



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DISEÑO DE UN BIOCATALIZADOR ACTIVO EN  
PRESENCIA DE SOLVENTES POLARES EMPLEANDO  
PEROXIDASAS**

**T E S I S**

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

**P R E S E N T A**

**I.B.Q. BERENICE TRUJILLO MARTÍNEZ**

**ASESOR: DRA. MARCELA AYALA ACEVES**



Cuernavaca, Morelos

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Marcela Ayala Aceves en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Los estudios de maestría fueron posibles gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).**

**DEDICO ESTE TRABAJO,**

*A mi familia, mis padres Martha y Servando, por el apoyo incondicional que me han brindado todo este tiempo, mi hermano Josue, por los momentos que hemos compartido.*

*A mis abuelos, porque sé que siempre han estado conmigo.*

## **AGRADEZCO,**

*A la Dra. Marcela Ayala Aceves por la asesoría, confianza y apoyo en la realización de este trabajo.*

*Al Dr. Rafael Vazquez Duhalt por permitirme ser parte de su grupo de trabajo.*

*A mi comité tutorial:*

*Dra. Marcela Ayala Aceves*

*Dr. Edmundo Castillo Rosales*

*Dr. Eduardo Torres Ramírez*

*Por sus consejos y participación crítica durante el desarrollo de este trabajo.*

*Al Dr. Edmundo Castillo, por su participación y ayuda siempre valiosa.*

*A la Biol. Rosa Román por su amistad y apoyo técnico, además de que es parte importante en el desarrollo de muchos proyectos*

*A la Dra. Lucía Perezgasga por el apoyo técnico y sus críticas constructivas.*

*A mis grandes amigas Alejandra y Sara, que se han vuelto parte de mi familia por la hermosa amistad creada y los gratos momentos que hemos pasado juntas.*

*A los colombianos por haberme brindado su amistad en todo este tiempo, en especial a Edna Lorena.*

*A los compañeros del laboratorio: Abraham, Cris T, Cris U, Edna, Javi, Julio y Lore, por los buenos momentos y el apoyo en el trabajo.*

*A todos aquellos de que alguna manera contribuyeron en el desarrollo del trabajo.*

*Agradezco el apoyo del proyecto CONACYT 56718 para la asistencia al XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería de la SMBB.*

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. Peroxidasas: catalizadores versátiles.....	3
2.1.1. Peroxidasa versátil de <i>Bjerkandera adusta</i> .....	6
2.1.2. Cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i> .....	8
2.2. Catálisis en solventes orgánicos.....	10
2.2.1. Ingeniería de solventes .....	14
2.2.1.1. Aplicación del coeficiente de actividad termodinámico ( $\gamma_s$ ) .....	16
2.3. Inmovilización de peroxidasas .....	19
2.3.1. Materiales mesoporosos .....	21
2.3.1.1. Mesoporosos de carbono .....	26
3. JUSTIFICACION .....	28
4. HIPÓTESIS .....	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1. Objetivo general.....	30
5.2. Objetivos particulares .....	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
6.1. Materiales .....	31
6.2. Métodos .....	31
6.2.1. Actividad específica LiP y MnP (Enzima soluble).....	31
6.2.2. Actividad específica de CPO (Enzima soluble).....	32
6.2.3. Actividad de enzima inmovilizada (CPO) .....	32

6.2.4. Determinación de proteína .....	33
6.2.5. Determinación de la estabilidad en presencia de solventes orgánicos (enzima soluble). .....	33
6.2.6. Determinación del coeficiente de actividad termodinámica ( $\gamma$ ).....	33
6.2.7. Inmovilización de CPO en los mesoporos de carbono .....	34
6.2.8. Derivatización de los mesoporos .....	34
6.2.9. Determinación cualitativa de grupos funcionales amino .....	35
6.2.10. Estimación cuantitativa de grupos funcionales carboxilo .....	35
6.2.11. Estimación cuantitativa de ácido benzoico .....	35
6.2.12. Determinación de la estabilidad térmica y estabilidad en presencia de solventes orgánicos del biocatalizador obtenido. ....	35
7. RESULTADOS Y DISCUSION .....	37
7.1. Ingeniería del biocatalizador: inmovilización de CPO .....	37
7.2. Ingeniería de solventes basada en el coeficiente de actividad termodinámica. ....	47
8. CONCLUSIONES .....	61
9. PERSPECTIVAS.....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo catalítico clásico de las hemoperoxidasas.....	5
Figura 2. Papel de los residuos de la cavidad del hemo en la formación del Compuesto I.....	6
Figura 3. Ciclo catalítico de la VP, adaptado a su naturaleza bifuncional.....	8
Figura 4. Ciclo catalítico de la CPO .....	10
Figura 5. Diámetro de poro promedio de los mesoporosos de carbono.....	38
Figura 6. Proceso de inmovilización de CPO y derivatización del soporte.....	39
Figura 7. Mecanismo de reacción de la carbodiimida.....	41
Figura 8. Reacción con fluorescamina para la determinación de grupos amino disponibles.....	41
Figura 9. Presencia de grupos carboxílicos en la superficie de la CPO.....	44
Figura 10. Estabilidad térmica y constantes de inactivación ( $k_i$ ) del biocatalizador y de la enzima soluble a 40, 50 y 60 °C.....	45
Figura 11. Estabilidad del biocatalizador y la enzima soluble en presencia de t-butanol a 20 y 40%. .....	47
Figura 12. Correlación entre los valores obtenidos de $\gamma_S$ experimental y $\gamma_S$ teóricos a partir del programa COSMOtherm para el sustrato tioanisol. ....	49
Figura 13. Correlación de la solubilidad de ciertos pesticidas calculados a partir del programa COSMOtherm con la solubilidad calculada de manera experimental. ....	50
Figura 14. Presencia del sustrato en el mecanismo catalítico de la peroxidasa versátil (izquierda) y la cloroperoxidasa (derecha) .....	51
Figura 15. Efecto del sustrato sobre la actividad de la VP en presencia de solvente.....	54



<b>Figura 16. Relación entre los cocientes de <math>k_{cat}/K_M</math> y los cocientes de <math>\gamma</math> para la reacción de oxidación de tioanisol en mezclas de solventes que promueven la estabilidad de CPO.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 17. Relación entre los cocientes de <math>k_{cat}/K_M</math> y los cocientes de <math>\gamma</math> para la reacción de oxidación de tioanisol en mezclas de solventes que promueven la estabilidad de CPO, sin THF.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 18. Efecto de la inmovilización de la CPO y la posterior derivatización del soporte sobre la partición del sustrato .....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hemoperoxidasas de origen no animal.....	4
Tabla 2. Ventajas y desventajas de la catálisis en solventes orgánicos .....	12
Tabla 3. Catálisis enzimática de peroxidasas en medios con solventes orgánicos .....	13
Tabla 4. Inmovilización covalente y por adsorción de CPO .....	23
Tabla 5. Materiales mesoporosos empleados en la inmovilización de proteínas..	25
Tabla 6. Coeficiente de extinción molar de 9MA.....	32
Tabla 7. Coeficiente de extinción molar de tioanisol en diferentes mezclas de agua-solvente .....	32
Tabla 8. Tratamiento de oxidación de mesoporosos de carbono .....	40
Tabla 9. Cantidad de ácido benzoico unido .....	42
Tabla 10. Cantidad de ácido benzoico unido por interacciones inespecíficas .....	43
Tabla 11. Efecto de la inmovilización y posterior derivatización del soporte sobre la actividad de CPO (140.6 nmol CPO/g soporte) .....	44
Tabla 12. Energía de inactivación para la enzima soluble e inmovilizada.....	46
Tabla 13. Constantes de inactivación para la CPO soluble e inmovilizada a diferentes concentraciones de tert-butanol.....	47
Tabla 14a. Coeficiente de actividad termodinámica del sustrato 9-MA.....	48
Tabla 14b. Coeficiente de actividad termodinámica del sustrato tioanisol.....	49
Tabla 15. $k_{cat}/K_M$ para VP con el sustrato 9MA en 20% solvente .....	52
Tabla 16. Cocientes de $(k_{cat}/K_M)_B/(k_{cat}/K_M)_A$ y $\gamma_B/\gamma_A$ para la VP .....	53
Tabla 17. $k_{cat}/K_M$ para la CPO con el sustrato tioanisol a diferentes concentraciones de solvente. ....	54
Tabla 18. Cocientes $(k_{cat}/K_M)_B/(k_{cat}/K_M)_A$ y $\gamma_B/\gamma_A$ para la CPO.....	55

<b>Tabla 19. Constantes de inactivación y actividad residual de la CPO en diferentes mezclas de solvente-agua. ....</b>	<b>56</b>
<b>Tabla 20. Efecto de la inmovilización y posterior derivatización del soporte sobre la actividad de CPO (140.6 nmol CPO/g soporte) .....</b>	<b>59</b>

## ABREVIATURAS

<b>ACN</b>	<b>Acetonitrilo</b>
<b>CPO</b>	<b>Cloroperoxidasa</b>
$\Delta G^{\text{tr}}_{\text{E}}, \Delta G^{\text{tr}}_{\text{ES}}, \Delta G^{\text{tr}}_{\text{S}}$	<b>Energía libre de transferencia de la enzima, complejo enzima sustrato, sustrato.</b>
$\Delta G_{\text{A}}, \Delta G_{\text{B}}$	<b>Energía libre de activación</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimetilsulfóxido</b>
$E_{\text{T}}$	<b>Parámetro de Dimroth-Reichart</b>
<b>EtOH</b>	<b>Etanol</b>
$\gamma_{\text{S}}$	<b>Coeficiente de actividad termodinámica del sustrato</b>
<b>HRP</b>	<b>Peroxidasa de rábano blanco</b>
<b>i-PROP</b>	<b>iso-Propanol</b>
<b>LiP</b>	<b>Lignino peroxidasa</b>
<b>Log P</b>	<b>Coeficiente de partición octanol-agua</b>
<b>9-MA</b>	<b>9-Metilantraceno</b>
<b>MnP</b>	<b>Manganeso peroxidasa</b>
<b>S</b>	<b>Solubilidad</b>
<b>THF</b>	<b>Tetrahidrofurano</b>
<b>t-BUT</b>	<b>tert-Butanol</b>
$V_{\text{m}}$	<b>Volumen molar</b>
<b>VP</b>	<b>Peroxidasa versátil</b>

**Materiales mesoporosos por sus siglas en inglés.**

<b>Al-MCM</b>	<b>Aluminum-substituted Mobil Crystalline Materials</b>
<b>Al-SBA</b>	<b>Aluminum-substituted Santa Bárbara Material</b>
<b>CMK</b>	<b>Mesoporous Carbon Materials</b>
<b>CNS</b>	<b>Cyano-modified Silica</b>
<b>COS</b>	<b>Commercial Kieselgel Silica</b>
<b>FDU</b>	<b>Serie Fudan University</b>

<b>FSM</b>	<b>Folded Sheet Mesoporous</b>
<b>MAS</b>	<b>Mesoporous Aluminosilicates</b>
<b>MCF</b>	<b>Mesostructured Cellular Foam</b>
<b>MCM</b>	<b>Mobil Crystalline Materials</b>
<b>MPS</b>	<b>Mesoporous Pure Silica</b>
<b>MPS-F127</b>	<b>Mesoporous Pure Silica with non-ionic triblock Pluronic F127 as surfactant</b>
<b>MSCF</b>	<b>Mesocellular Silica Carbon Foam</b>
<b>MSN</b>	<b>Mesoporous Silica Nanoparticles</b>
<b>MSU-FC</b>	<b>Mesocellular Carbon Foam</b>
<b>PMO</b>	<b>Periodic Mesoporous Organosilica</b>
<b>PMO-PA</b>	<b>Periodic Mesoporous Organosilica with propyl amine groups</b>
<b>SBA</b>	<b>Santa Bárbara Material</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Las hemoperoxidasas son un tipo de enzimas oxidoreductasas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Emplean al peróxido de hidrógeno, un oxidante económico, para catalizar la oxidación de diferentes sustratos generando subproductos no tóxicos (agua o alcoholes), confiriéndoles un gran potencial para desarrollar procesos a nivel industrial. Dos de las peroxidadas más versátiles que se conocen son la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*, presentando actividad de halogenasa, peroxidasa, catalasa y peroxigenasa (Sundaramoorthy *et.al.*, 1998); y la peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta*, que presenta actividad de lignino y manganeso peroxidasa (Camarero *et.al.*, 1999); ambas son capaces de oxidar diferentes compuestos en presencia de solventes orgánicos (Wang *et.al.*, 2003; van Deurzen *et.al.*, 1997).

Actualmente, la catálisis en solventes orgánicos se presenta como una opción para llevar a cabo una serie de reacciones cuya catálisis no es favorecida en un medio acuoso, por ejemplo, al emplear sustratos hidrófobos. Sin embargo, a pesar de que el uso de medios no convencionales presenta ciertas ventajas, la presencia de solventes orgánicos afecta el comportamiento del catalizador por presentar problemas como una partición desfavorable del sustrato hacia la enzima, la inactivación y/o alteración de la estabilidad del catalizador; entre otras (Ryu & Dordick, 1992). Tales problemas pueden ser abordados a partir de dos herramientas diferentes como son la ingeniería del catalizador y la ingeniería del solvente. La primera se refiere a la modificación química o genética de la enzima para mejorar la estabilidad, y la ingeniería de solventes se basa en la selección del solvente más apropiado a partir de sus características físicoquímicas y termodinámicas (Serdakowski *et. al.*, 2008).

Por tal motivo, se pretende abordar el problema de la partición desfavorable del sustrato hacia la enzima por medio de la inmovilización de la enzima y la alteración del microambiente, junto con la ingeniería de solventes, para obtener un biocatalizador más

activo y estable y determinar el efecto de las propiedades termodinámicas del solvente sobre la biocatálisis.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Peroxidasas: catalizadores versátiles

Las peroxidasas catalizan la oxidación de una diversidad de sustratos orgánicos e inorgánicos acoplada a la reducción de peróxidos o hidroperóxidos, generando subproductos no tóxicos, confiriéndoles un potencial para ser utilizadas en procesos de biotransformación en la industria. La mayoría son enzimas relativamente estables, tanto intracelulares como extracelulares, y su nombre se deriva de la fuente (por ejemplo: peroxidasa de rábano blanco) o del sustrato a oxidar (lignino-, manganeso-, cloro-peroxidasa). Además, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Las peroxidasas llevan a cabo diferentes funciones biológicas como la síntesis de biomoléculas y la descomposición de peróxido de hidrógeno (van de Velde *et.al.*, 2001a), ya que pueden utilizar un amplio rango de sustratos en una diversidad de reacciones. Sus aplicaciones potenciales son la remoción de contaminantes fenólicos, decoloración de colorantes sintéticos, síntesis de polímeros, aplicaciones en la industria del papel, biosensores, kits de diagnóstico y análisis, inmunoensayos enzimáticos y últimamente la aplicación de peroxidasas fúngicas en la producción de biocombustibles (Hamid *et.al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de su enorme potencial, su aplicación industrial se ve limitada por la baja disponibilidad y estabilidad operacional.

Basados en su centro activo específico, las peroxidasas pueden ser clasificadas en tres grupos: hemoperoxidasas, vanadioperoxidasas y peroxidasas no metálicas, siendo las dos últimas principalmente halogenasas. Las vanadiohaloperoxidasas tienen un ion vanadato como grupo prostético y principalmente se encuentran en ambientes marinos y las haloperoxidasas no metálicas únicamente son activas en la presencia de un amortiguador de acetato o propionato dando lugar a ácido peracético o perpropiónico (Littlechild 1999).

Por otro lado, las hemoperoxidasas de origen no animal tienen un peso molecular que varía entre 35 000 a 100 000 Da. Se clasifican en 3 clases



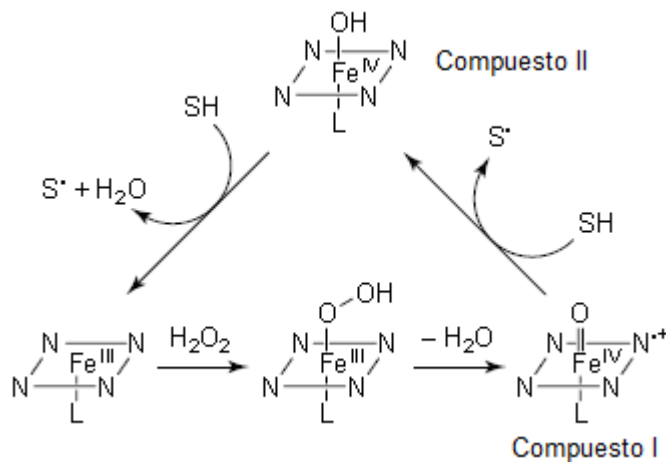
principalmente, dependiendo del organismo: a) clase I, peroxidases intracelulares de procariontes; b) clase II, peroxidases extracelulares fúngicas; y c) clase III, peroxidases de plantas (Tabla 1), cuyas secuencias de aminoácidos han propuesto un ancestro común, y a pesar del bajo porcentaje de homología entre sus secuencias (< 20%), el plegamiento general y la organización de la estructura secundaria se conserva (Welinder 1992). La estructura de las peroxidases esta constituida por 10-11  $\alpha$ -hélices unidas por giros y asas, mientras que las estructuras  $\beta$ -plegadas se encuentran en menor cantidad. A diferencia de las peroxidases clase I, en las clase II y III todos los residuos de cisteína (en diferentes posiciones) forman 4 puentes disulfuro, poseen dos sitios de unión a iones de calcio y la superficie de la proteína está glicosilada.

**Tabla 1. Hemoperoxidasas de origen no animal (van de Velde *et.al.*, 2001a)**

<b>HEMOPEROXIDASA</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>FUNCIÓN</b>
Cloroperoxidasa (CPO)	<i>Caldariomyces fumago</i>	Biosíntesis de caldariomicina
Citocromo c peroxidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Reducción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y oxidación de citocromo C
Peroxidasa de rábano (HRP)	<i>Armocracia rusticana</i>	Biosíntesis de hormonas de plantas
Peroxidasa versátil (PV)	<i>Bjerkandera adusta</i>	Oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos sin la presencia de Mn <sup>+2</sup>
Lignino peroxidasa (LiP)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Degradación de lignina
Manganeso peroxidasa (Mn)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Degradación de lignina mediante el agente redox Mn <sup>+2</sup>

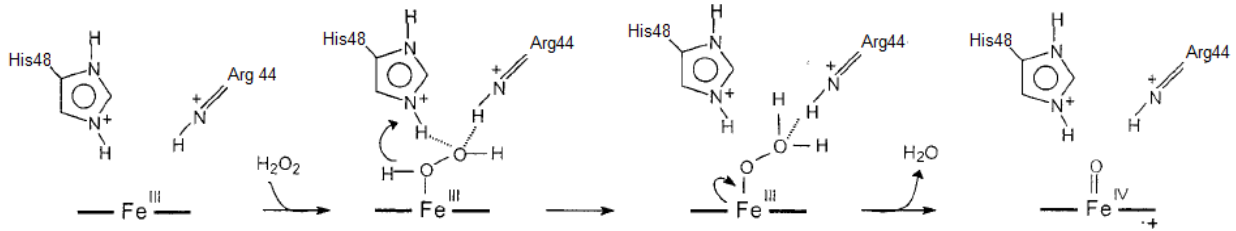
Las hemoperoxidasas son enzimas que contienen un grupo hierro-porfirina como grupo prostético. En el estado nativo de la enzima, el ion hierro tiene un estado de oxidación III y esta pentacoordinado con cuatro nitrógenos del anillo pirrólico del hemo y un nitrógeno de una histidina axial, llamada también histidina proximal, en la mayoría de los casos. La sexta coordinación del hierro está libre. El grupo hemo es el sitio catalítico que interviene en las diversas reacciones llevadas a cabo por las peroxidases, principalmente deshidrogenación, halogenación oxidativa, transferencia de oxígeno y descomposición del peróxido (van de Velde *et.al.*, 2001a). El ciclo catalítico clásico para las hemoperoxidasas (Figura 1), que involucra la oxidación de dos moléculas de

sustrato, comienza con la reacción de una molécula de peróxido con el sitio activo, donde los residuos de aminoácidos cercanos al hemo facilitan la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno, dando lugar a la formación de un enlace dativo entre el oxígeno y el Fe(III) del grupo hemo y un radical libre deslocalizado en la porfirina (Compuesto I - CI). Posteriormente este intermediario oxida una molécula de sustrato donadora de un electrón para formar el Compuesto II (CII), generando la reducción del radical de la porfirina y liberando un radical libre. Finalmente el CII se reduce por una segunda molécula de sustrato, regenerando el estado del Fe(IV) a Fe(III), produciendo otro radical libre y dando lugar a la enzima en su estado nativo (Everse 1998).



