la CPO-PU que mantuvo el 100% de su actividad en medio con 20% de *tert*-butanol. Estos resultados no son suficientes para la aplicación de alguna de estas preparaciones en un proceso de biodesulfuración donde lo ideal sería tener concentraciones mínimas de agua en el solvente orgánico que disuelve el diesel o en el caso extremo donde el diesel fuese el solvente.

Termoestabilidad. La CPO, CPO-PU y la CPO-PEGNH₂ se sometieron a ensayos de termoestabilidad con el fin de determinar los efectos de los diferentes tratamientos sobre la termoestabilidad de la CPO. En este caso no se realizó el ensayo con la CPO-Celita puesto que la enzima se desorbe en las condiciones del ensayo y por lo tanto, no sería posible determinar el efecto termoestabilizante del soporte sobre la enzima. Las diferentes preparaciones de la CPO mantuvieron su actividad halogenasa después de una hora de incubación a 30°C, por lo que para fines de comparación se normalizaron las actividades específicas tomando dicho resultado como el 100% para cada preparación enzimática.

Tanto la CPO como la CPO-PU y la CPO-PEGNH₂ mantuvieron su actividad enzimática después de una hora de incubación a 40°C y no se observó una diferencia entre ellas (Figura 4.4.2). La CPO-PU presentó una mejora en su termoestabilidad con respecto a la enzima nativa a 50°C, puesto que mantuvo el 92% de su actividad comparada con el 77% de la enzima nativa y el 54% de la CPO-PEGNH₂ (Figura 4.4.2). Este último resultado pudiera explicarse si se piensa en la posibilidad de que la inmovilización de la CPO (CPO-PU) la está protegiendo contra el proceso de desplegamiento provocado por el aumento en la temperatura, ya que varios de sus residuos (grupos amino primarios y grupos hidroxilo de los carbohidratos) se encuentran unidos covalentemente a la red polimérica. Tal vez estas uniones no son suficientes para mantener la estructura terciaria de la proteína a mayores temperaturas. En otros trabajos en los cuales se han inmovilizado enzimas en poliuretano no se ha realizado ensayos de termoestabilidad que permitan la comparación de los resultados obtenidos.

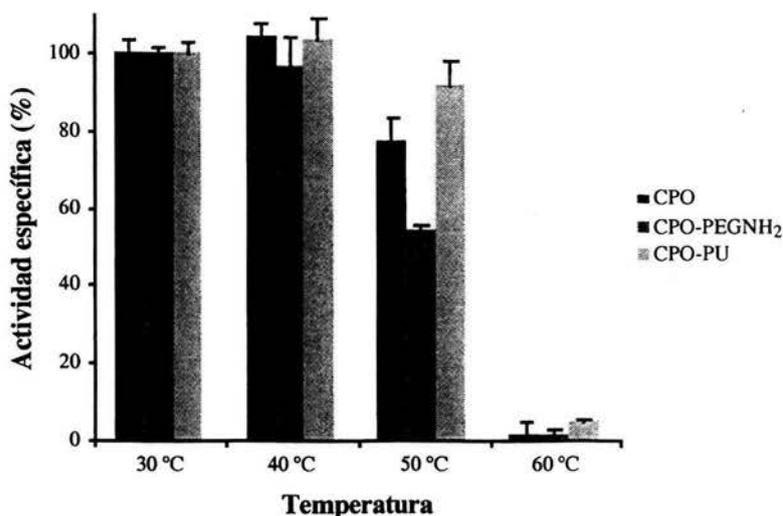


Figura 4.4.2. Termoestabilidad de la cloroperoxidasa y sus modificaciones. Después de 1 hora de incubación a diferentes temperaturas, se determinó actividad halogenasa a 30°C. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La modificación con PEG no le confirió mayor termoestabilidad a la CPO en comparación con los resultados obtenidos anteriormente, como es el caso de la modificación del citocromo c que después de 7 horas de incubación en presencia del sustrato a 80°C mantuvo el 100% de su actividad [25]. En dicho trabajo se logró la modificación del 80% de las lisinas del citocromo c y se concluyó que la elevada termoestabilidad presentada por el citocromo c modificado fue debida a la conservación del ambiente del grupo hemo y la disminución en la velocidad de desplegamiento del sitio activo [25]. En otro trabajo se concluyó que la termoestabilidad conferida por el PEG a la peroxidasa de rábano blanco fue debida a dos fenómenos: la represión del desplegamiento inicial y la reducción en la velocidad de inactivación de la forma final de la enzima [104]. Es muy posible que no se hayan unido suficientes moléculas de PEG a la CPO para alcanzar efectos similares a los reportados por otros autores.

Perfiles de pH. Se determinaron los perfiles de pH para las preparaciones CPO-PEGNH₂ y CPO-PU empleado como sustratos al CAT, que permite determinar la actividad peroxidasa y la MCD, que permite valorar la actividad halogenasa. Estos ensayos se realizaron también para la CPO con fines comparativos. No se determinaron los perfiles de pH para la CPO-Celita dado que la CPO se desorbe en las condiciones de los ensayos.