**Figura 1. Ciclo catalítico clásico de las hemoperoxidasas (van de Velde *et.al.*, 2001a)**

El sitio de interacción con el peróxido se caracteriza por la presencia de dos aminoácidos que no varían entre hemoperoxidasas, la histidina y la arginina distal, dando lugar a una cavidad hidrofílica (Figura 2). Dichos aminoácidos tienen un papel importante en la formación y estabilización del Compuesto I, ya que después de la entrada del peróxido, éste transfiere un protón a la histidina distal, mientras que el residuo de arginina estabiliza la carga que se forma con la unión del peróxido de hidrógeno (Banci 1997).



**Figura 2. Papel de los residuos de la cavidad del hemo en la formación del Compuesto I**

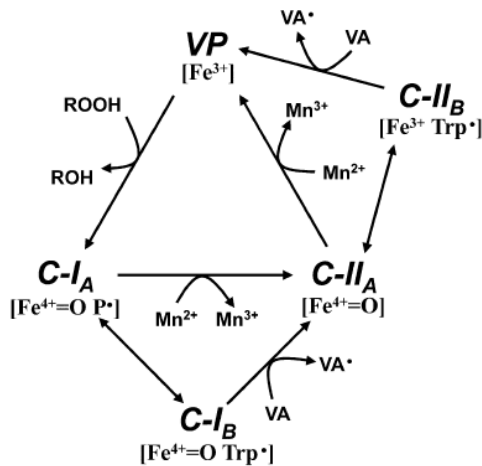
Para la mayoría de las hemoperoxidasas, después de la formación del compuesto I, el radical formado se localiza en la porfirina, sin embargo, en el caso de la peroxidasa versátil (VP) y de la lignino peroxidasa (LiP), dicho radical se transfiere a un residuo triptofanil localizado en la superficie de la enzima, el cual esta relacionado con la ruta de transferencia de electrones para la oxidación de sustratos de alto potencial redox (Perez-Boada *et.al.*, 2005).

### 2.1.1. Peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta*

La capacidad para degradar lignina esta limitada a un grupo de hongos ligninolíticos, denominados hongos de podredumbre blanca. La mayoría de los hongos ligninolíticos pertenecen al grupo *Basidiomycetes*, dichos hongos han desarrollado un sistema enzimático extracelular que es esencial para la transformación de la lignina. El sistema ligninolítico extracelular consiste principalmente en enzimas oxidativas: manganeso peroxidasa (MnP) que oxida el Mn(II) a la especie oxidante Mn(III), el cual actúa como un agente oxidante que difunde para oxidar compuestos que no tienen acceso al sitio activo (Wang *et.al.*, 2002); lignino peroxidasa (LiP) la cual es capaz de oxidar compuestos aromáticos de alto potencial redox; una fenol oxidasa denominada lacasa (Lac) que reduce el oxígeno molecular a agua, y a través la utilización de ciertos compuestos redox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina, y una peroxidasa versátil (VP) que es capaz de oxidar una amplia variedad de sustratos en presencia o ausencia de manganeso (Mester & Field, 1998).

La peroxidasa versátil es una hemoproteína glicosilada que conjuga las propiedades catalíticas de LiP y MnP (Mester & Field, 1998). Puede oxidar eficientemente Mn(II) a Mn(III) y llevar a cabo la actividad independiente de Mn en sustratos fenólicos y no fenólicos. La VP ha sido descrita para dos especies fúngicas, *Pleurotus* y *Bjerkandera*. Las enzimas reportadas son de *Pleurotus eryngii* (Heinfling *et.al.*, 1998a, 1998b; Ruiz-Duenas *et.al.*, 1999), *Pleurotus pulmonaris* (Camarero *et.al.*, 1996), *Pleurotus ostreatus* (Sarkar *et.al.*, 1997) y *Bjerkandera adusta* (Heinfling *et.al.*, 1998a; Mester *et.al.*, 1998; Wang *et. al.*, 2001, 2002). La VP es un híbrido estructural capaz de oxidar sustratos típicos de la LiP y MnP (Pogni *et.al.*, 2005), debido a que posee dos sitios de unión a sustrato, uno para la actividad dependiente de Mn (unión de  $Mn^{2+}$ ) formado por uno de los propionatos del hemo y los residuos ácidos Glu36, Glu40 y Asp 175, y otro para la actividad independiente de Mn, donde los sustratos se acercan al Trp 164 localizado en la superficie de la enzima y se oxidan mediante una ruta de transferencia de electrones (Moreira *et.al.*, 2005). La peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta* tiene alta identidad con la LiP (60%) y MnP (55%) ambas de *Phanerochaete chrysosporium*, y posee una ruta larga de transferencia de electrones similar a la postulada para LiP (Ayala *et.al.*, 2001), iniciando a través de un radical triptofanil.

El ciclo catalítico de la VP es similar al ciclo clásico de las peroxidases (Figura 3), pero incluye el compuesto I<sub>B</sub> que contiene un oxo-Fe IV=O y un radical triptófano (Trp·), y el compuesto II<sub>B</sub> que contiene un Fe III y un Trp· involucrado en la oxidación de compuestos aromáticos de alto potencial redox. Los compuestos I<sub>B</sub> y II<sub>B</sub> están presentes cuando la VP presenta actividad LiP, y los compuestos I<sub>A</sub> y II<sub>A</sub> se forman cuando la enzima presenta actividad MnP (Ruiz-Dueñas *et.al.*, 1999).



**Figura 3. Ciclo catalítico de la VP, adaptado a su naturaleza bifuncional (Ruiz-Dueñas *et.al.*, 1999)**

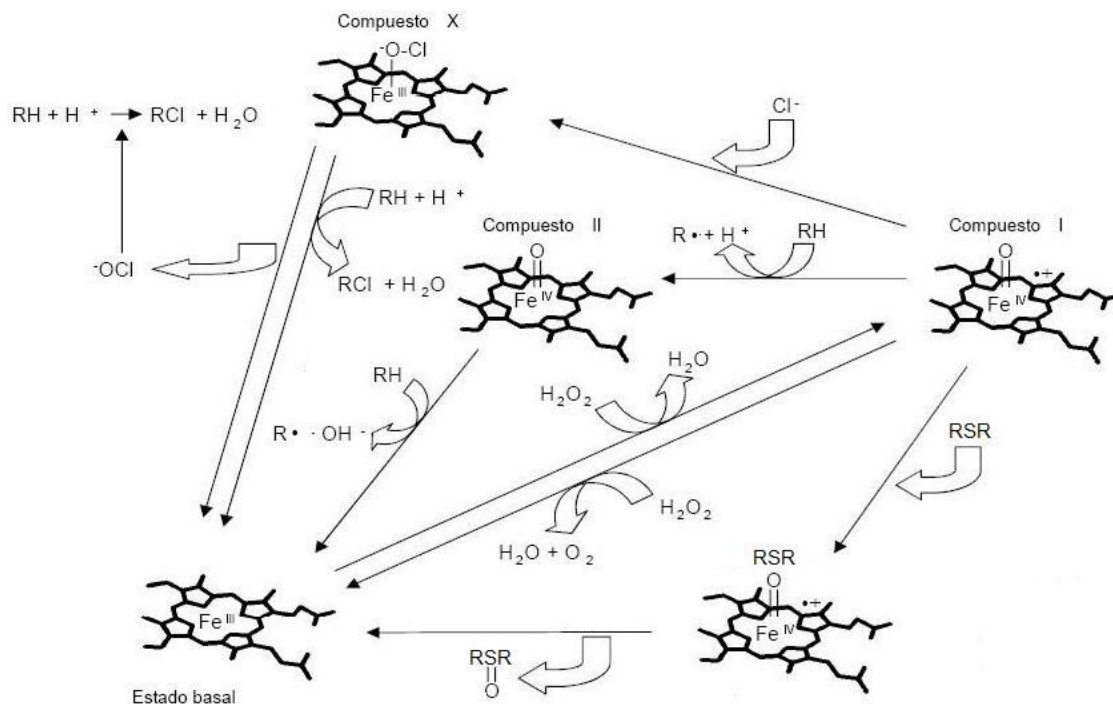
Para la VP de *Bjerkandera adusta*, el valor de pH óptimo para mostrar actividad manganeso peroxidasa, oxidación de Mn(II), es de 4.5, mientras que la actividad de lignino peroxidasa sobre sustratos aromáticos es a pH 3.0 (Wang *et.al.*, 2003).

### 2.1.2. Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*

Existen hemoperoxidasas capaces de oxidar haluros utilizando peróxido de hidrógeno, resultando en la halogenación de compuestos orgánicos. La mejor haloperoxidasa caracterizada es la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. Dicha enzima no muestra homología con las hemoperoxidasas y tiene un plegamiento único (Sundaramoorthy *et.al.*, 1995). El grupo prostético de la cloroperoxidasa es un ferriprotoporfirina IX y es una proteína monomérica. El ambiente del hemo es polar y a diferencia de la mayoría de las hemoperoxidasas, el ligando distal es un ácido glutámico y el ligando proximal una cisteína (Sundaramoorthy *et.al.*, 1995). Tiene un peso molecular alrededor de los 42000 Da, donde la composición de aminoácidos es principalmente de ácido aspártico, ácido glutámico, y residuos de serina y prolina (45% del contenido total). Es una glicoproteína donde aproximadamente 25-30% de la molécula son carbohidratos, siendo los mayores constituyentes glucosamina y arabinosa (Morris & Hager, 1966).

La cloroperoxidasa es una de las enzimas más versátiles porque presenta actividad tipo halogenasa (halogenación), peroxidasa (deshidrogenación), catalasa (descomposición del peróxido) y peroxigenasa (inserción de oxígeno), de ahí que puede modificar una amplia variedad de sustratos como alquenos, anilinas, bencilos, dicetonas cíclicas, ésteres fenólicos, fenoles, peróxidos orgánicos e inorgánicos, entre otros. Presenta la mayor actividad halogenasa utilizando el sustrato monoclorodimedona con una actividad específica mayor a 1000  $\mu\text{mol}/\text{mg min}$  (Franssen, 1994). El ciclo catalítico de la cloroperoxidasa comienza con la reacción de una molécula de peróxido en el sitio activo dando lugar a la formación del compuesto I, pero a diferencia de la mayoría de las hemoperoxidasas, el compuesto I puede seguir rutas diferentes a partir de éste: 1) formación del compuesto II mediante la oxidación de una molécula de sustrato, seguida por una segunda molécula de sustrato para regresar a su estado basal; 2) transferencia del átomo de oxígeno a una molécula de sustrato mediante la unión del sustrato al sitio activo cerca del hierro; 3) formación de oxígeno molecular y agua al reaccionar con una segunda molécula de peróxido; y 4) formación de un intermediario halogenante en presencia de iones haluro (Figura 4).

Aunque ambas enzimas descritas anteriormente son catalizadores muy versátiles, la principal limitante es lograr un biocatalizador que mantenga su actividad enzimática bajo condiciones de operación industriales (agitación, elevada temperatura, amplio rango de pH, etc.). Además, varios de los sustratos de las hemoperoxidasas son sustratos hidrofóbicos, por lo que se requiere la presencia de solventes orgánicos. Sin embargo, a pesar de su enorme potencial, las enzimas presentan una baja actividad y estabilidad operacional (Ryu *et.al.*, 1992).



**Figura 4. Ciclo catalítico de la CPO**

## 2.2. Catálisis en solventes orgánicos

En la industria química, las enzimas pueden ser utilizadas en procesos de biotransformación porque la cantidad y el tipo de reacciones que pueden ser catalizadas, así como la naturaleza química de los compuestos que pueden ser transformados es enorme (Ayala *et.al.*, 2004). Las enzimas son más eficientes que los catalizadores químicos por su alta especificidad, baja concentración de sustrato y condiciones de reacción suaves; además, el precio de una enzima al evaluar el producto terminado, resulta ser comparable con un catalizador químico. Una de las desventajas que presentan las enzimas, es que en procesos a gran escala, las condiciones de reacción como altas temperaturas, uso de solventes, pHs extremos, entre otros, afectan la estabilidad. Para afrontar tales situaciones, se cuenta con las modificaciones químicas y genéticas que mejoran tanto la estabilidad como la actividad de las enzimas, la ingeniería de solventes y la búsqueda de microorganismos extremófilos. En diversas industrias, como la del petróleo, se presentan sistemas no

acuoso, altas temperaturas y sustratos hidrofóbicos, los cuales son un reto para la aplicación de la catálisis enzimática, y su éxito depende del desarrollo de un biocatalizador adecuado para llevar a cabo las transformaciones.

Las mezclas de reacción conteniendo solventes orgánicos presentan una serie de ventajas: aumentan la transferencia de masa mediada por la concentración de sustrato, modifican la especificidad del sustrato, facilitan la recuperación de la enzima y disminuyen la contaminación microbiana, entre otros (Tabla 2). Algunas enzimas adquieren nuevas propiedades, comparadas con la catálisis en un medio acuoso, como el incremento en su estabilidad térmica o el cambio en la especificidad por los sustratos (Zaks & Klivanov, 1984; Zaks & Klivanov, 1986). Aunque es posible tener actividad enzimática en sistemas no acuoso o con un bajo contenido de agua (Klivanov, 2001), algunas enzimas presentan una disminución en su actividad, como el caso de la peroxidasa de rábano blanco en la oxidación del sustrato *p*-anisidina en dioxano, ya que al ir disminuyendo la cantidad de buffer de acetatos 10 mM pH 5.0 de 30 a 5% la actividad enzimática disminuye más de 15 veces (Dordick, 1989). La cantidad mínima de agua que se requiere para que una enzima mantenga su actividad catalítica, depende de cada enzima y del tipo de solvente utilizado. Por ejemplo, para el caso de las siguientes enzimas: alcohol oxidasa de levadura, polifenol oxidasa de hongo y alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo, la actividad incrementa al aumentar el contenido de agua en un medio con solvente orgánico (Zaks & Klivanov 1988), ya que se sabe que la adición de un solvente orgánico en agua, puede provocar una reducción en la actividad del agua, cambiando las propiedades fisicoquímicas del medio (Westcott *et.al.*, 1996).



**Tabla 2. Ventajas y desventajas de la catálisis en solventes orgánicos (Dordick, 1989)**

<b>VENTAJAS</b>	Catálisis de una amplia variedad de reacciones químicas que no pueden llevarse a cabo en medios acuosos. Afecta el equilibrio termodinámico favoreciendo las reacciones de síntesis sobre las de hidrólisis Altera la enantioselectividad, regioselectividad y en algunas ocasiones la estabilidad térmica de las enzimas Elimina las reacciones colaterales dependientes del agua Incrementa la solubilidad de sustratos no polares Fácil recuperación de la enzima por no ser soluble en solventes orgánicos Fácil recuperación del producto en solventes con bajo punto de ebullición Eliminación de la contaminación microbiana
<b>DESVENTAJAS</b>	Actividad limitada en la mayoría de los solventes orgánicos Pérdida de la estabilidad enzimática por la disrupción de las interacciones que mantienen la estructura de una proteína Rigidización de la estructura Limitaciones de transferencia de masa en el caso de sistemas heterogéneos o solventes viscosos El contenido de agua debe de ser controlado Aumento en los costos por la modificación covalente o no covalente del biocatalizador

A la fecha, se han hecho algunos estudios sobre la catálisis enzimática empleando peroxidasas en presencia de solventes orgánicos, sin embargo, en la mayoría de los casos, la actividad disminuye (Tabla 3).

**Tabla 3. Catálisis enzimática de peroxidasas en medios con solventes orgánicos**

ENZIMA	MEDIO DE REACCIÓN	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
Peroxidasa de rábano blanco (HRP)	Acetona Dimetilformamida Isopropanol	Actividad reducida 130, 140 y 260 veces en comparación con la reacción en buffer	Dai & Klibanov, 1999
HRP	Acetona Acetonitrilo Isopropanol	Oxidación de tioanisol con una actividad similar al agua con acetona y acetonitrilo. Mayor actividad con isopropanol, atribuido a la baja solubilidad del sustrato en agua.	Dai & Klibanov, 2000
Manganeso peroxidasa (MnP)	Acetona Metiletilcetona Metanol Etanol	Oxidación del antraceno. El orden de inactivación de la enzima fue: Metanol > etanol > metiletilcetona > acetona	Eibes <i>et al</i> , 2005
HRP	Dioxano Metanol Acetonitrilo	Actividad reducida hasta 4 órdenes de magnitud	Ryu & Dordick, 1992
CPO HRP Lactoperoxidasa	Tetrahidrofurano Acetonitrilo Isopropanol Etanol Metanol	El parámetro de hidrofobicidad (H) puede predecir el comportamiento catalítico de estas enzimas en sistemas con solventes orgánicos	Torres <i>et al</i> , 1998
Lignino peroxidasa (LiP) Citocromo C	Tetrahidrofurano Acetonitrilo Isopropanol Etanol Metanol	Un parámetro de hidrofobicidad bajo significa que la concentración de solvente a la cual se muestra actividad es mayor	Torres <i>et al</i> 1996
LiP	Isopropanol Acetonitrilo Tetrahidrofurano Dimetilformamida	Oxidación de pireno en el siguiente orden: Isopropanol > acetonitrilo > tetrahidrofurano > dimetilformamida	Vazquez-Duhalt <i>et al</i> , 1994
LiP	Solventes polares e hidrofóbicos	Mayor actividad con el sustrato dimetoxibencidina en glicoles y acetona Correlación con el parámetro de Dimroth-Reichardt ( $E_T$ ) y la actividad específica de LiP	Yoshida <i>et al</i> , 1997
MnP	Etilenglicol Dietilenglicol Acetona Acetonitrilo	Oxidación de Mn correlaciona con el parámetro $E_T$	Yoshida <i>et al</i> , 2000
Peroxidasa versátil (VP)	Acetonitrilo Dimetilsulfóxido Etanol n-Propanol	La velocidad de oxidación de Mn disminuye en el orden: ETOH>DMSO>Propanol>ACN	Rodakiewicz-Nowak <i>et al</i> , 2006
CPO	t-Butanol	Oxidación de tioanisol hasta concentraciones de 70% solvente. Reducción de actividad por aumento en la $k_m$	van Deurzen <i>et al</i> , 1997

Las formas en que el solvente puede afectar una enzima y causar su inactivación son las siguientes: 1) mediante la eliminación de las interacciones no covalentes: puentes de hidrógeno, van der Waals e hidrofóbicas, ya que se afecta la estructura terciaria de la proteína causando su desplegamiento; 2) mediante la penetración en la

proteína, lo que ocasiona una reducción de la polaridad del sitio activo; 3) afectando la constante dieléctrica, ya que disminuye la flexibilidad de la proteína y rigidiza su estructura (Dordick 1992); o bien, 4) alterando la interacción del sustrato con la enzima (partición del sustrato desfavorable hacia la enzima) (Klibanov 1997).