En el caso de la actividad halogenasa, la CPO requiere de la presencia de protones para llevar a cabo la reacción (ver ciclo catalítico) y como puede verse en la Figura 4.4.3, el pH óptimo de actividad es 3 y no existe actividad a pHs mayores de 5. Dado que este requisito depende del pH del medio de reacción, las modificaciones de la CPO tienen el mismo comportamiento que la enzima nativa.

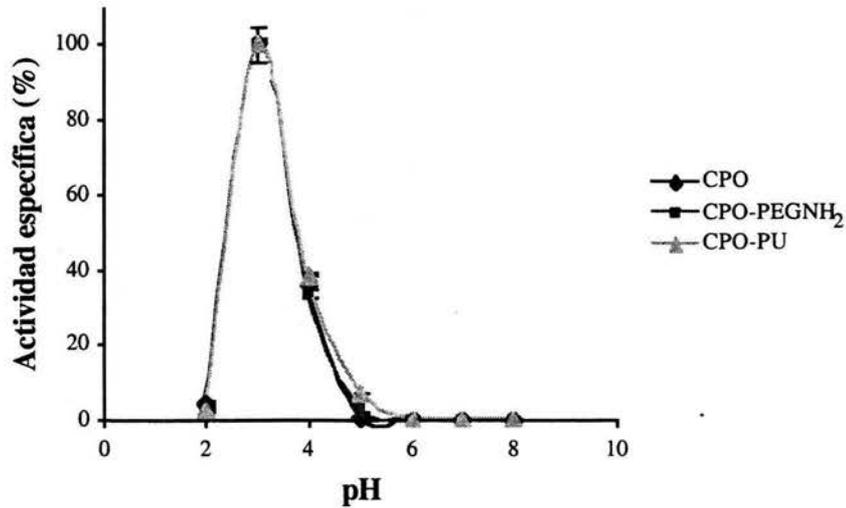


Figura 4.4.3. Perfil de pH de actividad halogenasa para las diferentes modificaciones de la cloroperoxidasa.

Medio de reacción: 0.1 mM monoclodimedona, 1 mM H₂O₂, 20 mM KCl en amortiguadores con pH entre 2 y 8. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Para hacer más evidente el comportamiento de las diferentes preparaciones, la actividad específica se reportó en forma de porcentajes. En la Tabla 4.4.2 se muestran los valores de actividad específica para cada preparación. Estos valores representan el 100% de la actividad mostrada en las Figuras 4.4.3 y 4.4.4.

Tabla 4.4.2. Actividad específica máxima de las diferentes preparaciones de la cloroperoxidasa en medio acuoso.

Preparación enzimática	Actividad halogenasa ^a		Actividad peroxidasa ^a	
	pH	Actividad específica (s ⁻¹)	pH	Actividad específica (s ⁻¹)
CPO	3	1050 ± 18	5	1943 ± 40
CPO-PEGNH ₂	3	673 ± 5	6	1354 ± 18
CPO-PU	3	55 ± 2 ^b	5	133 ± 15 ^b

a, Actividad medida como se describe en la metodología; b, Actividad calculada en relación a la enzima inmovilizada en el soporte. Los valores reportados son el promedio de ensayos realizados por triplicado.

El perfil de actividad peroxidasa de la CPO-PU y la CPO-PEGNH₂ es muy similar al de la CPO, aunque existen algunas diferencias. Una de ellas es que ambas modificaciones de la enzima mantuvieron prácticamente el 100% de actividad entre pH 5 y 6, mientras que la CPO mostró su máxima actividad a pH 5 (Figura 4.4.4). Otra diferencia es que mientras la CPO perdió su actividad a pH 7, ambas modificaciones todavía mostraron actividad a ese pH. Esto puede deberse a que algunos de los residuos ionizables de la CPO que participan en el proceso de inactivación por el pH estén formando uniones covalentes con el PEGNH₂ (CPO-PEGNH₂) o poliuretano (CPO-PU), por lo que no están susceptibles a la ionización y el proceso de inactivación es alterado.

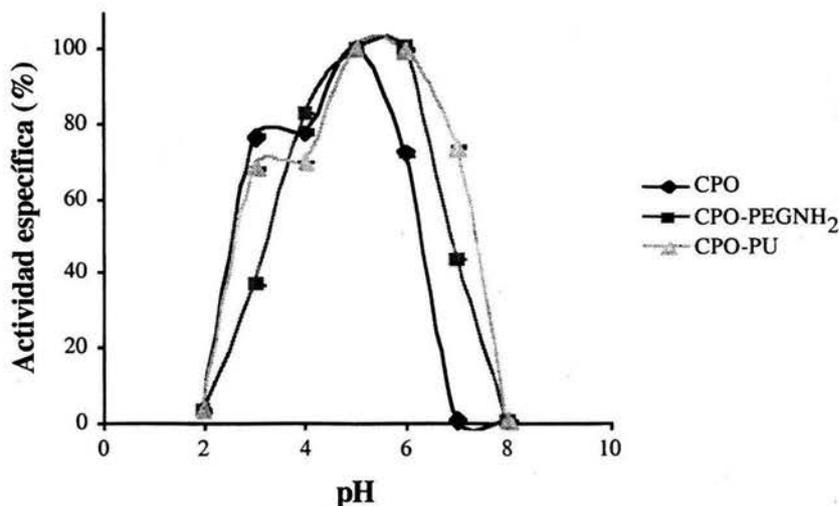


Figura 4.4.4. Perfil de pH de actividad peroxidasa para las diferentes modificaciones de la cloroperoxidasa.

Medio de reacción: 3 mM catecol, 1 mM H₂O₂ en amortiguadores con pH entre 2 y 8.
Cada ensayo se realizó por triplicado.

Los ensayos para determinar el perfil de pH se realizaron por triplicado. Normalmente los perfiles de pH de las enzimas presentan una forma de campana, donde la actividad se

incrementa gradualmente al aumentar el pH hasta llegar a un valor máximo para después caer conforme sigue aumentando el pH del medio. En este caso, no se tiene una explicación para el comportamiento que muestran la CPO y la CPO-PU en medios con valor de pH de 3 y 4 (Figura 4.4.4).

De acuerdo con los resultados presentados, aunque existen ciertas diferencias entre las preparaciones de la CPO, éstas no son suficientes para la aplicación de alguna de ellas en la industria petrolera. Se requiere seguir trabajando para obtener un biocatalizador con características adecuadas para ser aplicado en un proceso de desulfuración a nivel industrial, como son la tolerancia a cantidades importantes de solventes orgánicos en el medio de reacción, temperaturas mayores a 80°C y valores extremos de pH.

Es importante notar que los tratamientos a los cuales se sometió a la CPO pueden ser aplicados a otras enzimas para emplearlas con diferentes propósitos en medios con bajo contenido de solvente orgánico.

5. CONCLUSIONES

La CPO-PEGNH₂ mantuvo el mismo valor de actividad que la enzima no modificada en medio con 10% de *tert*-butanol y empleando como sustrato al tiantreno, además de que presentó un perfil de actividad muy similar a la enzima no modificada en concentraciones crecientes de *tert*-butanol, aunque ésta fue mejor en todo el rango de condiciones analizadas.

La CPO-PU mantuvo el 100% de su actividad empleando como sustrato al tiantreno en medio con 20% de *tert*-butanol, mientras que las otras preparaciones perdieron aproximadamente el 20% de su actividad en las mismas condiciones.

Se logró obtener un biocatalizador (CPO-PU) estable al almacenamiento y de fácil recuperación del medio de reacción. La CPO-PU presentó una mayor termoestabilidad que la enzima nativa a 50°C, pues mantuvo el 92% de su actividad halogenasa después de 1 hora de incubación a esa temperatura, mientras que la enzima nativa conservó el 77% de su actividad en las mismas condiciones.

Las preparaciones CPO-PU y CPO-PEGNH₂ presentaron el 74% y el 44% de actividad peroxidasa a pH 7 respectivamente, mientras que la enzima no modificada no presentó actividad a este pH.

No se lograron ventajas espectaculares al comparar las diferentes preparaciones obtenidas con la enzima nativa que permitan su aplicación en la industria petrolera, sin embargo, pueden ser aplicadas en otros procesos que no requieran de concentraciones considerables de solventes orgánicos o altas temperaturas.

6. PERSPECTIVAS

Empleo de compuestos más adecuados para la modificación química de la superficie de la cloroperoxidasa y la protección del sitio activo

Dadas las características estructurales de la CPO, tales como la relación de grupos carboxilo y grupos amino, se propone el uso de agentes de modificación química con valores de pK_a cercanos a 5 para que puedan reaccionar con los grupos carboxilo de la CPO. Estos podrían ser aquéllos que reaccionen eficientemente entre pH 4 y 5. Uno de estos compuestos puede ser el PEG-hidrazida, que se ha reportado como una alternativa para la modificación de grupos carboxilo mediante química de carbodiimidas y tiene un pK_a alrededor de 5 [101]. Aunado a esto, se puede emplear algún sustrato que se una fuertemente al sitio activo en las condiciones de la reacción de modificación y que después pueda ser removido para evitar la modificación de residuos de aminoácidos importantes para la catálisis.

Modificación de los grupos superficiales de la cloroperoxidasa por medio de técnicas de biología molecular

Considerando que la modificación química de la CPO no ha sido eficiente hasta ahora, una alternativa interesante es la manipulación genética para mejorar sus propiedades catalíticas contra sustratos hidrofóbicos en solventes orgánicos y poder aplicarla en la industria petrolera. Recientemente se logró la expresión de la CPO recombinante [126], lo que abre las puertas para realizar una serie de trabajos con la finalidad de mejorar las características catalíticas de la CPO en solventes orgánicos.