Los métodos empleados para manipular la actividad de las enzimas en solventes orgánicos se pueden dividir en 2 categorías, la ingeniería de solventes y la ingeniería del catalizador (Dordick, 1992).

### **2.2.1. Ingeniería de solventes**

A diferencia de las soluciones acuosas, la cantidad de solventes y mezclas de éstos que pueden ser usados para la catálisis enzimática es enorme. El solvente ideal es aquel que no provoca cambios estructurales en la enzima y no afecte su eficiencia catalítica. Por un lado, los solventes polares disminuyen la estabilidad termodinámica de los sustratos hidrofóbicos haciéndolos más disponibles para reaccionar con la enzima, pero pueden secuestrar con más facilidad las moléculas de agua unidas a la proteína, provocando que las interacciones electrostáticas sean más fuertes y por lo tanto disminuya la flexibilidad de la enzima. Por otro lado, los solventes hidrófobos no secuestran el agua “esencial” para la enzima pero aumentan la estabilidad termodinámica de sustratos hidrofóbicos (Dordick, 1992). Por lo que la elección del solvente involucra un compromiso entre la estabilidad operacional de la enzima y la estabilidad termodinámica del sustrato. Una solución puede ser el uso de cosolventes para favorecer la solubilidad sin reducir el poder catalítico de la enzima, teniendo en cuenta que, pequeñas cantidades de un solvente polar en uno hidrófobo, son lo suficiente para modificar la polaridad del solvente y por lo tanto las propiedades fisicoquímicas del medio de reacción (Klibanov, 2001).

De ésta manera, la ingeniería de solventes se enfoca en la selección del solvente más apropiado que favorezca la partición de sustrato hacia la enzima, no modifique la

estructura de la enzima, favorezca el equilibrio termodinámico de la reacción, que sea inerte y de bajo costo, entre otras (Serdakowski *et.al.*, 2008).

Las herramientas para abordar la ingeniería de solventes se basan en estudiar cómo afecta la identidad del solvente a las reacciones, principalmente sus características fisicoquímicas. Se han llevado a cabo diversos estudios en el desarrollo de parámetros para describir el comportamiento de los solventes (Castro & Knubovets, 2003). Estos incluyen el coeficiente de partición octanol-agua logP (Lanee *et.al.*, 1985); el parámetro de solubilidad de Hildebrand ( $\delta$ ); la constante dieléctrica, por ejemplo al emplearse para encontrar una correlación entre la actividad enzimática y la selectividad de una lipasa inmovilizada en presencia de diferentes solventes orgánicos (Catoni *et.al.*, 1995); el parámetro de hidrofobicidad (H), el cual se empleó para la predicción del comportamiento catalítico de enzimas como lignino peroxidasa, cloroperoxidasa, lactoperoxidasa y la proteína citocromo c en sistemas con solvente orgánico (Torres *et.al.*, 1996); el parámetro de polaridad del solvente, a partir de la energía de transición Dimroth-Reichardt  $E_T$  (Reichardt 1979), empleado para buscar una correlación entre la actividad LiP para la oxidación del sustrato dimetoxibencidina en más de 15 solventes (Yoshida *et.al.*, 1997) y el índice de polaridad (Gupta *et.al.*, 1997), entre otros. Sin embargo, con excepción de la constante dieléctrica, los parámetros anteriores fueron desarrollados empíricamente. Cada uno basado en una propiedad del solvente orgánico y a pesar de que tales valores nos facilitan la descripción del comportamiento de las enzimas en medios orgánicos, hasta ahora, ninguno de ellos es completamente predictivo, por lo que aún es necesario validar dichos parámetros usando diferentes modelos biocatalíticos.

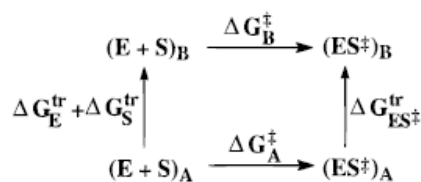
El coeficiente de actividad termodinámica de un soluto ( $\gamma_s$ ), es un parámetro que relaciona las interacciones entre el soluto y el(los) solvente(s), y se utiliza para calcular la actividad termodinámica del compuesto, la cual se refiere a la disponibilidad del sustrato para reaccionar (Torres *et.al.*, 1998).

En algunos casos, la disminución de la actividad enzimática al emplear solventes orgánicos se debe en su mayoría al efecto del solvente sobre el sustrato, es por eso que conociendo valores de  $\gamma_S$  se puede conocer algún efecto de partición del sustrato desfavorable hacia la enzima (Ryu *et.al.*, 1992; Torres *et.al.*, 1996; Schmitke *et.al.*, 1996).

### 2.2.1.1. Aplicación del coeficiente de actividad termodinámico ( $\gamma_S$ )

Uno de los trabajos más significativos en cuanto al uso del coeficiente de actividad termodinámica para estudiar la actividad de las enzimas en solventes orgánicos, es el de Schmitke y colaboradores (1996). En su trabajo, los autores evaluaron la caída drástica de actividad de la subtilisina Carlsberg al pasar de un estado soluble en medio acuoso, a un estado sólido (i.e. inmovilizado) en medio orgánico con bajo contenido de agua. Siguiendo un tratamiento sistemático para cuantificar cada uno de los factores que afectaron la actividad enzimática, propusieron un ciclo termodinámico para evaluar el efecto de la estabilización termodinámica que experimenta un sustrato hidrofóbico al estar disuelto en un solvente orgánico. Esta estabilización termodinámica provoca una partición desfavorable del sustrato desde el solvente hacia el sitio activo de la enzima, lo cual resulta en una menor actividad enzimática. La partición puede cuantificarse a través de los coeficientes de actividad termodinámica en solventes de diferente naturaleza. A continuación se describe el ciclo termodinámico.

La energía de desolvatación del sustrato es un aspecto determinante en la catálisis enzimática en presencia de solvente orgánico, ya que el efecto termodinámico que ejerce se muestra en la figura siguiente (Schmitke *et.al.*, 1996):



La flecha horizontal superior e inferior representa a la enzima (E) reaccionando con el sustrato (S) para formar el estado de transición (ES) en un solvente A y en un solvente B. Estas reacciones tienen asociadas una energía libre de activación:  $\Delta G_A$  y  $\Delta G_B$ , para el solvente A y B respectivamente. De forma equivalente, la partición de E, S y ES desde un solvente A a un solvente B tiene asociada una energía libre de transferencia. En el esquema,  $\Delta G_E^{tr}$ ,  $\Delta G_S^{tr}$ ,  $\Delta G_{ES}^{tr}$ , corresponden a la energía libre de transferencia de la enzima, del sustrato y del estado de transición desde el solvente A al solvente B. El ciclo termodinámico es definido por la siguiente ecuación, donde  $\Delta G_A$  está dada por la suma de todas las energías libre:

$$\Delta G_A = \Delta G_E^{tr} + \Delta G_S^{tr} + \Delta G_B - \Delta G_{ES}^{tr} \quad (1)$$

La relación entre el  $\Delta G$  y  $k_{cat}/K_m$ , esta definida por (Fersht, 2003):

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \left( \frac{kT}{h} \right) \exp\left( \frac{-\Delta G}{RT} \right) \quad (2)$$

Por lo tanto,  $\Delta G_A$  y  $\Delta G_B$  se pueden definir en base a la eficiencia catalítica de la enzima:

$$\Delta G_B = \Delta G_A = -RT \ln \left[ \left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right) \left( \frac{h}{kT} \right) \right] \quad (3)$$

Por otro lado,  $\Delta G_E^{tr}$ ,  $\Delta G_S^{tr}$ ,  $\Delta G_{ES}^{tr}$  se expresan en función de la actividad termodinámica de las especies en cada uno de los solventes. La actividad termodinámica (a) se relaciona con la disponibilidad de una molécula para poder interactuar con otras, teniendo el valor de 1 para un sustrato puro o en estado sólido. La actividad termodinámica es función del coeficiente de actividad termodinámica del sustrato ( $\gamma_S$ ) y de la fracción mol del mismo ( $X$ ;  $a = X\gamma_S$ ). A su vez, el coeficiente de actividad termodinámica del sustrato ( $\gamma_S$ ) es función de la solubilidad del sustrato en un solvente y del volumen molar de dicho solvente.

$$G = G^\circ + RT \ln a \quad \Delta G^{tr} = G_B - G_A \quad \Delta G^{tr} = RT \ln a_B - RT \ln a_A = RT \ln \left( \frac{a_B}{a_A} \right) \quad (4, 5, 6)$$

∴  $\Delta G_E^{tr}$ ,  $\Delta G_S^{tr}$ ,  $\Delta G_{ES}^{tr}$  se definen a partir de la actividad termodinámica de la enzima, del sustrato y del estado de transición enzima-sustrato, respectivamente, quedando:

$$\Delta G_S^{tr} = RT \ln a_{S \cdot B} - RT \ln a_{S \cdot A} = RT \ln \left( \frac{a_{S \cdot B}}{a_{S \cdot A}} \right) \quad (7)$$

$$\Delta G_E^{tr} = RT \ln a_{E \cdot B} - RT \ln a_{E \cdot A} = RT \ln \left( \frac{a_{E \cdot B}}{a_{E \cdot A}} \right) \quad (8)$$

$$\Delta G_{ES}^{tr} = RT \ln a_{ES \cdot B} - RT \ln a_{ES \cdot A} = RT \ln \left( \frac{a_{ES \cdot B}}{a_{ES \cdot A}} \right) \quad (9)$$

Considerando que la actividad termodinámica es función de  $\gamma_S$  y de la fracción mol X, y suponiendo que la fracción mol del sustrato es la misma en ambos solventes,  $\Delta G_S^{tr}$  queda definido a partir del coeficiente de actividad termodinámica del sustrato:

$$\Delta G_S^{tr} = RT \ln \left( \frac{\gamma_B}{\gamma_A} \right) \quad (10)$$

La ecuación general:

$$\therefore RT \ln \left[ \frac{(k_{cat}/K_M)_B}{(k_{cat}/K_M)_A} \right] = RT \ln \left( \frac{\gamma_B}{\gamma_A} \right) + RT \ln \left( \frac{a_{EB}}{a_{EA}} \right) - RT \ln \left( \frac{a_{ES \cdot B}}{a_{ES \cdot A}} \right) \quad (11)$$

Da como resultado el siguiente modelo:

$$\frac{(k_{cat}/K_M)_B}{(k_{cat}/K_M)_A} = \left( \frac{\gamma_B}{\gamma_A} \right) \left( \frac{a_{EB}}{a_{EA}} \right) \left( \frac{a_{ES \cdot A}}{a_{ES \cdot B}} \right) \quad (12)$$

Si el sustrato es completamente removido del solvente en el estado de transición,  $\Delta G_E^{tr}$  y  $\Delta G_{ES}^{tr}$  serán similares, por lo que cancelando dichos términos en la ecuación 1,  $\Delta G_A$  solo depende de  $\Delta G_B$  y  $\Delta G_S^{tr}$ , y el modelo se simplifica, reduciéndose a:

$$\frac{(k_{cat}/K_M)_B}{(k_{cat}/K_M)_A} = \left( \frac{\gamma_B}{\gamma_A} \right) \quad (13)$$

Aunque en el trabajo citado este modelo se utiliza para explicar la caída de actividad de la subtilisina al pasar de un medio acuoso a un medio orgánico, este modelo además proporciona una herramienta para predecir en que solvente (A ó B) se tendrá mayor actividad enzimática, considerando únicamente la interacción sustrato-solvente, dada por  $\gamma_S$  en cada solvente.

Este modelo fue desarrollado para una hidrolasa; sin embargo, cumpliéndose las suposiciones del modelo (i.e. que el sustrato se desolvata hacia el sitio activo de la enzima) podría generalizarse y aplicarse a otras enzimas, como las peroxidasas.

Las reacciones enzimáticas en solventes orgánicos proveen numerosas y atractivas ventajas industrialmente hablando, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la aplicación de las enzimas en medio orgánico es limitada debido a que la mayoría son menos activas y estables en presencia de solventes. Es por eso que se han desarrollado varios métodos para mejorar la actividad y/o la estabilidad para emplearlas en medios no convencionales, lo que se conoce como ingeniería del catalizador, la cual incluye la inmovilización en un soporte inerte como una herramienta para conferir ciertas ventajas como el aumento en la estabilidad y purificación de la enzima, y recuperación del producto.

### **2.3. Inmovilización de peroxidasas**

La ingeniería del catalizador se refiere a la modificación directa de la enzima a través de la ingeniería genética o por modificación química; o bien, a la alteración del microambiente para favorecer la actividad y estabilidad. Las herramientas para abordar la ingeniería del catalizador son: a) modificación química de residuos; por ejemplo, la modificación de enzimas añadiendo grupos anfipáticos como polietilenglicol, o derivados de  $\beta$ -ciclodextrinas; b) preparación del biocatalizador; por ejemplo, liofilización en presencia de aditivos; c) inmovilización a un soporte sólido; lo cual además de permitir la separación y reuso del biocatalizador, permite seleccionar el



microambiente más adecuado para la catálisis; y d) ingeniería de proteínas (Polizzi *et al.*, 2007), principalmente.

La inmovilización convierte a la enzima en un catalizador sólido recuperable y puede incrementar su tiempo de vida media operacional. Por lo que se han utilizado numerosos métodos para la inmovilización de enzimas con una amplia variedad de soportes orgánicos e inorgánicos. Algunas ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas son el aumento en la estabilidad y el reuso del biocatalizador, disminuyendo los costos. Sin embargo, los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son la alteración de la conformación de la enzima con respecto a su estado nativo, la pérdida de actividad en el proceso de inmovilización y el costo elevado del biocatalizador en comparación a la enzima soluble (Arroyo, 1998).

Las propiedades de una enzima inmovilizada, como la actividad catalítica o la estabilidad térmica, difieren de su forma soluble. Esto depende principalmente de las propiedades del soporte (composición química, grupos funcionales, porosidad, tamaño del poro, etc). El material del soporte es elegido con base en las propiedades de la enzima y las condiciones de reacción, ya que por el contrario se generan problemas de difusión. Por ejemplo, los sustratos hidrofóbicos no llegan con facilidad al sitio activo de una enzima inmovilizada en un soporte hidrofílico, afectando la afinidad de la enzima (Adlercreutz, 2006).

En general, los métodos de inmovilización se clasifican en 2 categorías que son: la retención física (no covalente) y la unión química (covalente). Entre los métodos de retención física, se encuentra el atrapamiento que consiste en la retención de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida principalmente de polímeros y tiene la ventaja de que la enzima no sufre alguna alteración en su estructura; y la inclusión en membranas por microencapsulación, donde las enzimas se rodean de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima (Arroyo, 1998).

En la unión covalente, la elección del soporte y del tipo de enlace resulta determinante para el comportamiento del biocatalizador. Ésta unión, se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. Los aminoácidos más reactivos son: lisina, cisteína e histidina, y en menor grado metionina, triptófano, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes que varían en tamaño, porosidad, forma, etc. Se pueden clasificar en dos grupos: 1) inorgánicos y 2) orgánicos.

Los soportes inorgánicos pueden ser naturales (arcillas, sílice, piedra pómez, etc.) o manufacturados (vidrio poroso, vidrio no poroso, cerámica, gel de sílice, etc). Los soportes orgánicos se clasifican en naturales (celulosa, almidón, dextranos, alginatos, quitosano, colágeno, etc.) o sintéticos (poliolefinas, poliacrilatos, poliamidas, etc.)

En el caso de la inmovilización de peroxidasas, se han utilizado soportes orgánicos e inorgánicos. De estos últimos, se han empleado perlas de vidrio, materiales a base de sílica y celita, entre otros. Actualmente se ha reportado la inmovilización de la cloroperoxidasa (CPO) por adsorción física empleando diferentes soportes como los materiales mesoporosos MCM48, Al-MCM14, SBA15, SBA16 (Han *et.al.*, 2002; Aburto *et.al.*, 2005; Montiel *et.al.*, 2007; Térres *et.al.*, 2008), talco (Aoun *et.al.*, 1998) y celita (Andersson *et.al.*, 1999); ó de manera covalente con poliuretano (Bakker *et.al.*, 2000), vidrio con grupos aminopropil (Kadima & Pickard, 1990), SBA16 (Aburto *et.al.*, 2005), sílica gel (Petri *et.al.*, 2004) y membranas de quitosano (Zhang *et.al.*, 2009), entre otras. En la tabla 4 se muestra un resumen del tipo de trabajos que se pueden encontrar reportados en la literatura. En la siguiente sección se discutirán los silicatos mesoporosos, que son soportes reportados para la inmovilización de la CPO, por ser atractivos por su disponibilidad y fácil preparación.

### **2.3.1. Materiales mesoporosos**

En general, los materiales mesoporosos tienen una estructura de poro determinada con dimensiones similares a las de muchas biomoléculas. Han sido extensamente

explorados como soportes para proteínas y enzimas en aplicaciones de la biocatálisis. En la actualidad existen diferentes métodos de síntesis para controlar de manera precisa el tamaño y estructura del poro, el tamaño de partícula, la composición química, y estabilidad, permitiendo así, que una amplia variedad de macromoléculas biológicas puedan emplearlos como soportes en aplicaciones biocatalíticas (Liang *et.al.*, 2008).

Las diferentes características de los mesoporosos dependen de sus propiedades individuales, por ejemplo, el grado de cristalinidad, el diámetro del poro, el área de superficie, el volumen del poro, la química de la superficie, la forma y el tamaño de la partícula. A su vez, las propiedades fisicoquímicas de cada estructura dependen del surfactante usado, las condiciones de síntesis (pH, temperatura, concentraciones, agitación), el contenido de sales, los cosolventes, y los aditivos orgánicos, entre otros. Los surfactantes y aditivos se utilizan para desarrollar diferentes estructuras mesoporosas, por ejemplo, hexagonales, cúbicas, laminares, con diferentes tamaños de poro. En general, la estructura se define a partir de la organización de los cristales que sirven como templados para la formación de los mesoporosos (Hudson *et.al.*, 2008).