Exploración de aplicaciones para las preparaciones obtenidas en medio acuoso

Durante el desarrollo de este trabajo se han obtenido preparaciones enzimáticas que si bien no son la solución para el problema que se planteó inicialmente, es posible explorar aplicaciones para dichas preparaciones que no impliquen el uso en solventes orgánicos. Una preparación de gran interés es el copolímero CPO-PU, puesto que es un biocatalizador estable al almacenamiento y de fácil recuperación del medio de reacción. Una alternativa es el uso de este copolímero para la síntesis de polianilina con propiedades conductoras de electricidad. Existe un reporte en la literatura en el cual se describe la síntesis enzimática de este polímero en medio acuoso [127]. En dicho reporte describen el proceso realizado por la peroxidasa de rábano blanco. Por la acción de esta enzima se forman radicales libres que tienden a polimerizarse. Dicha polimerización ocurre al azar, por lo que se forman polímeros altamente ramificados que son malos conductores de electricidad. Para obtener un producto con propiedades conductoras, se requiere que el polímero sea lineal. En el reporte antes mencionado utilizan un templado para promover la polimerización lineal. Como alternativa al uso de un templado, se pretende realizar la reacción empleando 2, 3, 5, 6-tetracloroanilina y 2, 3, 5, 6-tetrafluoroanilina para forzar el proceso de polimerización lineal.

La CPO se ha presentado como una enzima especialmente lábil, de tal manera que la modificación de otras enzimas más robustas, incluyendo otras peroxidases, es una alternativa interesante para explorar aplicaciones de interés comercial.

7. REFERENCIAS

- 1 Speight, J. G. (1999) The chemistry and technology of petroleum. Marcel Dekker, New York, N. Y.
- 2 Rall, H. T., Thompson, C. J., Coleman, H. J. y Hopkins, R. L. (1972) Sulfur compounds in crude oil. Bulletin 659. U. S. Bureau of Mines, Washington, D. C.
- 3 Secretaría de Energía, México (<http://www.energia.gob.mx/wb/distribuidor.jsp?seccion=179>).
- 4 Manahan, S. E. (1993) Fundamentals of environmental chemistry. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- 5 Burke, M. (2003) Sulfur-free fuels mandated. *Environ. Sci. Technol.* 37(5):85A-86A.
- 6 Díaz Fernández, S. (2003) Mejorará calidad de combustible hasta el 2012. El Economista, 30 de Junio. (<http://www.economista.com.mx/pubinter4.nsf/0/EC426B221019A6D206256D5500605757?OpenDocument>).
- 7 Monticello, D. J. (1998) Riding the fossil fuel biodesulfurization wave. *CHEMTECH.* 28:38-45.
- 8 McFarland, B. L., Boron, D. J., Deever, W. R., Meyer, J. A., Johnson, A. R. y Atlas, R. M. (1998) Biocatalytic sulfur removal from fuels: applicability for producing low sulfur gasoline. *Critical Rev. Microbiol.* 24:99-147.
- 9 Monticello, D. J. (2000) Biodesulfurization and upgrading of petroleum distillates. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:540-546.
- 10 Kerr, R. A. (2000) USGS Optimistic on world oil prospects. *Science.* 289:237-238.
- 11 Monticello, D. J. y Finnerty, W. R. (1985) Microbial desulfurization of fossil fuels. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:371-389.
- 12 Bhadra, A., Scharer, J. M. y Moo-Young, M. (1987) Microbial desulphurization of heavy oils and bitumen. *Biotech. Adv.* 5:1-27.
- 13 Grossman, M. J., Lee, M. K., Prince, R. C., Garrett, K. K., George, G. N. y Pickering, I. J. (1999) Microbial desulfurization of a crude oil middle-distillate fraction: analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(1):181-188.
- 14 Speight, J. G. (1981) The desulfurization of heavy oils and residua. Marcel Dekker, New York, N. Y.
- 15 Aitani, A. M., Ali, M. F. y Al-Ali, H. H. (2000) A review of non-conventional methods for the desulfurization of residual fuel oil. *Petroleum Sci. Technol.* 18:537-553.
- 16 García, J. J., Mann, B. E., Adams, H., Bailey, N. A. y Maitlis, P. M. (1995) Equilibria of the thiametallacycles with tris(triethylphosphine)platinum(0) and dibenzothiophene, benzothiophene, or thiophene: the hydrodesulfurization reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 117:2179-2186.
- 17 Kabe, T., Ishihara, A. y Tajima, H. (1992) Hydrodesulfurization of sulfur-containing polyaromatic compounds in light oil. *Ind. Eng. Chem. Res.* 31:1577-1580.
- 18 Department of chemical engineering, Louisiana State University (<http://www.che.lsu.edu/COURSES/4205/2000/Mattson/HDS.htm>)
- 19 Premuzic, E. T., Lin, M. S., Bohenek, M. y Zhou W. M. (1999) Bioconversion reactions in asphaltenes and heavy crude oils. *Energy and Fuels.* 13:297-304.

- 20 McFarland, B. L. (1999) Biodesulfurization. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:257-264.
- 21 Monticello, D. J. (1993) Biocatalytic desulfurization of petroleum and middle distillates. *Environ. Progress.* 12(1):1-4.
- 22 Grossman, M. J., Lee, M. K., Prince, R. C., Garrett, K. K., George, G. N. y Pickering, I. J. (1999) Microbial desulfurization of a crude oil middle-distillate fraction: analysis of the extent of sulfur removal on remaining sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:181-188.
- 23 Izumi, Y. y Ohshiro, T. (2001) Purification and characterization of enzymes involved in desulfurization of dibenzothiophene in fossil fuels. *J. Mol. Cat. B Enzymatic.* 11:1061-1064.
- 24 Tinoco, R. y Vazquez-Duhalt, R. (1998). Chemical modification of cytochrome c improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme Microb. Technol.* 22:8-12.
- 25 García-Arellano, H., Valderrama, B., Saab-Rincón, G. y Vazquez-Duhalt, R. (2002) High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome c. *Bioconj. Chem.* 3:1336-1344.
- 26 Casella, L., Gulloti, M., Ghezzi, R., Poli, S., Beringhelli, T., Colonna, S. y Carrea, G. (1992) Mechanism of enantioselective oxygenation of sulfides catalyzed by chloroperoxidase and horseradish peroxidase. Spectral studies and characterization of enzyme-substrate complexes. *Biochemistry.* 31:9451-9459.
- 27 Colonna, S., Gaggero, N., Casella, L., Carrea, G. y Pasta P. (1992) Chloroperoxidase and hydrogen peroxide: an efficient system for enzymatic enantioselective sulfoxidations. *Tetrahedron: Asymm.* 3:95-106.
- 28 Pasta, P., Carrea, G., Monzani, E., Gaggero, N. y Colonna, S. (1999) Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidation of methyl phenyl sulfide with dihydroxyfumaric acid/oxygen or ascorbic acid/oxygen as oxidants. *Biotechnol. Bioeng.* 62:489-493.
- 29 Ayala, M., Tinoco, R., Hernandez, V., Bermauntz, P. y Vázquez-Duhalt, R. (1998). Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel Processing Technol.* 57:101-111.
- 30 Ayala, M., Robledo, N., López-Munguía, A. y Vazquez-Duhalt, R. (2000). Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase-catalyzed oxidation of diesel fuel. *Environ. Sci. Technol.* 34:2804-2809.
- 31 Morris, D. R. y Hager, L. P. (1966) Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 241(8):1763-1768.
- 32 Pickard, M. A. y Hashimoto, A. (1982) Isoenzymes of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Can. J. Microbiol.* 28:1382-1388.
- 33 Pickard, M. A. y Hashimoto, A. (1988) Stability and carbohydrate composition of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in a fructose-salts medium. *Can. J. Microbiol.* 34:998-1002.
- 34 Shaw, P. D., Beckwith, J. B. y Hager, L. P. (1959) II. The biosynthesis of δ -chlorolevulinic acid. *J. Biol. Chem.* 234(10):2560-2564.
- 35 Clutterbuck, P.W., Mukhopadhyaya, S. L., Oxford, A. E. y Raistrick, H. (1944) Studies in the biochemistry of micro-organisms. 65 (A) A survey of chlorine metabolism by moulds. (B) Caldariomycin, $C_5H_8O_2Cl_2$, a metabolic product of *Caldariomyces fumago* Woronichin. *Biochem. J.*, 34:664-677.
- 36 Shaw, P. D. y Hager, L. P. (1961) VI. Chloroperoxidase: a component of the β -keto adipate chlorinase system. *J. Biol. Chem.* 236(6):1626-1630.