**Tabla 4. Inmovilización covalente y por adsorción de CPO (Adaptado de Longoria *et.al.*, 2010)**

SOPORTE	TAMAÑO DE PORO	CARGA DE ENZIMA (nmol proteína/g soporte)	ACTIVIDAD RETENIDA (%)	METODO DE INMOVILIZACIÓN	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
SBA-15 funcionalizado con ATS, GTS, GA-ATS	6.0 – 7.3 nm	5-10 U por 10 mg de enzima	6-7	Covalente	Mayor estabilidad al almacenamiento y a agentes oxidantes que la enzima soluble	Jung <i>et.al.</i> 2010
SBA-15	67 A 143 A	150.5 157.8	14 15	Adsorción	Menor estabilidad a temperatura que la enzima soluble	Montiel <i>et.al.</i> 2007
SBA-15 silanizado	67 A – s 143 A – s	68.5 172.2	65.5 20.6	Covalente	Menor estabilidad a temperatura que la enzima soluble	Montiel <i>et.al.</i> 2007
MCF	150 A	2905	52.2	Adsorción	Menor estabilidad a agentes desnaturizantes que la enzima soluble	Han <i>et.al.</i> 2002
SBA-16	40 A 90 A 40 A-Cs 90 A-Cs	0 23 59 50	0 5 24 11	Adsorción	Mayor estabilidad a agentes desnaturizantes	Aburto <i>et.al.</i> 2005
SBA-16	32 A	147	7	Covalente	Mayor estabilidad a agentes desnaturizantes	Aburto <i>et.al.</i> 2005
Sílica-gel	67 A	84.4	12.4	Adsorción	Menor estabilidad a la temperatura que la enzima soluble	Montiel <i>et.al.</i> 2007
Sílica-gel silanizado	67 A	41.5	52.4	Covalente	Menor estabilidad a temperatura que la enzima soluble	Montiel <i>et.al.</i> 2007
SBA-16	40 A 90 A 117 A	0 99 190	0 1.3 1	Adsorción	SBA-16-90: Mayor estabilidad a temperatura y solventes que la enzima soluble	Térres <i>et.al.</i> 2008
Al-MCM-41	26 A	246	1.7	Adsorción	Menor estabilidad a temperatura y solventes que la enzima soluble	Térres <i>et.al.</i> 2008
Espuma de poliuretano		47.6 571.4	100 54	Covalente	Biocatalizador reusable que no presenta desorción de la enzima.	Bakker <i>et.al.</i> 2000
Vidrio con grupos aminopropil				Covalente	Estabilidad similar a enzima soluble	Kadima <i>et.al.</i> 1990
Sílica gel		64	19.5	Covalente	Mayor estabilidad en función del pH y agentes oxidantes en comparación a la forma soluble	Petri <i>et.al.</i> 2004
Membranas de quitosano		75.7		Covalente	Mayor estabilidad a elevadas temperaturas, desnaturizantes	Zhang <i>et.al.</i> 2009

					químicos y oxidantes.	
Mesoporoso de sílica derivatizado	50 A 150 A 200 A	238 571.4 1309.5		Covalente	Aumento en la estabilidad a solvente y a la temperatura para el soporte con mayor tamaño de poro (200 A)	Borole <i>et.al.</i> 2004
Talco (hidrofóbico) Talco calcinado (hidrofílico)	No porosos	190.5 59.5	61-72 80-126	Adsorción	El carácter hidrofóbico o hidrofílico puede modificar la actividad catalítica de la enzima	Aoun <i>et.al.</i> 1998
Fibra de vidrio	No poroso	265 $\mu\text{mol}$ proteína / g soporte	> 90	Adsorción	La inmovilización en este soporte permite llevar a cabo reacciones en fase gas, manteniendo la actividad.	Tesis de maestría Julio César Cruz
Poli (etileno-co-metil-acrilato-co-glicidil-metacrilato)		37 $\mu\text{g}$ proteína / $\text{cm}^2$ (unión directa) 48 $\mu\text{g}$ proteína / $\text{cm}^2$ (con espaciador)	< 0.1	Covalente	La inmovilización a este soporte con o sin espaciador, inactiva a la enzima disminuyendo su actividad drásticamente.	Tesis de maestría Edna Lorena Hernández
Espuma de poliuretano			36.4	Covalente	La coinmovilización de la CPO y la glucosa oxidasa da como resultado una mayor estabilidad a concentraciones > 60% tert-butanol.	van de Velde, <i>et.al.</i> 2000
Espuma de poliuretano		390.5	10.6	Covalente	La velocidad inicial más elevada fue obtenida con los solventes más hidrofóbicos, sin embargo, la remoción de agua causa pérdida de actividad.	van de Velde, <i>et.al.</i> , 2001b
Red anfifílica (PHEA y PDMS)	No poroso		8.4	Atrapamiento	Incremento en la actividad y estabilidad operacional en comparación con la enzima nativa.	Bruns <i>et.al.</i> 2005
Espuma mesocelular	Poroso			Atrapamiento	Los agregados entrecruzados de CPO	Jung <i>et.al.</i> 2009

La aplicación de los mesoporosos para la inmovilización de las proteínas se basa en ser un soporte donde se mantiene la actividad catalítica de las enzimas mejorando su estabilidad, recuperación y reuso. En la actualidad, numerosos soportes se han empleado para la inmovilización de enzimas (Tabla 5). La selección adecuada del material mesoporoso para la inmovilización de una proteína involucra propiedades fisicoquímicas del soporte compatibles con las de la superficie de la proteína. Una característica clave para la selección del soporte es el tamaño de poro, ya que si la proteína es muy pequeña, habrá una mayor área de superficie interna, y por el contrario, si la proteína es grande, se adsorberá únicamente en la superficie del material. Un ejemplo es la baja inmovilización de la peroxidasa de rábano blanco en un mesoporoso MCM-41 con un tamaño de poro de 4 nm, por que el tamaño de poro del soporte era menor que el de la proteína (Díaz & Balkus, 1996).

**Tabla 5. Materiales mesoporosos empleados en la inmovilización de proteínas. (Tomado de Hudson *et.al.*, 2008)**

PROTEINA	P <sub>i</sub>	TAMAÑO (nm)	SOPORTE MESOPOROSO	TAMAÑO DE PORO (nm)
Citocromo c	10.7	2.6x3.2x3.3	MCM-41, COS, CNS, MPS-F127, MAS-9, AI-MCM-41, AI-MCM-48, PMO	2.5-13
Microperoxidasa	4.1	3.3x1.75	PMO, MCM-41, SBA-15	2.7-5.5
Peroxidasa de rábano blanco	7.2	4.0x4.4x6.8	MCM-41, SBA-15, CNS, FSM-16	2.7-13
Cloroperoxidasa	4.0	6.5	SBA-16, MCF, SBA-15, MCM-48, PMO-PA	3-14
Manganeso peroxidasa	-	-	FSM-16	3-9
Mioglobina	7.1	17.6	FDU-12, SBA-15, MCF	3.8-24
Metmioglobina	-	17.6	FSM-16, FSM-22	2.7-4
Hemoglobina	6.7-8	5.3x5.4x6.5	SBA-15, FSM	3-10
Citocromo P450 CYP2C9	-	9.0	MCM-41, AI-MCM-41	4-5
Citocromo P450 CYP2B4	-	5.2	MCM-41, AI-MCM-41	4-5
Glucosa oxidasa	4.6	7.0x5.5x8.0	MCF, CMK, MSCF, FMS, MSU-FC	17-34, 3.9 (5.6, 21)

Las enzimas son moléculas que pueden ser adsorbidas en los materiales mesoporosos por diferentes interacciones electrostáticas, hidrofóbicas/hidrofílicas y covalentes con diferentes niveles de estabilidad, actividad y reuso. La máxima cantidad de enzima adsorbida en un material mesoporoso varía con el pH, la fuerza iónica, el

diámetro del poro, el volumen del poro, las características de la superficie, el punto isoeléctrico, la morfología y tamaño de partícula, y las condiciones de adsorción. Además para que una enzima inmovilizada sea útil en biocatálisis, debe ser capaz de reutilizarse, manteniendo a la enzima después de los lavados con agua y buffers. Por lo cual se han hecho diversos esfuerzos por crear materiales mesoporosos con grupos funcionales en la superficie para poder inmovilizar covalentemente las proteínas (Hudson *et.al.*, 2008).

### **2.3.1.1. Mesoporosos de carbono**

Los materiales porosos de carbono tienen diferentes aplicaciones como electrodos para baterías, celdas de combustible, supercapacitores, soportes para procesos catalíticos, entre otras, y esto se debe a que poseen ciertas propiedades físicas y químicas como la conductividad eléctrica, conductividad térmica, estabilidad química y baja densidad, además de una gran disponibilidad (Liang *et.al.*, 2008). Los materiales porosos de carbono son clasificados de acuerdo a su diámetro de poro: microporosos ( $x < 2$  nm), mesoporosos ( $2 \text{ nm} < x < 50$  nm) y macroporosos ( $x > 50$  nm). Los mesoporosos de carbono son obtenidos a partir de templados de mesoporosos de sílice, empleando una fuente de carbono, por ejemplo sacarosa (Jun *et.al.*, 2000), lo que les otorga grandes áreas de superficie específicas, grandes volúmenes de poro específicos, diámetro de poro uniforme, estabilidad a elevadas temperaturas y una aplicación potencial como adsorbentes de moléculas voluminosas. Sin embargo, la naturaleza hidrofóbica e inerte de los mesoporosos puede ser desfavorable para varias aplicaciones.

La modificación de la superficie o la funcionalización de los materiales de carbono afecta el carácter hidrofóbico o hidrofílico de la superficie, haciéndolos mejores adsorbentes. Se puede obtener una variedad de grupos funcionales, principalmente grupos carboxilo ( $\text{COO}^-$ ), oxidando la superficie por diversos agentes oxidantes como ácido nítrico, ácido sulfúrico, ozono, o persulfato de amonio. La modificación de la superficie con grupos  $\text{COO}^-$  haría la superficie activa para la inmovilización covalente de proteínas (Vinu *et.al.*, 2007).

La tecnología enzimática es una herramienta poderosa para producir biocatalizadores empleando peroxidasas, los cuales tienen un alto potencial para aplicarse en los procesos biotecnológicos. La inmovilización de peroxidasas en materiales orgánicos e inorgánicos aumenta la tolerancia de las enzimas a las condiciones que normalmente encontramos en los procesos industriales, como la presencia de solvente orgánico y altas temperaturas. No importando cual método se seleccione para la inmovilización (covalente o no covalente), y el soporte que se utilice (orgánico o inorgánico), las enzimas inmovilizadas muestran características propias que las hacen catalíticamente atractivos para una variedad de aplicaciones.



### 3. JUSTIFICACION

El uso de peroxidasas en solventes orgánicos se ve limitado porque en la mayoría de los casos la actividad catalítica de la enzima se ve disminuida, aún en presencia de bajas concentraciones de solvente orgánico (Dai *et.al.*1999). Entre los factores que pueden explicar esta caída de actividad, se ha sugerido que los solventes orgánicos afectan la eficiencia catalítica de algunas peroxidasas debido a un aumento en la  $K_m$  por la disminución de la interacción sustrato hidrofóbico-enzima (Ryu *et.al.* 1992). Aunque comúnmente se emplea la modificación química e inmovilización de peroxidasas para utilizarlas en presencia de solventes orgánicos, hay pocos estudios que se dediquen a cuantificar y discernir los diferentes eventos que provocan la baja actividad de estas enzimas en ese tipo de medios. Este trabajo se basa en la premisa de que las herramientas ingeniería del catalizador e ingeniería de solventes pueden ser aplicadas a los sistemas de peroxidasas en presencia de solventes miscibles en agua, con el fin de favorecer la partición del sustrato y obtener un biocatalizador más activo.

#### **4. HIPÓTESIS**

A través de la inmovilización de las enzimas a soportes derivatizados con grupos funcionales hidrófobos y la selección de un solvente que aumente la disponibilidad del sustrato hacia la enzima, será posible favorecer la partición del sustrato hacia la enzima y aumentar la actividad.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Generar sistemas (biocatalizadores + solventes) basados en peroxidasas que favorezcan la partición del sustrato en medios con solventes orgánicos polares.

### 5.2. Objetivos particulares

1. Inmovilizar a la(s) peroxidasa(s) (VP de *Bjerkandera adusta* y/o la CPO de *Caldariomyces fumago*) en un soporte: nylon, vidrio, mesoporosos de carbono, etc.
2. Derivatizar el soporte con grupos funcionales hidrófobos aromáticos.
3. Caracterizar los biocatalizadores generados (actividad específica), utilizando el sustrato modelo: 9-metilantraceno para la VP y tioanisol para la CPO.
4. Evaluar la estabilidad de los biocatalizadores a temperatura y solventes orgánicos.
5. Estudiar la influencia de la actividad termodinámica de los sustratos, a través de los coeficientes de actividad termodinámica, sobre la catálisis de las peroxidasas en mezclas agua-solvente.
6. Analizar el efecto de la derivatización del soporte sobre la partición del sustrato, a través de perfiles de actividad a diferentes concentraciones de solventes.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Materiales

Acetato de sodio, ácido succínico, ácido clorhídrico, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio, dimetilsulfóxido, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, isopropanol, sulfato de manganeso y tert-butanol se obtuvieron de J. T. Baker. Ácido benzoico, ácido malónico, alcohol veratrílico, bencilamina, N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidroclicorada, guaiacol, 1,6-hexandiamina, monoclorodimedona, 9-metilantraceno, perlas de vidrio activadas con grupos aminopropil, peróxido de hidrógeno, tioanisol y reactivo MES fueron provistos por Sigma-Aldrich. Acetonitrilo, ácido acético y tetrahidrofurano fueron provistos por Burdick-Jackson, Mallinckrodt y Fisher Chemical, respectivamente. Las membranas de nylon y el soporte Eupergit C, fueron provistos por Whatman y Röhm Pharma respectivamente. Los mesoporosos de carbono fueron provistos por el Dr. Eduardo Torres y el Dr. Eduardo Terrés (BUAP-IMP).

### 6.2. Métodos

#### 6.2.1. Actividad específica LiP y MnP (Enzima soluble)

Ensayo estándar: La actividad lignino peroxidasa se mide siguiendo la formación de veratrilo aldehído a  $\lambda=310$  nm ( $\epsilon_{310}=9300$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) durante la reacción con 4 mM alcohol veratrílico en amortiguador de succinatos 50 mM, pH 3.0 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4 mM. La actividad manganeso peroxidasa se mide monitoreando la formación del complejo malonato-Mn<sup>3+</sup> a  $\lambda=270$  nm ( $\epsilon=11590$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) en reacciones con 0.1 mM MnSO<sub>4</sub> y 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en amortiguador de malonatos 50 mM, pH 4.5.

Ensayo con sustrato modelo: La actividad lignino peroxidasa se evalúa siguiendo la desaparición de 9-metilantraceno a  $\lambda=368$  nm, durante la reacción con 50  $\mu$ M 9-metilantraceno en un medio con amortiguador de succinatos 50 mM, pH 3.0 en

presencia de acetonitrilo, tert-butanol, o bien, dimetilsulfóxido 20 ó 50% (Tabla 6); y 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Tabla 6. Coeficiente de extinción molar de 9MA**

9-Metilantraceno	Coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{368}$ ; M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )		
	ACN	DMSO	t-BUT
20%	7560	6911	8298
50%	6775	4428	6299

### 6.2.2. Actividad específica de CPO (Enzima soluble)

Ensayo estándar: La actividad halogenasa se mide siguiendo la desaparición de monoclorodimedona a  $\lambda=278$  nm ( $\epsilon_{278}=12200$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) en la reacción con 0.1 mM monoclorodimedona y 20 mM cloruro de potasio en amortiguador de acetatos 60 mM, pH 3.0, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ensayo con sustrato modelo: Se evalúa la actividad peroxigenasa siguiendo la desaparición de tioanisol a  $\lambda=254$  nm, durante la reacción con 100  $\mu$ M tioanisol en un amortiguador de fosfatos 60 mM, pH 6.0 en presencia de acetonitrilo 20%; tert-butanol 20 ó 40%; o bien, dimetilsulfóxido 20 ó 40% (Tabla 7); y 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Tabla 7. Coeficiente de extinción molar de tioanisol en diferentes mezclas de agua-solvente**

Tioanisol	Coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{254}$ ; M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )				
	ACN	DMSO	t-BUT	i-PROP	THF
20%	10380	10557	10409	9226	10150
40%	-	11256	10494	10326	-

### 6.2.3. Actividad de enzima inmovilizada (CPO)

Se evalúa de manera discontinua pero bajo las mismas condiciones de medición de actividad que la enzima soluble, manteniendo agitación constante para evitar la precipitación de la enzima inmovilizada en los mesoporosos de carbono.

#### 6.2.4. Determinación de proteína

Se estimó la concentración de proteína espectrofotométricamente basándose en el coeficiente de extinción de la VP a  $\lambda$  de 407 nm con un valor de  $77000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , y el de la CPO a  $\lambda$  de 403 nm con un valor de  $75300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### 6.2.5. Determinación de la estabilidad en presencia de solventes orgánicos (enzima soluble).

Peroxidasa versátil: Se incubó la enzima soluble a diferentes concentraciones de solvente: acetonitrilo, dimetilsulfóxido y tert-butanol; se mide la actividad lignino peroxidasa con el sustrato alcohol veratrílico en condiciones estándar en presencia de solvente, durante una hora a varios intervalos de tiempo.

Cloroperoxidasa: Se incubó la enzima soluble a diferentes concentraciones de solvente: acetonitrilo, dimetilsulfóxido, tert-butanol, iso-propanol y tetrahidrofurano; se mide la actividad específica con el sustrato guaiacol en condiciones estándar en presencia de solvente, durante una hora a varios intervalos de tiempo.

#### 6.2.6. Determinación del coeficiente de actividad termodinámica ( $\gamma$ )

Experimental: Se estima la solubilidad del sustrato (S) en las diferentes concentraciones de solventes (tert-butanol, acetonitrilo y dimetilsulfóxido) a partir de la absorbancia de una solución saturada, utilizando un coeficiente de extinción obtenido a partir de una curva estándar del mismo sustrato (tioanisol). Se estima el volumen molar de la mezcla ( $V_m$ ),  $V_m=(X_1M_1+X_2M_2)/\rho_T$  (Corradini *et.al.*, 1993; Valtz *et.al.*, 2004), donde  $\rho_T$  es la densidad de la mezcla (Tamura *et.al.*, 1997; Kim & Marsh *et.al.*, 1988),  $M_1$  es el peso molecular del agua,  $M_2$  es el peso molecular del solvente y  $X$  la fracción mol de cada uno respectivamente. El coeficiente de actividad termodinámica se calcula mediante la relación  $\gamma=1/SV_m$  (Schmitke *et.al.*, 1996).

Teórico: Haciendo uso del programa COSMOtherm, que combina aspectos de química cuántica y termodinámica estadística, se calculan los coeficientes de actividad termodinámica tomando en cuenta las interacciones entre el sustrato y el solvente.

### **6.2.7. Inmovilización de CPO en los mesoporosos de carbono**

Unión por grupos carboxilo (con espaciador): 10 mg de mesoporosos de carbono son activados con 600  $\mu$ L de una solución de persulfato de amonio (APS) 1.75M en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M por 24 h a temperatura ambiente y agitación continua, para la generación de grupos carboxilo. Posteriormente, se llevan a cabo lavados con agua para deshacerse del exceso de residuos de sulfato. Los mesoporosos de carbono con grupos COO<sup>-</sup>, se incuban con 3.5 mg de 1,6-hexandiamina (100x/grupo amino) y 5.7 mg de carbodiimida en 1 mL de amortiguador MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico) 50 mM, pH 5.0 durante 5 h a 25°C. Se mantiene el pH a 7.0. La preparación se lava con amortiguador MES 50 mM, pH 5.0. Para los experimentos considerando una cantidad de enzima en exceso, se incuban 0.5 mg de enzima, 0.57 mg de carbodiimida (10x/mol amino) con los mesoporosos de carbono con el espaciador hexandiamina, en 1 mL de amortiguador MES 50 mM, pH 5.0, por 5 h a 25°C. Para aquellos experimentos donde se controla la cantidad de enzima, se incuban 0.06 mg de enzima. Al finalizar el tratamiento, la preparación se lava con amortiguador de fosfatos 60 mM, pH 6.0 y mantenida en el mismo. La determinación de la cantidad de enzima inmovilizada se lleva a cabo espectrofotométricamente por medición indirecta del sobrenadante y los lavados.

### **6.2.8. Derivatización de los mesoporosos**

Considerando 10 mg de material mesoporoso inmovilizado con la enzima y grupos reactivos libres (amino), se mantiene un exceso de ácido benzoico (5x/grupo reactivo) y carbodiimida, y se incuban en 1 mL de amortiguador MES 50 mM, pH 5.0, por 5 h a 25°C. La preparación se lava con amortiguador de fosfatos 60 mM, pH 6.0 y mantenida en el mismo.