- 37 Hager, L. P., Morris, D. R., Brow, F. S. y Eberwein, H. (1966). Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions. *J. Biol. Chem.* 241:1769-1777.
- 38 Thomas, J. A., Morris, D. R. y Hager, L. P. (1970) Chloroperoxidase VII: classical peroxidatic, catalytic and halogenating forms of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 245:3129-3134.
- 39 Franssen, M. C. R. (1994) Halogenation and oxidation reactions with haloperoxidases. *Biocatalysis.* 10:87-111.
- 40 Kedderis, G. K., Koop, D. R. y Hollenberg, P. F. (1980) N-demethylation reactions catalyzed by chloroperoxidase. *J. Biol. Chem.* 255(21):10174-10182.
- 41 Colonna, S., Gaggero, N. y Manfredi, A. (1990) Enantioselective oxidations of sulfides catalyzed by chloroperoxidase. *Biochemistry.* 29(46):10465-10468.
- 42 Corbett, M. D., Chipko, B. R. y Baden, D. G. (1978) Chloroperoxidase-catalysed oxidation of 4-chloroaniline to 4-chloronitrosobenze. *Biochem. J.* 175(2):353-360.
- 43 Corbett, M. D., Chipko, B. R. y Batchelor, A. O. (1980) The action of chloride peroxidase on 4-chloroaniline. N-oxidation and ring halogenation. *Biochem. J.* 187(3):893-903.
- 44 Geigert, J., Lee, T. D., Dalietos, D. J., Hirano, D. S. y Neidleman, S. L. (1986) Epoxidation of alkenes by chloroperoxidase catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136(2):778-782.
- 45 Colonna, S., Gaggero, N., Casella, L., Carrea, G. y Pasta, P. (1993) Enantioselective epoxidation of styrene derivatives by chloroperoxidase catalysis. *Tetrahedron: Asymm.* 4(6):1325-1330.
- 46 Allain, E. J. y Hager, L. P. (1993) Highly enantioselective epoxidation of disubstituted alkenes with hydrogen peroxide catalyzed by chloroperoxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 115(10):4415-4416.
- 47 Dexter, A. F., Lakner, F. J., Campbell, R. A. y Hager, L. P. (1995) Highly enantioselective epoxidation of 1,1-disubstituted alkenes catalyzed by chloroperoxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 117(23):6412-6413.
- 48 Zaks, A. y Dodds, D. R. (1995) Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric oxidations: substrate specificity and mechanistic study. *J. Am. Chem. Soc.* 117(42):10419-10424.
- 49 Miller, V. P., Tschirret-Guth, R. A. y Ortiz de Montellano, P. R. (1995) Chloroperoxidase-catalyzed benzylic hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 319(2):333-340.
- 50 Geigert, J., Dalietos, D. J., Neidleman, S. L., Lee, T. D. y Wadsworth, J. (1983) Peroxide oxidation of primary alcohols to aldehydes by chloroperoxidase catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114(3):1104-1108.
- 51 Corbett, M. D. y Chipko, B. R. (1979) Peroxide oxidation of indole to oxindole by chloroperoxidase catalysis. *Biochem. J.* 183:269-276.
- 52 Ayala Aceves, M. (2002) Obtención y caracterización de cristales catalíticos de cloroperoxidasa. Tesis Doctoral. Instituto de Biotecnología, UNAM. México.
- 53 Everse, J. (1998) The structure of heme proteins Compound I and II: some misconceptions. *Free Rad. Biol. Med.* 24:1338-1346.
- 54 Yamada, H., Itoh, N. e Izumi, Y. (1985) Chloroperoxidase-catalyzed halogenation of trans-cinnamic acid and its derivatives. *J. Biol. Chem.* 260(2):11962-11969.
- 55 Wagenknecht, H. A. y Woggon, W. D. (1997) Identification of intermediates on the catalytic cycle of chloroperoxidase. *Chem. Biol.* 4(5):367-372.
- 56 Sundaramoorthy, M., Turner, J. y Poulos, T. L. (1998) Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies. *Chem. Biol.* 5(9):461-473.

- 57 Sundaramoorthy, M., Terner, J. y Poulos, T. L. (1995) The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure*. 3:1367-1377.
- 58 van Deurzen, M. P. J. (1996) Selective oxidations catalyzed by chloroperoxidase. Thesis Delft University of Technology. The Netherlands.
- 59 Fedorak, P. M., Semple, K. M., Vazquez-Duhalt, R. y Westlake, D. W. S. (1993) Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb. Technol.* 15:429-437.
- 60 Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S. y Fedorak, P. M. (1994) Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:459-466.
- 61 Hammel, K. E., Kalyanaraman, B. y Kirk, T. K. (1986) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261(36):16948-16952.
- 62 Haemmerli, S. D., Leisola, M. S., Sanglard, D. y Fiechter, A. (1986) Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. Veratryl alcohol and stability of ligninase. *J. Biol. Chem.* 261(15):6900-6903.
- 63 Masaphy, S., Levanon, D., Henis, Y., Venkateswarlu, K. y Kelly, S. L. (1995) Microsomal and cytosolic cytochrome P450 mediated benzo-(a)pyrene hydroxylation in *Pleurotus plumonarius*. *Biotechnol. Letters*. 17:969-974.
- 64 Klyachko, N. L. y Klibanov, A. M. (1992) Oxidation of dibenzothiophene catalyzed by hemoglobin and other hemoproteins in various aqueous-organic media. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 37:53-68.
- 65 Ortiz-Leon, M., Velasco, L. y Vazquez-Duhalt, R. (1995) Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by hemoglobin and hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215(3):968-973.
- 66 Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S. y Fedorak, P. M. (1993) Cytochrome c as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. *Enzyme Microb. Technol.* 15:494-499.
- 67 Vazquez-Duhalt, R., Semple, K. M., Westlake, D. W. S. y Fedorak, P. M. (1993) Effect of water-miscible organic solventes on the catalytic activity of cytochrome c. *Enzyme Microb. Technol.* 15:936-943.
- 68 Vazquez-Duhalt, R., Bremauntz, P. Barzana, E. y Tinoco, R. (2002) Enzymatic oxidation process for desulfurization of fossil fuels. US Patent No. 6,461,859.
- 69 Borgstrom, B. y Brockman, H. L. (1984) Lipases. Elsevier, Amsterdam.
- 70 Gunsalus, I. C., Meeks, J., Lipscomb, J., Debrunner, P. y Munck, E. (1974) Molecular mechanisms of oxygen activation (Hayaishi, O., ed.), Academic Press, New York, N. Y. pp. 561-614.
- 71 Dordick, J. S. (1989) Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 11:194-211.
- 72 Zaks, A. y Klibanov, A. M. (1988) The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* 263(17):8017-8021.
- 73 Zaks, A. y Klibanov, A. M. (1985) Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82(10):3192-3196.
- 74 Laane, C., Boeren, S., Vos, K. y Veeger C. (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 30:81-87.

- 75 Khmelnitsky, Y. L., Levashov, A. V., Klyachko, N. L. y Martinek, K. (1988) Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microbiol. Technol.* 10:710-724.
- 76 Yennawar, H. P., Yennawar, N. H. y Farber, G. K. (1995) A structural explanation for enzyme memory in nonaqueous solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 117(2):577-585.
- 77 Klibanov, A. M. (1997) Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *TIBTECH.* 15:97-101.
- 78 Desai, U. R. y Klibanov, A. M. (1995) Assessing the structural integrity of a lyophilized protein in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 117(14):3940-3945.
- 79 Burke, P. A., Griffin, R. G. y Klibanov, A. M. (1992) Solid-state NMR assessment of enzyme active center structure under nonaqueous conditions. *J. Biol. Chem.* 267(28):20057-20064.
- 80 Gorman, L. S. y Dordick, J. S. (1992) Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 39:392-397.
- 81 Ryu, K. y Dordick, J. S. (1992) How do organic solvents affect peroxidase structure and function? *Biochemistry.* 31(9):2588-2598.
- 82 Michels, P. C., Dordick, J. S. y Clark, D. S. (1997) Dipole formation and solvent electrostriction in subtilisin catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 119(49):9331-9335.
- 83 Arnold, F. H. (1990) Engineering enzymes for non-aqueous solvents. *TIBTECH.* 8:244-249.
- 84 Sears, P., Schuster, M., Wang, P., Witte, K. y Wong C-H. (1994) Engineering subtilisin for peptide coupling: studies on the effects of counterions and site-specific modifications on the stability and specificity of the enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* 116(15):6521-6530.
- 85 Rich, J. O. y Dordick, J. S. (1997) Controlling subtilisin activity and selectivity in organic media by imprinting with nucleophilic substrates. *J. Am. Chem. Soc.* 119(14):3245-3252.
- 86 Blackwood, A. D., Curran, L. J., Moore, B. D. y Halling, P. J. (1994) 'Organic phase buffers' control biocatalyst activity independent of initial aqueous pH. *Biochim. Biophys. Acta.* 1206(2):161-165.
- 87 Almarsson, O. y Klibanov, A. M. (1996) Remarkable activation of enzymes in nonaqueous media by denaturing organic cosolvents. *Biotechnol. Bioeng.* 49(1):87-92.
- 88 Ru, M. T., Dordick, J. S., Reimer, J. A. y Clark, D. S. (1999) Optimizing the salt-induced activation of enzymes in organic solvents: Effects of lyophilization time and water content. *Biotechnol. Bioeng.* 63(2):233-241.
- 89 Khmelnitsky, Y. L., Welch, S. H., Clark, D. S. y Dordick, J. S. (1994) Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 116(6):2647-2648.
- 90 Guo, Y. y Clark, D. S. (2001) Activation of enzymes for nonaqueous biocatalysis by denaturing concentrations of urea. *Biochim. Biophys. Acta.* 1546:406-411.
- 91 Backes, W. L., Cawley, G., Eyer, C. S., Means, M., Causey, K. M. y Canady, W. J. (1993) Aromatic hydrocarbon binding to cytochrome P450 and other enzyme binding sites: are hydrophobic compounds drawn into the active site or pushed from the aqueous phase? *Arch. Biochem. Biophys.* 304(1):27-37.
- 92 Khatishashvili, G., Gordeziani, M., Kvesitadze, G. y Korte, F. (1997) Plant monooxygenases: participation in xenobiotic oxidation. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 36(2):118-122.