### **6.2.9. Determinación cualitativa de grupos funcionales amino**

La evaluación de grupos amino libres se llevó a cabo de manera cualitativa con la reacción de la fluorescamina (4-fenilespiro [furano-2(3H),1'-ftalina]-3,3'diona), el cual reacciona con las aminas primarias para dar lugar a la formación de un complejo fluorescente (Stocks *et.al.*, 1986).

### **6.2.10. Estimación cuantitativa de grupos funcionales carboxilo**

La cantidad de grupos carboxilo fue medida a partir de la interacción con azul de metileno. El soporte se coloca en una solución de azul de metileno 1mM a pH 7.0 (buffer de fosfatos 60 mM). A valores de pH neutros, el grupo carboxilo se encuentra cargado negativamente y puede formar interacciones electrostáticas con el azul de metileno cargado positivamente. Después de 2 h, el soporte se lava con buffer a pH 7.0 por 30 minutos, para remover el exceso de azul de metileno. Finalmente, la liberación de azul de metileno se lleva a cabo colocando el soporte en una solución ácida (pH 3.0). La cantidad de azul de metileno liberada es estimada por espectrofotometría a  $\lambda$  de 663 nm y es proporcional a la cantidad de grupos carboxílicos en el soporte (Peng *et.al.*, 2009).

### **6.2.11. Estimación cuantitativa de ácido benzoico**

Se estimó la concentración de ácido benzoico espectrofotométricamente con un coeficiente de extinción de  $0.0885 \text{ (mg/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a  $\lambda$  de 227 nm, mediante la diferencia de cantidad inicial y la remanente en solución después del proceso de derivatización.

### **6.2.12. Determinación de la estabilidad térmica y estabilidad en presencia de solventes orgánicos del biocatalizador obtenido.**



Estabilidad térmica: Se realiza incubando la enzima inmovilizada a una temperatura de 40, 50 y 60 °C en buffer de fosfatos pH 6.0. Posteriormente, se mide la actividad específica de manera discontinua con el sustrato guaiacol en condiciones estándar.

Estabilidad en solventes orgánicos: Se incuba la enzima inmovilizada en 20 y 40% de tert-butanol y se mide la actividad específica de manera discontinua con el sustrato monoclorodimedona en condiciones estándar.

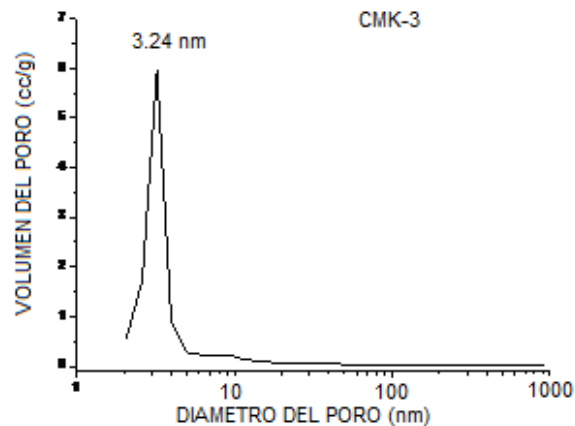
## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1. Ingeniería del biocatalizador: inmovilización de CPO

En este trabajo se inmovilizaron las enzimas VP y CPO en soportes inertes para favorecer su estabilidad en presencia de solventes orgánicos. Primeramente se llevó a cabo la inmovilización de las enzimas (VP y CPO) en los siguientes soportes: membranas de nylon, perlas de vidrio activadas con grupos amino propil y Eupergit C, que es un polímero de acrílico con grupos oxiranos, obteniendo una matriz hidrofílica con un ligero componente hidrofóbico. La cantidad de enzima inmovilizada en las membranas de nylon y con el soporte Eupergit C fue de 30 nmoles/membrana y 92 nmoles/g soporte respectivamente, valores bajos en comparación con los reportados en la tabla 4. Además, los resultados de actividad mostraron que en el caso de la VP, la actividad retenida después del proceso de inmovilización con el sustrato alcohol veratrílico en membranas de nylon fue de 0.9%, mientras que en las perlas de vidrio activadas con grupos amino propil fue de 3%. En el caso de la CPO, la inmovilización en el soporte Eupergit C, provocó una pérdida drástica de la actividad mostrando únicamente un 0.3% de la actividad halogenasa inicial con el sustrato monoclorodimedona. Estos resultados fueron menores que los reportados para la inmovilización covalente de las enzimas (Tabla 4), por lo que se eligió otra opción que no ha sido reportada en la literatura: inmovilización de CPO en mesoporosos de carbono.

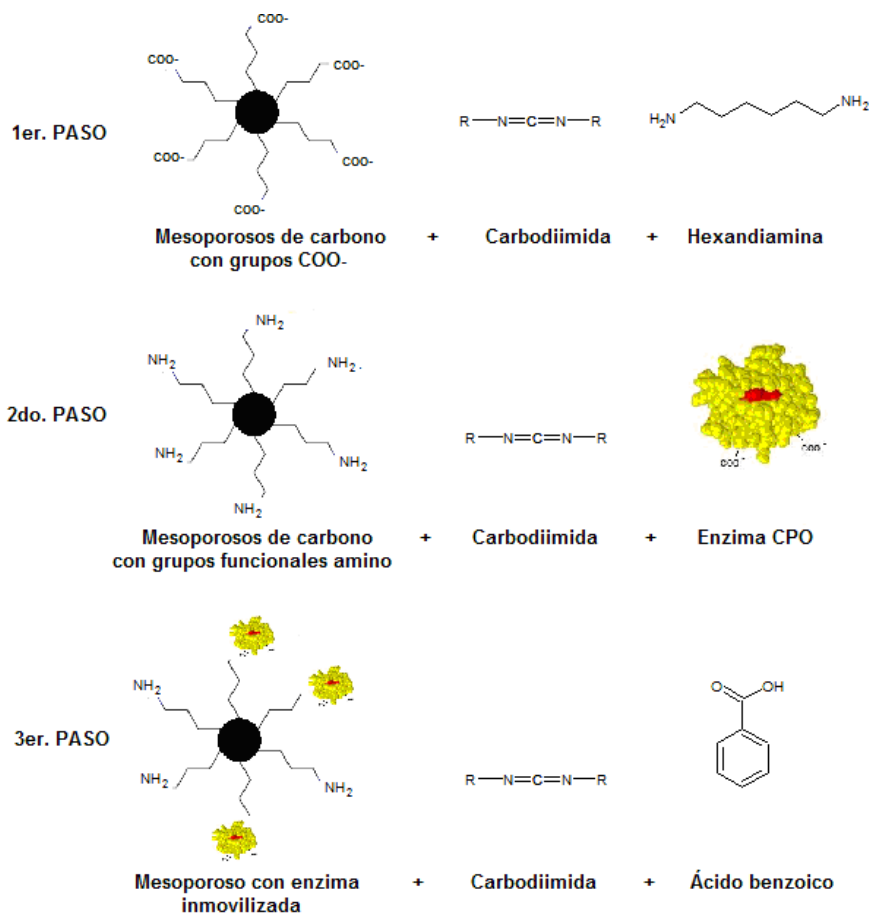
Hoy en día, los mesoporosos ofrecen una alternativa como soportes para la inmovilización de enzimas y su uso ya se ha reportado ampliamente (Hudson *et.al.*, 2008). Sin embargo, los mesoporosos de carbono son un soporte novedoso y nos permiten alterar su naturaleza hidrofóbica/hidrofílica mediante la modificación o funcionalización de la superficie. En este trabajo, se utilizaron los mesoporosos de carbono (CMK-3) como soporte para la inmovilización de la CPO. Puesto que el tamaño de poro promedio del soporte es de 3.24 nm (Figura 5, proporcionado por Térres &

Torres, IMP) y el tamaño de la enzima es de aproximadamente  $53\text{\AA} \times 46\text{\AA} \times 60\text{\AA}$ , lo más probable es que la unión se lleve a cabo en la superficie del material mesoporoso.



**Figura 5. Diámetro de poro promedio de los mesoporosos de carbono.**

La unión covalente requiere la presencia de grupos activados en el soporte para reaccionar con los grupos funcionales de las proteínas. La cloroperoxidasa posee 5 grupos amino primario y 37 grupos carboxilo en su secuencia, de los cuales 3 lisinas y 25 carboxilos se encuentran expuestos al solvente. Sin embargo, es difícil derivatizar los grupos amino de la CPO debido a que la enzima sufre una inactivación irreversible cuando se expone a un pH mayor a 7; las reacciones de nucleófilo comúnmente usadas para derivatizar grupos amino se llevan a cabo a un pH de entre 8 y 10. Por esta razón, se decidió generar grupos carboxilo en la superficie de los mesoporosos, introducir un espaciador con grupos amino en el extremo (1er paso), y posteriormente unir covalentemente a la enzima a través de los carboxilos superficiales, usando la química de la carbodiimida (2do paso). El proceso de inmovilización se encuentra esquematizado en la figura 6 y engloba la posterior derivatización del soporte para modificar el microambiente de la enzima y hacerlo más hidrofóbico (3er paso).



**Figura 6. Proceso de inmovilización de CPO y derivatización del soporte.**

Para el primer paso de funcionalización de los mesoporosos de carbono se llevó a cabo la oxidación de la superficie para dar lugar a la formación de grupos carboxilo y aldehído y así alterar la naturaleza hidrofóbica del soporte (Vinu *et.al.*, 2007). La presencia de grupos carboxilos después de la oxidación del soporte se evaluó espectrofotométricamente con azul de metileno para dos tratamientos diferentes: a 24 y 48 horas (Tabla 8). A pH neutro, los grupos carboxilo están cargados negativamente y puede formar interacciones electrostáticas con el azul de metileno cargado positivamente. Al pasar a pH ácido (pH 3.0) se libera el azul de metileno, siendo proporcional a la cantidad de carboxilos existentes (Peng *et.al.*, 2009). Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 8.

**Tabla 8. Tratamiento de oxidación de mesoporosos de carbono**

Tiempo de oxidación (h)	Cantidad de COO <sup>-</sup> (nmol/g)
24	163.1 ± 15
48	472.8 ± 43.5

Como se esperaba, al aumentar el tiempo de oxidación se incrementa el contenido de grupos carboxilo (~3 veces más), ya que se sabe que el tratamiento durante un tiempo mas prolongado promueve la conversión de los átomos de carbono superficiales a grupos ceto y después a carboxilo. Sin embargo, se ha reportado que el orden estructural de los mesoporosos de carbono se mantiene en un tratamiento de 24 h pero no de 48 h, ya que la funcionalización ocurre primeramente en la capa externa de las paredes del poro y se extiende lentamente hacia las capas internas hasta lograr la destrucción de la estructura mesoporosa (Vinu *et.al.*, 2007). Así que para comprobar lo anterior, se procedió a la unión de la enzima utilizando ambos soportes. Los resultados indicaron que aunque la cantidad de carboxilos fuera mayor para los mesoporosos oxidados en un tiempo de 48 h, no hubo inmovilización, comprobando de esta manera que el tratamiento daña la estructura del soporte. Por tal motivo, se decidió llevar a cabo el tratamiento de 24 h para la oxidación de los mesoporosos de carbono y la posterior inmovilización de la enzima.

La carbodiimida lleva a cabo una activación de los grupos carboxilo y forma un intermediario O-acil isourea (Figura 7) para posteriormente reaccionar con un nucleófilo (amina) y formar una amida. La hexandiamina se utilizó como nucleófilo para formar el espaciador entre el soporte y la enzima. La unión de dicho espaciador fue evaluada de manera cualitativa a partir de la reacción con fluorescamina, ya que la presencia de aminas primarias da lugar a la formación de un complejo fluorescente.

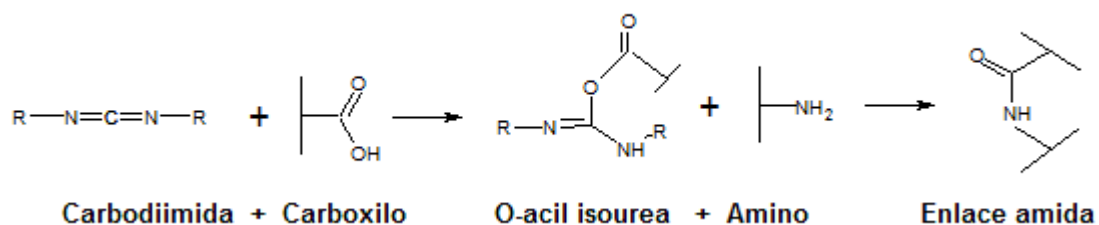


Figura 7. Mecanismo de reacción de la carbodiimida

Como se observa en la figura 8, la única reacción que mostró fluorescencia es el mesoporoso con el espaciador hexandiamina (Cuadro 3), lo que nos indica la presencia de grupos amino disponibles.

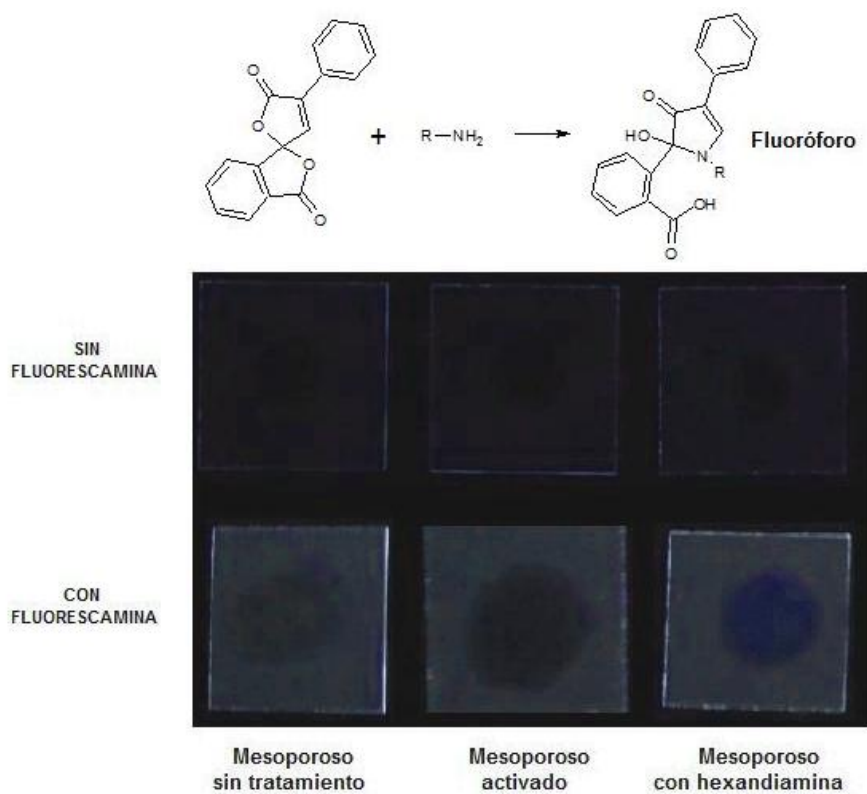


Figura 8. Reacción con fluorescamina para la determinación de grupos amino disponibles.

Habiendo comprobado la presencia de grupos amino, se llevó a cabo el proceso de inmovilización en presencia de una cantidad de enzima tal que permitiera obtener una carga enzimática máxima de 5% (5 g de enzima/100 g soporte), el cual es un valor alto de acuerdo a la literatura. Bajo estas condiciones, la eficiencia de inmovilización fue

únicamente del 22%. La cantidad de enzima inmovilizada fue aproximadamente 271 nmoles de enzima/g soporte. En general, la cantidad es mayor a las reportadas para la CPO (Tabla 4), exceptuando los reportes de Bakker (2000) y van de Velde (2001b) en los que utilizando como soporte espuma de poliuretano, se obtuvieron cargas de hasta 571 y 390 nmoles de enzima/g soporte respectivamente.

Después de la inmovilización, se llevó a cabo la derivatización del soporte con ácido benzoico usando de nuevo la química de la carbodiimida, con la finalidad de incrementar la hidrofobicidad en el microambiente de la enzima y favorecer la partición del sustrato hacia la enzima, mejorando así la catálisis en presencia de solventes.

Para comprobar la unión covalente de ácido benzoico al soporte, se siguieron dos estrategias: 1) reducir la cantidad de enzima inmovilizada para asegurar la disponibilidad de grupos amino en la reacción con ácido benzoico; y 2) medir la cantidad de ácido benzoico no unida; además, como se explicará más adelante, se exploró la posibilidad de que el ácido benzoico se uniera por interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas al soporte.

Primero, se redujo la carga enzimática a la mitad (140 nmoles de enzima por gramo de soporte) para asegurar la presencia de grupos funcionales capaces de unir a las moléculas hidrófobas. Posteriormente, se determinó la unión de ácido benzoico de forma indirecta al medir la cantidad remanente en el medio de reacción. Los resultados de la tabla 9 indicaron la unión de ácido benzoico en el soporte, pero la cantidad fue elevada en comparación con el máximo teórico (Tabla 8) que se esperaría de acuerdo con los grupos carboxilo obtenidos después de activar el mesoporoso.

**Tabla 9. Cantidad de ácido benzoico unido**

$\mu\text{moles ácido benzoico / g soporte}$
$1030.3 \pm 44.8$

Sospechando que quizás la unión de ácido benzoico se había dado de manera inespecífica a través de interacciones hidrofóbicas o electrostáticas, se realizaron algunas pruebas con el soporte derivatizado.

Para determinar si la unión en exceso de ácido benzoico se debía a interacciones electrostáticas entre el benzoato y los grupos amino del soporte, se lavó el soporte derivatizado con soluciones amortiguadoras a diferentes pH: 3, 5, 6 y se cuantificó espectrofotométricamente la cantidad de ácido benzoico presente en los lavados. Por otro lado, para determinar si la unión se había dado mediante interacciones hidrofóbicas, se lavó el soporte con cloroformo y se analizó mediante HPLC si existía ácido benzoico en el lavado. Los resultados de la tabla 10 muestran que la cantidad de ácido benzoico unida por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas es mínima.

**Tabla 10. Cantidad de ácido benzoico unido por interacciones inespecíficas**

Interacciones	nmoles ácido benzoico / g soporte
Electrostáticas	188.7 ± 16.1
Hidrofóbicas	889.9 ± 165.6

En este punto, fue esencial asegurar que el ácido benzoico no se unía al soporte mesoporoso dejando expuesto el grupo carboxilo, ya que esto tendría el efecto opuesto a lo esperado en el diseño del catalizador, es decir, la presencia de grupos cargados reduciría la hidrofobicidad del microambiente de la enzima y no favorecería la partición del sustrato. Por este motivo, se evaluó con azul de metileno la presencia de grupos carboxilo libres después del proceso de derivatización con ácido benzoico. Los resultados no indicaron la presencia de azul de metileno por lo que se concluye que no había grupos carboxilo expuestos al solvente. Siendo el material una estructura porosa, existe la posibilidad de que las moléculas de ácido benzoico en exceso se adentren en los poros. Esto podría ser la causa de la elevada cantidad de ácido unida al soporte.

Una vez contando con el biocatalizador (enzima inmovilizada en soporte derivatizado), se evaluó la actividad peroxigenasa con el sustrato tíoanisol en

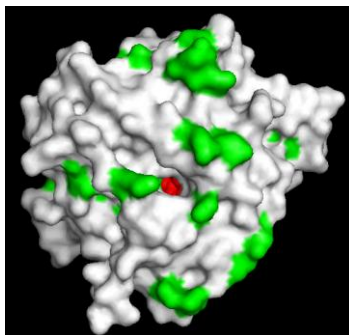


condiciones estándar. Como se muestra en la tabla 11, la actividad de la enzima después de la inmovilización y derivatización cae 15 y 20 veces con respecto a la soluble.

**Tabla 11. Efecto de la inmovilización y posterior derivatización del soporte sobre la actividad de CPO (140.6 nmol CPO/g soporte)**

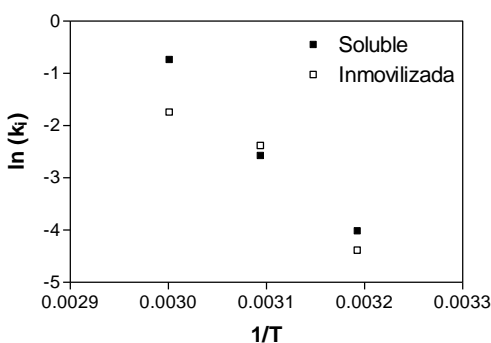
Catalizador	Actividad teórica esperada (U/g soporte)	Actividad determinada (U/g soporte)
CPO-mesoporoso	87.6 ± 2.2	5.7 ± 1.4
CPO-mesoporoso-ácido benzoico	87.6 ± 2.2	3.6 ± 0.6

Una posible explicación de la baja actividad es la mala orientación de la enzima. Puesto que los grupos carboxilo se encuentran distribuidos en toda la superficie de la CPO (Figura 9), esto puede ocasionar que la inmovilización se produzca en una orientación desfavorable para el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima; además, pueden producirse uniones covalentes entre varios grupos carboxilo y el soporte, lo que se conoce en inglés como “multipoint attachment”, lo que daría lugar a la deformación de la estructura de la enzima y por consiguiente una disminución en la actividad. Como se discutió antes (Tabla 4), existen antecedentes sobre la problemática de inmovilizar a la CPO, ya que al utilizar los grupos carboxilo, amino o inclusive los residuos glicosídicos en la superficie, se observa una disminución drástica o la pérdida total de la actividad.



**Figura 9. Presencia de grupos carboxílicos en la superficie de la CPO**

Es un fenómeno conocido que la disminución de actividad en las enzimas inmovilizadas se ve compensada con un aumento en la estabilidad a solventes orgánicos, temperatura, agentes oxidantes y/o desnaturalizantes en comparación con la enzima en su forma soluble (Tabla 4). En este sentido, se evaluó la estabilidad del biocatalizador ante la exposición a diferentes temperaturas y concentraciones de solvente orgánico. La termoestabilidad de la enzima libre y la inmovilizada fue determinada a partir de la incubación a 40, 50 y 60 °C para diferentes periodos (15-120 min). Los resultados se muestran en la figura 10 y se reportan en la tabla 12.



	$k_i$ ( $\text{min}^{-1}$ )		
	40 °C	50 °C	60 °C
CPO-soluble	0.018	0.076	0.473
CPO-inmovilizada	0.012	0.091	0.173

**Figura 10. Estabilidad térmica y constantes de inactivación ( $k_i$ ) del biocatalizador y de la enzima soluble a 40, 50 y 60 °C.**

Al parecer la inmovilización ofrece un efecto de protección modesto que se refleja en los valores de energía de inactivación ( $E_i$ ) de la tabla 12, ya que el valor para la enzima inmovilizada es ligeramente menor. Sin embargo, es importante resaltar que si bien la estabilidad es similar a temperaturas de 40 °C y 50 °C para la enzima soluble y la inmovilizada, se observa una estabilización de la enzima inmovilizada a 60 °C que equivale a un incremento en el tiempo de vida media de 4 minutos. Aunque la estabilización es modesta, se ha reportado en otros trabajos que la CPO inmovilizada en mesoporosos de sílica derivatizados, sílica gel, SBA15 y las membranas de quitosano, es más estable que la enzima soluble, atribuido a que la unión covalente protege de distorsiones conformacionales causadas por el calor (Borole *et.al.*, 2004; Montiel *et.al.*, 2007; Zhang *et.al.*, 2009).

**Tabla 12. Energía de inactivación para la enzima soluble e inmovilizada**

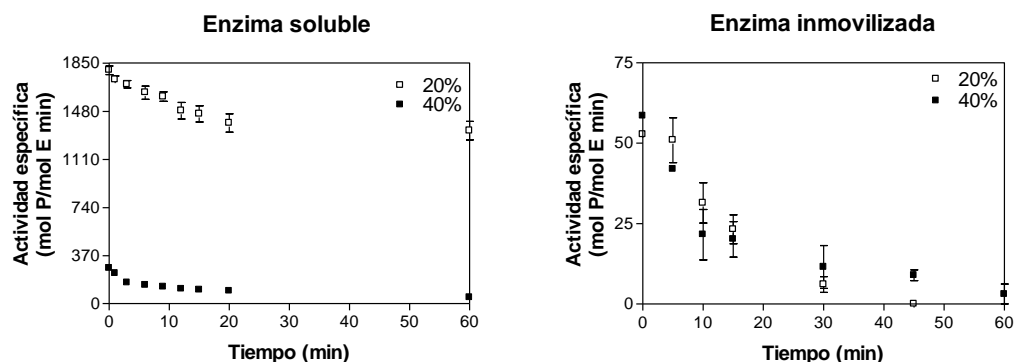
Catalizador	E <sub>i</sub> (cal/mol min)
CPO-soluble	33937.9
CPO-inmovilizada	27519.9

Es importante hacer notar que la mayoría de las inmovilizaciones de la CPO por adsorción han reportado una mayor estabilidad a temperatura (Tabla 4), pero también depende de las condiciones bajo las que se lleve a cabo el procedimiento y el tamaño de poro que se maneje. Regularmente, si la enzima se inmoviliza dentro del poro, se piensa que esto le otorga una cierta protección en condiciones desnaturizantes y por lo tanto, aumenta la estabilidad. En este caso, debido al tamaño de poro del material mesoporoso, es probable que la CPO se encuentra inmovilizada únicamente sobre la superficie del soporte, de tal manera que es sensible a condiciones o agentes desnaturizantes.

Para evaluar la estabilidad en presencia de solvente, se eligieron las concentraciones de 20% y 40% tert-butanol. Este solvente se ha reportado en varias reacciones de oxidación de la CPO y se ha observado que la enzima es estable en presencia de este solvente bajo condiciones operacionales, obteniéndose mayores tasas de recambio (van Deurzen *et.al.*, 1997; van de Velde *et.al.*, 2001c). Los datos de actividad específica residual a diferentes tiempos de incubación se muestran en la figura 11. Para ambos casos, la estabilidad del biocatalizador fue similar o incluso menor que la estabilidad de la enzima soluble, viéndose reflejado mayormente a una concentración de 20% de solvente. Como se mencionó anteriormente, el tamaño de la CPO (53Å x 46Å x 60Å) es mayor que el tamaño de poro (32.4 Å en su mayoría), por lo que la enzima se une superficialmente y se encuentra expuesta al solvente ocasionando su desnaturización, igual que la enzima en su forma soluble.

**Tabla 13. Constantes de inactivación para la CPO soluble e inmovilizada a diferentes concentraciones de tert-butanol**

	$k_i$	
	20%	40%
CPO-soluble	0.012	0.108
CPO-inmovilizada	0.076	0.100



**Figura 11. Estabilidad del biocatalizador y la enzima soluble en presencia de t-butanol a 20 y 40%.**

## 7.2. Ingeniería de solventes basada en el coeficiente de actividad termodinámica.

Una vez que se cuenta con el biocatalizador modificado (enzima inmovilizada y soporte derivatizado) se seleccionó el solvente más adecuado para la reacción con base en el coeficiente de actividad termodinámica del sustrato. Además, se evaluó un modelo que nos permite ver cual es el efecto de la interacción solvente-sustrato sobre la actividad enzimática, haciendo uso de los coeficientes de actividad termodinámica ( $\gamma_s$ ).

La actividad termodinámica de un compuesto nos informa sobre la disponibilidad de las moléculas en determinado solvente y es función del coeficiente de actividad termodinámica y de la fracción mol del compuesto. Un valor de  $\gamma_s$  elevado corresponde a un sistema en el que las interacciones soluto-solvente son pobres y la disponibilidad (actividad termodinámica) del soluto es alta. El problema al que nos enfrentamos es que al utilizar sustratos hidrofóbicos y solventes orgánicos, estos últimos tienden a estabilizar termodinámicamente al sustrato disminuyendo la disponibilidad hacia la

enzima, es por eso que el  $\gamma_S$  resulta ser una herramienta ideal para la selección del solvente mas adecuado para la catálisis enzimática, al emplear sustratos hidrófobos como tioanisol y 9-metilantraceno.

Se eligieron cinco solventes de diferente polaridad e identidad química: dimetilsulfóxido (DMSO, log P -1.34), acetonitrilo (ACN, log P -0.33), tetrahidrofurano (THF, log P 0.49), tert-butanol (t-BUT, log P 0.4) e iso-propanol (i-PROP, log P 0.38), con la finalidad de definir el más adecuado para la catálisis de la peroxidasa versátil y la cloroperoxidasa. Se obtuvo el coeficiente de actividad termodinámica del sustrato ( $\gamma_S$ ) de dos maneras: 1)  $\gamma_{\text{experimental}}$ : estimado a partir de datos experimentales de solubilidad, mediante la relación  $\gamma_S = 1/SV_m$  (Schmitke *et.al.*, 1996), donde S es la solubilidad del sustrato y  $V_m$  el volumen molar de la mezcla solvente-agua, y 2)  $\gamma_{\text{teórico}}$ : obtenido de manera teórica con el programa COSMOtherm; ambos bajo diferentes concentraciones de solvente. COSMOtherm es un programa que combina la termodinámica, estadística y química cuántica para determinar propiedades termodinámicas de compuestos puros y mezclas a partir de sus interacciones, empleando los CSM<sub>S</sub> (modelos dieléctricos de solvatación continua). Éstos muestran el comportamiento de los solventes a partir de interacciones de contacto local con las superficies moleculares del soluto y calculan energías de interacción a partir de datos de densidad de carga ( $\sigma$ ) que forman el contacto molecular soluto-solvente. Los resultados para el 9-metilantraceno (9-MA) y el tioanisol se encuentran resumidos en la tabla 14a y 14b.

**Tabla 14a. Coeficiente de actividad termodinámica del sustrato 9-MA.**

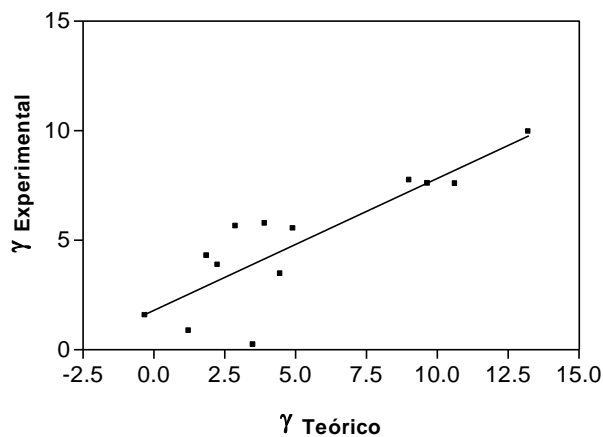
%Solvente	ln $\gamma$ EXPERIMENTAL			ln $\gamma$ TEÓRICO		
	ACN	DMSO	t-BUt	ACN	DMSO	t-BUT
0	17.22	17.22	17.22	14.52	14.52	14.52
20	13.26±0.21	13.13±0.59	13.97±0.13	11.19	10.60	10.89
50	8.16±0.02	9.86±0.18	7.91±0.03	6.98	5.84	7.11
70	5.28±0.76	2.78±0.24	6.91±0.43	4.54	3.19	4.86
100	3.85±0.21	1.08±0.19	5.38±0.06	1.53	-0.11	1.80

**Tabla 14b. Coeficiente de actividad termodinámica del sustrato tioanisol.**

%Solvente	ln $\gamma$ EXPERIMENTAL			ln $\gamma$ TEÓRICO				
	ACN	DMSO	t-BUt	ACN	DMSO	t-BUT	i-PROP	THF
0	13.23	13.23	13.23	9.95	9.95	9.95	9.95	9.95
20	9.03±0.05	10.64±0.13	9.67±0.03	7.73	7.57	7.58	7.69	7.41
40	2.90±0.03	4.92±0.01	3.93±0.14	5.63	5.52	5.76	5.87	5.38
60	2.27±0.03	4.48±0.07	1.88±0.47	3.86	3.46	4.28	4.36	3.59
100	1.25±0.02	3.51±0.04	-0.30±0.35	0.86	0.22	1.56	1.72	0.08

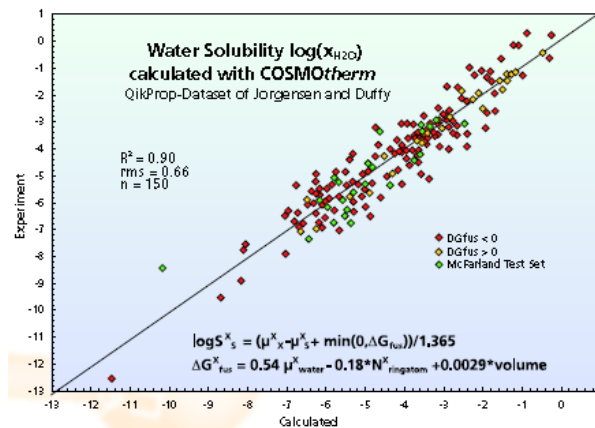
Los valores teóricos de  $\gamma_s$  del 9MA muestran que el sistema agua-tert butanol puede ser el mejor medio de reacción para llevar a cabo la catálisis, pues el sustrato 9-MA se encontraría mas disponible para la enzima. Mientras que, en el caso del tioanisol, las mezclas agua-alcohol son los mejores sistemas como medios de reacción. A pesar de que los solventes elegidos son polares, los alcoholes son capaces de formar mayores interacciones con el agua por su grupo OH<sup>-</sup> (naturaleza donadora y aceptora de protones), en comparación con dimetilsulfóxido, acetonitrilo y tetrahidrofurano; de tal manera que las interacciones solvente-sustrato se ven disminuidas por las interacciones creadas entre el solvente y el agua.

Las diferencias obtenidas en el cálculo de  $\gamma_s$  experimental y teórico pueden observarse en la figura 12, ya que se muestra la correlación entre los datos experimentales y los obtenidos con el programa COSMOtherm para el caso del tioanisol (Figura 12).



**Figura 12. Correlación entre los valores obtenidos de  $\gamma_s$  experimental y  $\gamma_s$  teóricos a partir del programa COSMOtherm para el sustrato tioanisol.**

Estos resultados se podían deber a errores en la medición de solubilidad del sustrato (S) y a la estimación del volumen molar de las mezclas,  $V_m$ , (Kim & Marsh, 1988; Tamura *et.al.*, 1997), lo que pudo provocar una estimación experimental errónea del coeficiente, ya que  $V_m = (\sum X_i \cdot PM_i) / \rho_T$  se empleó en  $\gamma_S = 1/SV_m$ . Así que los  $\gamma_S$  obtenidos a partir de COSMOtherm se utilizaron para las siguientes evaluaciones, ya que dicho programa presenta una buena correlación con datos experimentales como se muestra con un ejemplo al evaluar la solubilidad de ciertos pesticidas (Figura 13).



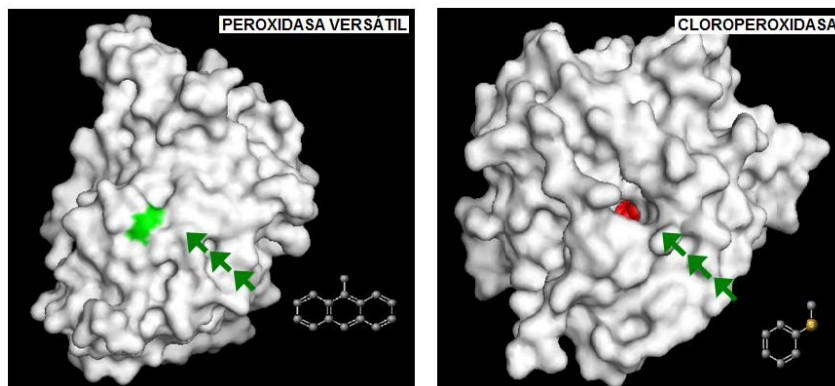
**Figura 13. Correlación de la solubilidad de ciertos pesticidas calculados a partir del programa COSMOtherm con la solubilidad calculada de manera experimental.**

En algunos casos, la disminución de la actividad enzimática al emplear solventes orgánicos como medio de reacción se debe mayormente al efecto del solvente sobre el sustrato (Ryu *et.al.*, 1992; Torres *et.al.*, 1996; Schmitke *et.al.*, 1996), provocando una partición desfavorable hacia la enzima. Los valores de  $\gamma_S$  obtenidos con COSMOtherm se emplearon para la validación del modelo (Ecuación 13) derivado del ciclo termodinámico descrito en la sección 2.2.1.1, a partir del cálculo de la relación  $\gamma_B/\gamma_A$ , siendo A y B dos solventes o mezclas de solventes diferentes. Dicha evaluación se llevó a cabo para definir si se puede predecir el comportamiento catalítico de las enzimas, CPO y VP, en presencia de solvente orgánico, conociendo únicamente los coeficientes de actividad termodinámica de los sustratos en los diferentes solventes.

$$\frac{(k_{cat}/K_M)_B}{(k_{cat}/K_M)_A} = \left( \frac{\gamma_B}{\gamma_A} \right)$$

El significado de estos cocientes se relaciona con el paso del sustrato de un solvente A ( $\gamma_A$ ) a un solvente B ( $\gamma_B$ ) y el efecto correspondiente sobre la actividad de las enzimas. De esta manera, si el sustrato es termodinámicamente más estable en el solvente A, entonces  $\gamma_A < \gamma_B$ , y de acuerdo con el modelo, se esperaría que  $(k_{cat}/K_M)_A < (k_{cat}/K_M)_B$ , debido a una partición del sustrato más favorable en el solvente B. Así se tiene que un cociente  $\gamma_B/\gamma_A > 1$  indicaría que la partición del sustrato hacia la enzima es mejor en el solvente B.

Se llevó a cabo la evaluación del modelo anterior para ambas enzimas, la VP y la CPO, por considerarlas casos opuestos desde el punto de vista de la desolvatación del sustrato en la formación del estado de transición durante la catálisis enzimática. Es decir, por un lado, la VP oxida hidrocarburos policíclicos aromáticos en la superficie de la proteína por un triptófano activado (actividad lignino peroxidasa) (Camarero *et.al.*, 1999; Ayala *et.al.*, 2001; Moreira *et.al.*, 2005; Pérez-Boada *et.al.*, 2005; Pogni *et.al.*, 2005; Ruiz Dueñas *et.al.*, 2008 y 2009), mientras que la CPO requiere que el sustrato se introduzca parcialmente por una cavidad al sitio activo y se acerque lo suficiente al hemo para transferirle oxígeno (actividad peroxigenasa; Sundaramoorthy *et. al.*, 1998) (Figura 14).



**Figura 14. Presencia del sustrato en el mecanismo catalítico de la peroxidasa versátil (izquierda) y la cloroperoxidasa (derecha)**



Para la peroxidasa versátil, la actividad de lignino peroxidasa en ausencia de Mn (II) se determinó a través de la oxidación del sustrato 9-metilantraceno. Las reacciones de peroxidación de sustratos poliaromáticos para la VP han sido reportados utilizando 20% ACN (Wang *et.al.*, 2003). Se evaluó el modelo con tres solventes diferentes: dimetilsulfóxido, tert-butanol y acetonitrilo.