- 93 Satoh, K., Sato, R., Takahata, T., Suzuki, S., Hayakari, M., Tsuchida, S. y Hayatama, I. (1999) Quantitative differences in the active-site hydrophobicity of five human glutathione S-transferase isoenzymes: water-soluble carcinogen-selective properties of the neoplastic GSTP1-1 species. *Arch. Biochem. Biophys.* 361(2):271-276.
- 94 Torres, E., Tinoco, R. y Vazquez-Duhalt, R. (1996). Solvent hydrophobicity predicts biocatalytic behavior of lignin peroxidase and cytochrome c in aqueous solution of water-miscible organic solvents. *J Biotechnol.* 49:59-67.
- 95 Wangikar, P. P., Rich, J. O., Clark, D. S. y Dordick, J. S. (1995) Probing enzymic transition state hydrophobicities. *Biochemistry.* 34:12302-12310.
- 96 Dordick, J. S. (1992) Designing enzymes for use in organic solvents. *Biotechnol. Prog.* 8(4):259-267.
- 97 Vazquez-Duhalt, R., Fedorak, P. M. y Westlake, D. W. S. (1992). Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 14:837-841.
- 98 Chapman, A. P. (2002) PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:531-545.
- 99 Mehvar, R. (2000) Modulation of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of proteins by polyethylene glycol conjugation. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 3(1):125-136.
- 100 Lundblad, R. L. (1995). Techniques in protein modification. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 101 Veronese, F. M. (2001) Peptide and protein pegylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials.* 22:405-417.
- 102 Roberts, M. J., Bentley, M. D. y Harris, J. M. (2002) Chemistry for peptide and protein pegylation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:459-476.
- 103 Harris, J. M. (1992). Poly(ethylene glycol) chemistry. Biotechnical and biomedical applications. Plenum Press, New, York, N. Y.
- 104 Garcia, D., Ortega, F. y Marti, J. L. (1998) Kinetics of thermal inactivation of horseradish peroxidase: stabilizing effect of methoxypoly(ethylenglycol). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27:49-54.
- 105 Wang, P., Woodward, C. A. y Kaufman, E. N. (1999) Poly(ethylene glycol)-modified ligninase enhances pentachlorophenol biodegradation in water-solvent mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 64(3):290-297.
- 106 Wang, P., Sergeeva, M. V., Lim, L. y Dordick, J. S. (1997). Biocatalytic plastics as active and stable materials for biotransformations. *Nature Biotechnol.* 15:789-793.
- 107 Yang, Z. W. D. y Russell, A. J. (1995) Synthesis of protein-containing polymers in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 45:10-17.
- 108 Wood, L. L., Hartdegen F. J. y Hahn, P. A. (1982). Preparation and use of enzymes bound to polyurethane, US Patent 4,312,946; Enzymes bound to polyurethane, US Patent 4,342,834.
- 109 Alhakawati, M. S., Blanks, C. J. y Smallman, D. (2003). Evaluation of two types of polyurethane for the immobilisation of *Rhizopus oryzae* for copper uptake. *Water Sci. Technol.* 47(9):143-150.
- 110 van de Velde, F., Bakker, M., van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A. (2001). Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidations in hydrophobic organic media. *Biotechnol. Bioeng.* 72(5):523-529.
- 111 Raihan, S., Ahmed, N., Macaskie, L. E. y Lloyd, J. R. (1997) Immobilisation of whole bacterial cells for anaerobic biotransformations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:352-357.

- 112 LeJeune, K. E., Mesiano, A. J., Bower, S. B., Grimsley, J. K., Wild, J. R. y Russell, A. J. (1997) Dramatically stabilized phosphotriesterase-polymers for nerve agent degradation. *Biotechnol. Bioeng.* 54(2):105-114.
- 113 Bakker, M., van de Velde, F., van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A. (2000). Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams. *Biotechnol. Bioeng.* 70(3):342-348.
- 114 van de Velde, F., Lourenço, N. D., Bakker, M., van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A. (2000). Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 69(3):286-291.
- 115 van de Velde, F., Bakker, M., van Rantwijk, F., Rai, G. P., Hager, L. P. y Sheldon, R. A. (2001) Engineering chloroperoxidase for activity and stability. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 11:765-769.
- 116 Andersson, M., Samra, M. B., Holmberg, H. y Adlercreutz, P. (1999). Use of celite-immobilised chloroperoxidase in predominantly organic media. *Biocat. Biotrans.* 17:293-303.
- 117 Ryu, K., Heo, J. y Yoo Ik-K. (2002). Removal of dibenzothiophene and its oxidized product in anhydrous water-immiscible organic solvents by immobilized cytochrome c. *Biotechnol. Letters.* 24:143-146.
- 118 Reslow, M., Aldercreutz, P. y Mattiasson. B. (1988) On the importance of the support material for bioorganic synthesis. Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media. *Eur. J. Biochem.* 172:573-578.
- 119 Benson, J. R. y Hare, P. E. (1975) o-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:619-622.
- 120 Libby, R. D., Rotberg, N. S., Emerson, J. T., White, T. C., Yen, G. M., Friedman, S. H., Sun, N. S. y Goldowski, R. (1989) The chloride-activated peroxidation of catechol as a mechanistic probe of chloroperoxidase reactions. *J. Biol. Chem.* 264(26):15284-15292.
- 121 Hollenberg, P. F. y Hager, L. P. (1973) The P-450 nature of carbon monoxide complex of ferrous chloroperoxidase. *J. Biol. Chem.* 248(7):2630-2633.
- 122 Blanke, S. R., Martinis, S. A., Sligar, S. G. y Hager, L. P. (1996) Probing the heme iron coordination structure of alkaline chloroperoxidase. *Biochemistry.* 35(46):14537-14543.
- 123 Yamada, H., Imoto, T., Fujita, K., Okazaki, K. y Motomura, M. (1981) Selective modification of aspartic acid-101 in lysozyme by carbodiimide reaction. *Biochemistry.* 20(17):4836-4842.
- 124 Poulos, T. L. y Kraut, J. (1980) The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J. Biol. Chem.* 255(17):8199-8205.
- 125 Yi, X., Conesa, A., Punt, P. J. y Hager, L. P. (2003) Examining the role of glutamic acid 183 in chloroperoxidase catalysis. *J. Biol. Chem.* 278(16):13855-13859.
- 126 Conesa, A., van de Velde, F., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A., van den Hondel, C. A. M. J. J. y Punt, P. J. (2001) Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *J. Biol. Chem.* 276:17635-17640.
- 127 Liu, W., Kumar, J., Tripathy, S., Senecal, K. J. y Samuelson, L. (1999). Enzymatically synthesized conducting polyaniline. *J. Am. Chem. Soc.* 121:71-78.