Para definir si el modelo es un predictor del comportamiento de la enzima, la evaluación se enfocó en dos partes: 1) el cálculo de  $k_{cat}/K_M$  y los coeficientes de actividad termodinámica del sustrato para los diferentes solventes; y 2) la evaluación de una correlación entre los términos que conforman dicho modelo.

En el caso de la VP se esperaba encontrar una correlación pobre, ya que la catálisis no involucra una desolvatación importante del sustrato. Lo anterior era una consideración importante para la aplicación del modelo, puesto que si no fuera el caso, la aportación del sustrato no sería la única por el hecho de que la aproximación  $\Delta G_E^{tr} \approx \Delta G_{ES}^{tr}$  no es válida (Ecuación 12).

**Tabla 15.  $k_{cat}/K_M$  para VP con el sustrato 9MA en 20% solvente**

	$k_{cat}/K_M$ ( $\mu M^{-1} min^{-1}$ )
ACN	9.12
DMSO	10.78
t-BUT	8.26

Se obtuvieron las relaciones  $\gamma_B/\gamma_A$  y  $(k_{cat}/K_M)_B/(k_{cat}/K_M)_A$  a partir de los datos de la tablas 14a y 15. Los resultados se encuentran resumidos en la tabla 16. Cada uno de los datos reportados en la tabla involucran un cambio de solvente A a un solvente B, definidos por el subíndice en la parte inferior derecha.

**Tabla 16. Cocientes de  $(k_{cat}/K_M)_B/(k_{cat}/K_M)_A$  y  $\gamma_B/\gamma_A$  para la VP**

$\gamma_B/\gamma_A$	20% ACN <sub>B</sub>	20% DMSO <sub>B</sub>	20% tBUT <sub>B</sub>
20% ACN <sub>A</sub>	1	0.56	0.74
20% DMSO <sub>A</sub>		1	1.33
20% tBUT <sub>A</sub>			1

$(k_{cat}/K_M)_B/(k_{cat}/K_M)_A$	20% ACN <sub>B</sub>	20% DMSO <sub>B</sub>	20% tBUT <sub>B</sub>
20% ACN <sub>A</sub>	1	1.18	0.91
20% DMSO <sub>A</sub>		1	0.77
20% tBUT <sub>A</sub>			1

Como se mencionó anteriormente, se espera que si  $\gamma_B/\gamma_A > 1$ , la relación  $(k_{cat}/K_M)_B/(k_{cat}/K_M)_A$  también tendría que ser  $> 1$ , si el efecto de la partición del sustrato hacia la enzima es el que domina el valor de la actividad enzimática. Por ejemplo, para el caso de la peroxidasa versátil, el modelo predice que en el paso de 20% ACN (A) a 20% DMSO (B), esperaríamos tener menos actividad ( $\gamma_B/\gamma_A = 0.56$ ). Sin embargo, el valor de  $(k_{cat}/K_M)_B/(k_{cat}/K_M)_A$  es 1.18.

De los tres casos establecidos para la VP, sólo uno de ellos predijo un cambio acertado en la actividad de la enzima (20% ACN a 20% tBUT). En general, la correlación es pobre, ya que se esperaba que los datos se ajustaran a una regresión lineal positiva (Figura 15). El comportamiento de la enzima VP no pudo ser estudiado a concentraciones mayores de solvente, debido a que la proteína precipitaba. Por tanto, se tienen pocos puntos en la correlación. Sin embargo, con los datos que se tienen se observa que los valores de  $(k_{cat}/K_M)_B/(k_{cat}/K_M)_A$  son insensibles a cambios de  $\gamma_B/\gamma_A$ .

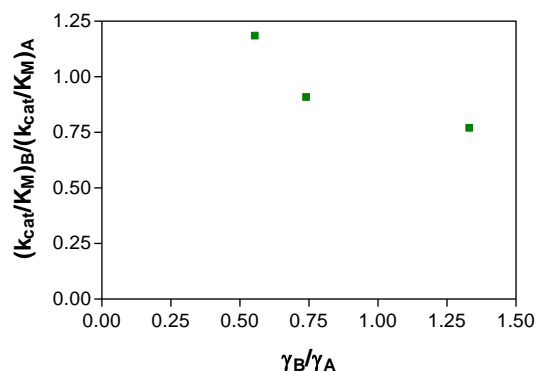


Figura 15. Efecto del sustrato sobre la actividad de la VP en presencia de solvente.

En el caso de la cloroperoxidasa, se utilizó el sustrato aromático azufrado tioanisol, ya que con dicho sustrato se muestra la actividad peroxigenasa mas elevada, de acuerdo con estudios previos del grupo de trabajo. Para evaluar el modelo se emplearon los cinco solventes acetonitrilo, dimetilsulfóxido, tert-butanol, iso-propanol y tetrahidrofurano.

Tabla 17.  $k_{cat}/K_M$  para la CPO con el sustrato tioanisol a diferentes concentraciones de solvente.

Solvente (%)	$k_{cat}/K_M$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ )				
	ACN	DMSO	t-BUT	i-PROP	THF
0	29.93	29.93	29.93	29.93	29.93
10	5.61	15.82	20.04	20.11	3.40
20	2.46	7.22	6.43	8.43	1.00
40	ND	0.77	1.69	0.27	ND

ND: No determinado

Se obtuvieron las relaciones  $\gamma_B/\gamma_A$  y  $(k_{cat}/K_M)_B / ((k_{cat}/K_M)_A)$  a partir de los datos de las tablas 14b y 17. Los resultados se encuentran resumidos en la tabla 18. A diferencia del 9-metilantraceno, el tioanisol tiene que acercarse lo suficiente al hemo para llevar a cabo su oxidación, adentrándose en la cavidad del sitio catalítico, haciendo que la aproximación de  $\Delta G^{\text{tr}}_E$  y  $\Delta G^{\text{tr}}_{ES}$  tenga mayor validez.

Tabla 18. Cocientes  $(k_{cat}/K_M)_B/(k_{cat}/K_M)_A$  y  $\gamma_B/\gamma_A$  para la CPO

$\gamma_B/\gamma_A$	0 <sub>B</sub>	10 ACN <sub>B</sub>	10 DMSO <sub>B</sub>	10 tBUT <sub>B</sub>	10 iPROP <sub>B</sub>	10 THF <sub>B</sub>	20 ACN <sub>B</sub>	20 DMSO <sub>B</sub>	20 tBUT <sub>B</sub>	20 iPROP <sub>B</sub>	20 THF <sub>B</sub>	40 DMSO <sub>B</sub>	40 tBUT <sub>B</sub>	40 iPROP <sub>B</sub>
0 <sub>A</sub>	1.00	0.341	0.310	0.311	0.313	0.266	0.109	0.093	0.093	0.105	0.079	0.012	0.015	0.017
10 ACN <sub>A</sub>		1.000	0.909	0.913	0.918	0.780	0.319	0.272	0.274	0.307	0.233	0.035	0.045	0.050
10 DMSO <sub>A</sub>			1.000	1.004	1.010	0.858	0.351	0.299	0.301	0.338	0.256	0.039	0.049	0.055
10 tBUT <sub>A</sub>				1.000	1.006	0.854	0.349	0.298	0.300	0.336	0.255	0.038	0.049	0.055
10 iPROP <sub>A</sub>					1.000	0.849	0.347	0.296	0.298	0.334	0.254	0.038	0.049	0.054
10 THF <sub>A</sub>						1.000	0.409	0.349	0.351	0.394	0.299	0.045	0.057	0.064
20 ACN <sub>A</sub>							1.000	0.853	0.859	0.964	0.731	0.110	0.140	0.156
20 DMSO <sub>A</sub>								1.000	1.007	1.130	0.856	0.129	0.164	0.183
20 tBUT <sub>A</sub>									1.000	1.122	0.850	0.128	0.163	0.182
20 iPROP <sub>A</sub>										1.000	0.758	0.114	0.145	0.162
20 THF <sub>A</sub>											1.000	0.151	0.192	0.214
40 DMSO <sub>A</sub>												1.000	1.273	1.421
40 tBUT <sub>A</sub>													1.000	1.116
40 iPROP <sub>A</sub>														1.000

$(k_{cat}/K_M)_B/(k_{cat}/K_M)_A$	0 <sub>B</sub>	10 ACN <sub>B</sub>	10 DMSO <sub>B</sub>	10 tBUT <sub>B</sub>	10 iPROP <sub>B</sub>	10 THF <sub>B</sub>	20 ACN <sub>B</sub>	20 DMSO <sub>B</sub>	20 tBUT <sub>B</sub>	20 iPROP <sub>B</sub>	20 THF <sub>B</sub>	40 DMSO <sub>B</sub>	40 tBUT <sub>B</sub>	40 iPROP <sub>B</sub>
0 <sub>A</sub>	1.00	0.187	0.529	0.670	0.672	0.114	0.082	0.241	0.215	0.282	0.034	0.026	0.056	0.009
10 ACN <sub>A</sub>		1.000	2.820	3.572	3.585	0.606	0.439	1.287	1.146	1.503	0.179	0.139	0.301	0.048
10 DMSO <sub>A</sub>			1.000	1.267	1.271	0.215	0.155	0.456	0.406	0.533	0.063	0.049	0.107	0.017
10 tBUT <sub>A</sub>				1.000	1.003	0.170	0.123	0.360	0.321	0.421	0.050	0.039	0.084	0.013
10 iPROP <sub>A</sub>					1.000	0.169	0.122	0.359	0.320	0.419	0.050	0.039	0.084	0.013
10 THF <sub>A</sub>						1.000	0.724	2.124	1.891	2.479	0.295	0.229	0.497	0.079
20 ACN <sub>A</sub>							1.000	2.935	2.614	3.427	0.408	0.317	0.687	0.110
20 DMSO <sub>A</sub>								1.000	0.891	1.168	0.139	0.108	0.234	0.037
20 tBUT <sub>A</sub>									1.000	1.311	0.156	0.121	0.263	0.042
20 iPROP <sub>A</sub>										1.000	0.119	0.093	0.200	0.032
20 THF <sub>A</sub>											1.000	0.777	1.683	0.269
40 DMSO <sub>A</sub>												1.000	2.167	0.346
40 tBUT <sub>A</sub>													1.000	0.160
40 iPROP <sub>A</sub>														1.000

La tabla 18 contiene todos los cambios de un solvente A a un solvente B, evaluando los cinco solventes a diferentes concentraciones. Un factor importante al analizar estos valores es la estabilidad de la enzima en las mezclas. El modelo termodinámico que tratamos de aplicar en este trabajo se basa en la suposición de que las diferencias en la actividad enzimática al comparar dos solventes se deben únicamente a diferencias en la disponibilidad del sustrato (actividad termodinámica). Por lo tanto, se midieron las constantes de inactivación en las diferentes mezclas de solventes y se calculó la actividad residual a un minuto, que es el tiempo que dura el ensayo de actividad para calcular  $k_{cat}/K_M$ . Los resultados se muestran en la tabla 19. Se observa que en las mezclas 20% acetonitrilo, 20% tetrahidrofurano, 40% dimetilsulfóxido y 40% iso-propanol, se tiene entre 48% y 63% de actividad residual. En general, la cloroperoxidasa es más estable en los alcoholes en comparación con los otros solventes, siendo el acetonitrilo y el tetrahidrofurano los que inactivan a la enzima más rápido a concentraciones por arriba del 20%. Por este motivo, se depuraron los datos de la tabla 18, eliminando los casos que incluyeran estas mezclas (marcados en morado). Esta depuración redujo el número de puntos un 50%.

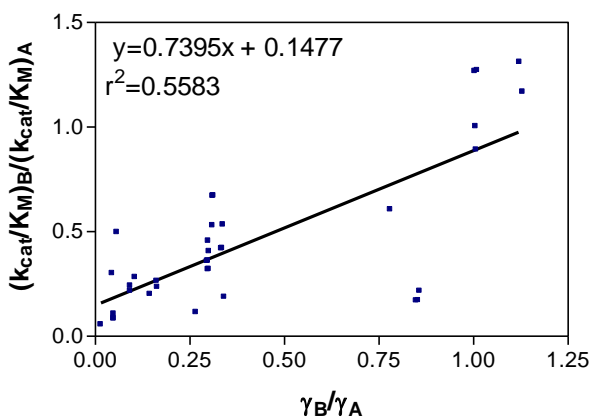
De los 45 valores, 10 no predicen la tendencia esperada. Por ejemplo, el cambio de 10% ACN a 10% tBUT con valores de  $\gamma_B/\gamma_A=0.913$  y  $(k_{cat}/K_M)_B/(k_{cat}/K_M)_A=3.572$ . Estos casos, que representan el 22% del total restante, están marcados en verde en la tabla 18. Por lo tanto, el modelo predijo de forma correcta la tendencia esperada en un 78% de los casos.

**Tabla 19. Constantes de inactivación y actividad residual de la CPO en diferentes mezclas de solvente-agua.**

% Solvente	$k_{inactivación} (min^{-1})$				
	ACN	DMSO	t-BUT	i-PROP	THF
10	0.025	0.002	0.007	0.003	0.108
20	0.466	0.022	0.012	0.006	0.742
40	^	0.652	0.176	0.470	^
	Actividad residual a 1 min (%)				
10	97.6	99.9	99.3	99.7	89.8
20	62.8	97.8	98.8	99.4	47.6
40	-	52.1	83.9	62.5	-

\* Tiempo de incubación: 1 h, ^ Enzima precipitada

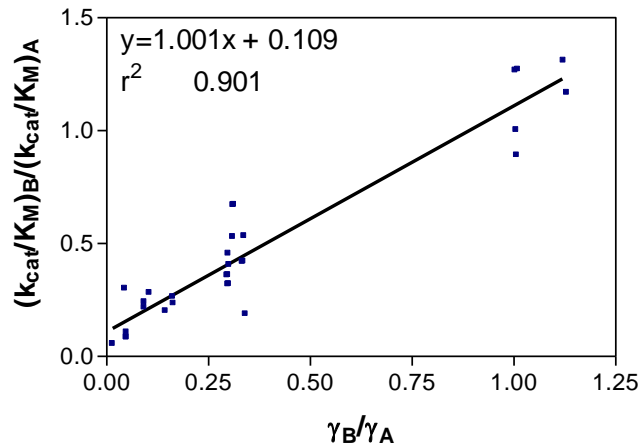
Los casos restantes, que representan el 40% de los datos iniciales, muestran una correlación ( $R^2$ ) del 0.558, lo que significa que el 56% del comportamiento catalítico de la enzima se encuentra relacionado con el coeficiente de actividad termodinámica del sustrato tioanisol; además, hay que tomar en cuenta que desde este punto la cloroperoxidasa es afectada en su mayoría por la partición del sustrato. Si se hubieran considerado todos los casos iniciales, la correlación obtenida sería de 0.276 ( $R^2$ ).



**Figura 16. Relación entre los cocientes de  $k_{cat}/K_M$  y los cocientes de  $\gamma$  para la reacción de oxidación de tioanisol en mezclas de solventes que promueven la estabilidad de CPO.**

Es interesante notar que a concentraciones de 10% de solvente, cuatro de los cinco solventes mantienen la actividad por arriba del 97%, excepto tetrahidrofurano (Tabla 19). El THF es un solvente que al entrar en contacto con el aire se descompone generando peróxidos y por tanto debe destilarse antes de utilizarse (OSHA: Occupational safety and health administration). En particular, la presencia de una cantidad no controlada de peróxidos en el medio de reacción puede ser negativa para las peroxidasa, ya que pueden participar en el proceso de autoinactivación (Valderrama *et.al.*, 2002). Con esto en mente, durante los experimentos se tuvo el cuidado de destilar el THF y utilizarlo inmediatamente en las reacciones. Sin embargo, no deja de ser notorio que los puntos que involucran al THF salen completamente de la correlación. Si se eliminan estos casos, la correlación aumenta hasta un 0.901 y en ese caso, el modelo sería más acertado para predecir el comportamiento catalítico

conociendo únicamente el coeficiente de actividad termodinámica del sustrato en cada mezcla de solventes (Figura 17).



**Figura 17. Relación entre los cocientes de  $k_{cat}/K_M$  y los cocientes de  $\gamma$  para la reacción de oxidación de tioanisol en mezclas de solventes que promueven la estabilidad de CPO, sin THF**

En general, estos datos refuerzan el modelo termodinámico que predice cambios en  $k_{cat}/K_M$  basados en variaciones de la energética de desolvatación del sustrato, pero hay que tener en cuenta dos consideraciones importantes: 1) que exista desolvatación del sustrato hacia el sitio activo de la enzima, para mantener las simplificaciones del modelo; y 2) la estabilidad de la enzima, con el fin de que el efecto preponderante sea la partición del sustrato.

Una vez validada la utilidad del coeficiente de actividad del sustrato, se seleccionó el tert-butanol por mostrar los  $\gamma_S$  más altos para el tioanisol y ser el solvente donde la CPO, en forma soluble fue más estable a altas concentraciones. Utilizando el biocatalizador obtenido anteriormente (CPO inmovilizada en los mesoporos de carbono), se evaluó el efecto de la derivatización del soporte sobre la partición del sustrato, con la finalidad de poder determinar si la combinación de ingeniería de solventes e ingeniería del catalizador mejorarían la actividad de la peroxidasa en presencia de un solvente orgánico.

Se evaluó la actividad peroxigenasa de la CPO con el sustrato tianisol en presencia de tert-butanol a diferentes concentraciones de solvente: 0, 20 y 40%. Para analizar el efecto de la inmovilización y la derivatización, se midieron datos de actividad que se encuentran resumidos en la tabla 20; se incluyen los datos de la enzima en su forma soluble. De los resultados se observaron varios aspectos; por un lado, el aumento en la cantidad de solvente disminuyó la actividad enzimática tanto para la enzima soluble como para el biocatalizador obtenido. Éste es un comportamiento ya visto en varias ocasiones para diferentes peroxidases, por ejemplo, en el caso de la cloroperoxidasa en la oxidación de indol pasa de una  $k_{cat}$  de 740 a 250  $s^{-1}$  de agua a 50% tert-butanol (van Deurzen *et.al.*, 1997); en el caso de la peroxidasa versátil durante la oxidación de manganeso la  $V_{max}$  se reduce hasta alrededor del 25% a una concentración de 50% DMSO o etanol (Rodakiewicz *et.al.*, 2006); para la manganeso peroxidasa en la oxidación de 2,6-dimetoxifenol, la actividad se reduce hasta un 20% a una concentración de 60% metanol (Eibes *et.al.*, 2005), entre otros casos.

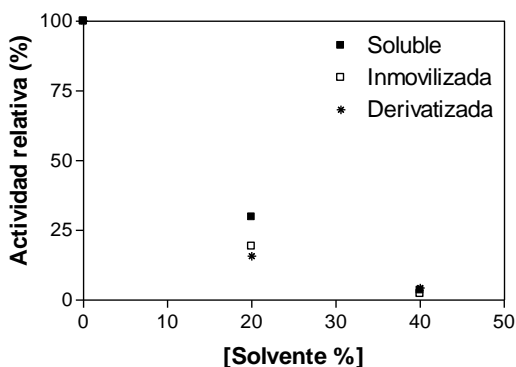
**Tabla 20. Efecto de la inmovilización y posterior derivatización del soporte sobre la actividad de CPO (140.6 nmol CPO/g soporte)**

Catalizador	Actividad relativa		
	tBUT 0%	tBUT 20%	tBUT 40%
CPO soluble	100	29.8	3.5
CPO-mesoporoso	100	19.3	2.3
CPO-mesoporoso-ácido benzoico	100	15.8	4.4

Por otro lado, como se discutió anteriormente, el proceso de inmovilización de la enzima y derivatización del soporte resultaron en una disminución de casi 20 veces la actividad en comparación con la enzima soluble. Estos resultados son similares al proceso de inmovilización covalente de la CPO en otros mesoporosos como son SBA-15 funcionalizado (Jung *et.al.* 2010) y SBA-16 (Aburto *et.al.* 2005) (Tabla 4). En otros soportes disminuye en menor grado la actividad al inmovilizar a la enzima; por ejemplo, en el soporte sílica gel silanizado se retiene un 52% de actividad (Montiel *et.al.*, 2007); y en la espuma de poliuretano se retiene un 54% de la actividad (Bakker *et.al.*, 2000). Sin embargo, estos soportes tienen carácter hidrofílico y podrían desfavorecer aún más la partición del sustrato hacia el microambiente de la enzima.



Finalmente, para evaluar el efecto de la derivatización sobre la partición del sustrato, se graficaron los perfiles de actividad contra la concentración de tert-butanol de las diferentes preparaciones. En caso de que la derivatización del biocatalizador influyera de forma positiva en la partición del sustrato, entonces se esperaría un cambio en el perfil de actividad, con una pendiente menor al perfil de la enzima soluble o del biocatalizador sin derivatizar. En este caso, se pudo observar el mismo perfil de actividad al aumentar la concentración de solvente tanto para la enzima en su forma soluble como para los biocatalizadores obtenidos (Figura 18). El ajuste de los datos a un modelo de decaimiento de primer orden confirmó que la derivatización del soporte no tiene un efecto importante en la actividad de la enzima, lo cual sugiere que la partición no se ve favorecida por esta estrategia.



	$k_{\text{decaimiento}}$	$r^2$
CPO soluble	2.413	0.9355
CPO mesoporoso	2.443	0.8759
CPO mesoporoso-ácido benzoico	2.390	0.8380

**Figura 18. Efecto de la inmovilización de la CPO y la posterior derivatización del soporte sobre la partición del sustrato**

## 8. CONCLUSIONES

En resumen, se logró la inmovilización de la CPO en mesoporosos de carbono. Sin embargo, el proceso de inmovilización y derivatización provocó una disminución en la actividad alrededor de 15-20 veces en comparación con la enzima en su forma soluble.

La estabilidad del biocatalizador obtenido es similar al de la enzima en su forma soluble atribuido a que la unión sobre los mesoporosos de carbono es superficial por el menor tamaño de poro, lo que provoca que la enzima se encuentre expuesta de la misma manera a temperatura y a los solventes orgánicos.

Tert-butanol es el mejor solvente para llevar a cabo la catálisis enzimática tanto de la VP como de la CPO.

La catálisis enzimática en presencia de solventes orgánicos puede estar limitada por la partición del sustrato hacia la enzima.

Se encontró que el modelo predice de cierta forma ( $R^2$  0.5583) el comportamiento de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* durante la catálisis de la oxidación de un compuesto modelo, el tioanisol.

Entre las ventajas del uso del modelo como una herramienta predictiva, se encuentra el hecho de que se pueden utilizar los coeficientes de actividad termodinámica del sustrato en diferentes mezclas de agua-solvente, calculados de forma teórica, para examinar de forma rápida una gran cantidad de mezclas.

Se modificó el microambiente de la enzima, haciéndolo más hidrófobo mediante la derivatización del biocatalizador con grupos aromáticos, pero no pudo observarse ningún efecto adicional en términos de la partición del sustrato.

## 9. PERSPECTIVAS

Dada la problemática de inmovilizar de forma covalente a la CPO, es necesario evaluar de forma sistemática diferentes estrategias que contengan con las limitantes de estabilidad de la enzima y reactividad de los grupos en su superficie. Una alternativa interesante se presenta con la ingeniería de proteínas para poder manipular la presencia de ciertos grupos que permitan la orientación correcta de la CPO durante la inmovilización.

Por otro lado, también está la búsqueda y el empleo de otros soportes, tanto orgánicos como inorgánicos, que puedan mejorar la cantidad de enzima inmovilizada pero además mantengan la actividad catalítica.

Si se lograra la expresión de la enzima podría manipularse genéticamente para aumentar la eficiencia catalítica en presencia de solventes orgánicos.

Con respecto a las ventajas que presenta el uso del coeficiente de actividad termodinámica como una herramienta predictiva, está su aplicación para la búsqueda del mejor medio de reacción de manera rápida a partir de una gran cantidad de mezclas con solventes tanto hidrofílicos como hidrofóbicos para una gran cantidad de enzimas, siempre y cuando cumplan con las consideraciones que se establecen para poder aplicar los  $\gamma_s$ .

## 10. REFERENCIAS

- Aburto J., Ayala M., Bustos-Jaimes I., Montiel C., Térres E., Domínguez J. M., Torres E.** 2005. Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials. *Microporous and Mesoporous Materials* 83: 193-200.
- Adlercreutz P.** Methods in biotechnology. Immobilization of enzymes and cells. Vol 22:251-256. New Jersey, 2006. J. M. Guisan (editor). 2nd edition. Humana Press.
- Andersson M., Samra B. K., Holmberg H., Adlercreutz P.** 1999. Use of celite-immobilised chloroperoxidase in predominantly organic media. *Biocatalysis and Biotransformation* 17:293-303.
- Aoun S., Chebli C., Baboulène M.** 1998. Noncovalent immobilization of chloroperoxidase onto talc: Catalytic properties of a new biocatalyst. *Enzyme and Microbial Technology* 23:380-385.
- Arroyo M.** 1998. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica* 39:23-39.
- Ayala Aceves M., Baratto M. C., Basosi R., Vazquez-Duhalt R., Pogni R.** 2001. Spectroscopic characterization of a manganese–lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera adusta* in the absence of manganese: evidence of a protein centred radical by hydrogen peroxide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16:159-167.
- Ayala M., Vazquez-Duhalt R.** Petroleum biotechnology: developments and perspectives. Capítulo 3. 1ª Edición. México, 2004. R. Vazquez-Duhalt y R. Quintero-Ramirez (Editores).
- Bakker M., van de Velde F., van Rantwijk F., Sheldon R. A.** 2000. Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams. *Biotechnology and Bioengineering* 70:342-348.
- Banci L.** 1997. Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology* 53:253-263
- Borole A., Dai S., Cheng C. L., Rodriguez M., Davison B. H.** 2004. Performance of chloroperoxidase stabilization in mesoporous sol-gel glass using in situ glucose oxidase peroxide generation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113-116:273-285.
- Bruns N., Tiller J. C.** 2005. Amphiphilic network as nanoreactor for enzymes in organic solvents. *Nano Letters* 5:45-48.
- Camarero S., Bockle B., Martinez M. J., Martinez A. T.** 1996. Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1070–1072.
- Camarero S., Sarkar S., Ruiz-Dueñas F. J., Martínez M. J., Martínez A. T.** 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *The Journal of Biological Chemistry* 274:10324-10330.
- Castro G. R., Knubovets T.** 2003. Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. *Critical Reviews in Biotechnology* 23:195-231.
- Catoni E., Cernia E., Palocci C.** 1996. Different aspects of ‘solvent engineering’ in lipase biocatalysed esterifications. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 105:79-86.

- Corradini F., Franchini G., Marcheselli L., Tassi L., Tosi G.** 1993. The ethane-1,2-diol/water solvent system: densities and excess molar volumes at various temperatures. *Australian Journal of Chemistry* 46:243-251.
- Dai L., Klibanov A. M.** 1999. Striking activation of oxidative enzymes suspended in non-aqueous media. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:9475-9478.
- Dai L., Klibanov A. M.** 2000. Peroxidase-catalyzed asymmetric sulfoxidation in organic solvents versus in water. *Biotechnology and Bioengineering* 70:353-357.
- Díaz J. F., Balkus K. J.** 1996. Enzymes immobilized in MCM-41 molecular sieves. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2:115-126.
- Dordick J. S.** 1989. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 11:194-211.
- Dordick J. S.** 1991. Enzymatic catalysis in organic media: fundamentals and selected applications. *ASGSB Bulletin* 4:125-132.
- Dordick J. S.** 1992. Review: Designing enzymes for use in organic solvents. *Biotechnology Progress* 8:259-267.
- Eibes G., Lú-Chau T., Feijoo G., Moreira M. T., Lema J. M.** 2005. Complete degradation of anthracene by manganese peroxidase in organic solvent mixtures. *Enzyme and Microbial Technology* 37:365-372.
- Everse J.** 1998. The structure of heme proteins Compounds I and II: some misconceptions. *Free Radical Biology & Medicine* 24:1338-1346.
- Fersht A.** Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding. Capítulo 2 y 12. 5ª Impresión. Estados Unidos 2003.
- Franssen M. C. R.** 1994. Halogenation and oxidation reactions with haloperoxidases. *Biocatalysis and Biotransformation* 10:87-111.
- Geigert J., DeWitt S. K., Neidleman S. L., Lee G., Dalietos D. J., Moreland M.** 1983. DMSO is a substrate for chloroperoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 116:82-85.
- Gupta M. N., Batra R., Tyagi R., Sharma A.** 1997. Polarity index: The guiding solvent parameter for enzyme stability in aqueous-organic cosolvent mixtures. *Biotechnology Progress* 13:284-288.
- Hamid M., Khalil-ur-Rehman.** 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry* 115:1177-1186.
- Han Y-J., Watson J. T., Stucky G. D., Butler A.** 2002. Catalytic properties of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17:1-8.
- Heinfling A., Martinez M. J., Martinez A. T., Bergbauer M., Szewzyk U.** 1998a. Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters* 165:43-50.
- Heinfling A., Ruiz-Duenas J., Martinez M. J., Bergbauer M., Szewzyk U., Martinez A. T.** 1998b. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidase from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Letters* 428:141-146.

- Hudson S., Cooney J., Magner E.** 2008. Protein in mesoporous silicates. *Angewandte Chemie International Edition* 47:8582-8594.
- Jun S., Joo S. H., Ryoo R., Kruk M., Jaroniec M., Liu Z., Ohsuna T., Terasaki O.** 2000. Synthesis of new, nanoporous carbon with hexagonally ordered mesostructure. *Journal of American Chemical Society* 122:10712-10713.
- Jung D., Paradiso M., Wallacher D., Brandt A., Hartmann M.** 2009. Formation of cross-linked chloroperoxidase aggregates in the pores of mesocellular foams: characterization by SANS and catalytic properties. *ChemSusChem* 2:161-164.
- Jung D., Streb C., Hartmann M.** 2010. Covalent anchoring of chloroperoxidase and glucose oxidase on the mesoporous molecular sieve SBA-15. *International Journal of Molecular Sciences* 11:762-778.
- Kadima T.A., Pickard M. A.** 1990. Immobilization of chloroperoxidase on aminopropyl-glass. *Applied and Environmental Microbiology* 56:3473-3477.
- Kim E. S., Marsh K. N.** 1988. Excess volumes for 2-methyl-2-propanol + water at 5 K intervals from 303.15 to 323.15 K. *Journal of Chemical and Engineering Data* 33:288-292.
- Klibanov A.** 1997. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *TRENDS in Biotechnology* 15:97-101.
- Klibanov A.** 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409: 241-246.
- Lanee C., Boeren S., Vos K.** 1985. On optimizing organic solvents in multi-liquid-phase biocatalysis. *Trends in Biotechnology* 3:251-252.
- Liang C., Li Z., Dai S.** 2008. Mesoporous carbon materials: synthesis and modification. *Angewandte Chemie International Edition* 47:3696-3717.
- Littlechild J.** 1999. Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Current Opinion in Chemical Biology* 3:28-34.
- Longoria A., Tinoco R., Torres E.** Enzyme technology of peroxidases: immobilization, chemicals and genetic modification. (2010) En: Torres E, Ayala M (eds) Biocatalysis based on heme peroxidases. 1a edición. Springer-Verlag. ISBN: 978-3-642-12626-0
- Mester T., Field J. A.** 1998. Characterization of a novel manganese peroxidase – lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *Journal of Biological Chemistry* 273:15412–15417.
- Montiel C., Térres E., Domínguez J. M., Aburto J.** 2007. Immobilization of chloroperoxidase on silica-based materials for 4,6-dimethyl dibenzothiophene oxidation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 48:90-98.
- Moreira P. R., Duez C., Dehareng D., Antunes A., Almeida-Vara E., Frére J. M., Malcata F. X., Duarte J. C.** 2005. Molecular characterisation of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* strain. *Journal of Biotechnology* 118:339-352.
- Morris D. R., Hager L. P.** 1966. Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 241:1763-1768.
- OSHA:** <http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/tetrahydrofuran/recognition.html>

- Peng Y., Rong-Bing W., Xin-Ping W.** 2009. Quantitative enzyme immobilization: Control of the carboxyl group density on support surface. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61:296-302.
- Perez-Boada M., Ruiz Dueñas F. J., Pogni R., Basosi R., Choinowski T., Martínez M. J., Piontek K., Martínez A. T.** 2005. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *Journal of Molecular Biology* 354:385-402.
- Petri A., Gambicorti T., Salvadori P.** 2004. Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 27:103-106.
- Pogni R., Baratto M. C., Giansanti S., Teutloff C., Verdin J., Valderrama B., Lenzian F., Lubitz W., Vazquez-Duhalt R., Basosi R.** 2005. Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Biochemistry* 44:4267-4274.
- Polizzi K. M., Bommarius A. S., Broering J. M., Chaparro-Riggers J. F.** 2007. Stability of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 11:220-225.
- Reichardt C.** 1979. Empirical parameter of solvent polarity as linear free-energy relationships. *Angewandte Chemie International Edition* 18:98-110.
- Rodakiewicz-Nowak J., Jarosz-Wilkolazka A., Luterek J.** 2006. Catalytic activity of versatile peroxidase from *Bjerkandera fumosa* in aqueous solutions of water-miscible organic solvents. *Applied Catalysis A: General* 308:56-61.
- Ruiz-Dueñas F. J., Martínez M. J., Martínez A. T.** 1999. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular Microbiology* 31:223-236.
- Ruiz-Dueñas F. J., Morales M., Mate M. J., Romero A., Martínez M. J., Smith A. T., Martínez A. T.** 2008. Site-directed mutagenesis of the catalytic tryptophan environment in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase. *Biochemistry* 47:1685-1695.
- Ruiz-Dueñas F. J., Morales M., García E., Miki Y., Martínez M. J., Martínez A. T.** 2009. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *Journal of Experimental Botany* 60:441-452.
- Ryu K., Dordick J. S.** 1992. How do organic solvents affect peroxidase structure and function? *Biochemistry* 31:2588-2598.
- Sarkar S., Martinez A. T., Martinez M. J.** 1997. Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1339:23-30.
- Schmitke J. L., Wescott C. R., Klibanov A. M.** 1996. The mechanistic dissection of the plunge in enzymatic activity upon transition from water to anhydrous solvents. *Journal of American Chemical Society* 118:3360-3365.
- Serdakowski A. L., Dordick J. S.** 2008. Enzyme activation for organic solvents made easy. *TRENDS in Biotechnology* 26:48-54
- Stocks S. J., Jones A. J. M., Ramey C. W., Brooks D. E.** 1986. A fluorometric assay of the degree of modification of primary amines with polyethylene glycol. *Analytical Biochemistry* 154:232-234.

**Sundaramoorthy M., Terner J., Poulos T. L.** 1995. The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure* 3:1367-1377.

**Sundaramoorthy M., Terner J., Poulos T. L.** 1998. Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies. *Chemistry & Biology* 5:461-473.

**Tamura K., Nakamura M., Murakami S.** 1997. Excess volumes of water + acetonitrile and water + dimethylsulfoxide at 30°C and the effect on the excess thermal expansivity coefficients on derived thermodynamic properties. *Journal of Solution Chemistry* 26:1199-1207.

**Térres E., Montiel M., Le Borgne S., Torres E.** 2008. Immobilization of chloroperoxidase on mesoporous materials for the oxidation of 4,6-dimethyldibenzothiophene, a recalcitrant organic sulfur compound present in petroleum fractions. *Biotechnology Letters* 30:173-179.

**Torres E., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R.** 1996. Solvent hydrophobicity predicts biocatalytic behaviour of lignin peroxidase and cytochrome *c* in aqueous solution of water-miscible organic solvent. *Journal of Biotechnology* 49:59-67.

**Torres E., Siminovich B., Barzana E., Vazquez-Duhalt R.** 1998. Thermodynamic hydrophobicity of aqueous mixtures of water-miscible organic solvents predict peroxidase activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 4:155-159.

**Valderrama B., Ayala M., Vázquez-Duhalt R.** 2002. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry and Biology* 9:555-565.

**Valtz A., Teodorescu M., Wichterle I., Richon D.** 2004. Liquid densities and excess molar volumes for water + diethylene glycolamine, and water, methanol, ethanol, 1-propanol + triethylene glycol binary systems at atmospheric pressure and temperatures in the range of 283.14-363.15 K. *Fluid Phase Equilibria* 215:129-142.

**van Deurzen M. P. J., Remkes I. J., van Rantwijk F., Sheldon R. A.** 1997. Chloroperoxidase catalyzed oxidations in t-butyl alcohol / water mixtures. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 117:329-337.

**van de Velde F., Lourenço N. D., Bakker M., van Rantwijk F., Sheldon R. A.** 2000. Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase. *Biotechnology and Bioengineering* 69:286-291.

**van de Velde F., van Rantwijk F., Sheldon R. A.** 2001a. Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. *TRENDS in Biotechnology* 19:73-80.

**van de Velde F., Bakker M., van Rantwijk F., Sheldon R. A.** 2001b. Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidations in hydrophobic organic media. *Biotechnology and Bioengineering* 72:523-529.

**van de Velde F., Bakker M., van Rantwijk F., Rai G. P., Hager L. P.** 2001c. Engineering chloroperoxidase for activity and stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11:765-769.

**Vazquez-Duhalt R., Westlake D. W. S., Fedorak P. M.** 1994. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Applied and Environmental Microbiology* 60:459-466.

**Vinu A., Hossian K. Z., Srinivasu P., Miyahara M., Anandan S., Gokulakrishnan N., Mori T., Ariga K., Balasubramanian V. V.** 2007. Carboxy-mesoporous carbon and its excellent adsorption capability for proteins. *Journal of Materials Chemistry* 17:1819-1825.



- Wang Y., Vazquez-Duhalt R., Pickard M. A.** 2001. Effect of growth conditions on the production of manganese peroxidase by three strains of *Bjerkandera adusta*. *Canadian Journal of Microbiology* 47:277–282.
- Wang Y., Vazquez-Duhalt R., Pickard M. A.** 2002. Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Current Microbiology* 45:77–87.
- Wang Y., Vazquez-Duhalt R., Pickard M. A.** 2003. Manganese–lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 675–682.
- Welinder K. G.** 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2:388–393.
- Westcott C. R., Noritomi H., Klivanov A. M.** 1996. Rational control of enzymatic enantioselectivity through solvation thermodynamics. *Journal of American Chemical Society* 118: 10365–10370.
- Yoshida S., Watanabe T., Honda Y., Kumahara M.** 1997. Effects of water-miscible organic solvents on the reaction of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2:243–251.
- Yoshida S., Chatani A., Honda Y., Watanabe T., Kumahara M.** 2000. Reaction of manganese-dependent peroxidase from *Bjerkandera adusta* in aqueous organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9:173–182.
- Zaks A., Klivanov A.** 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science* 224:1249–1251.
- Zaks A., Klivanov A.** 1986. Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs. water is reversed. *Journal of American Chemical Society* 108:2767–2768.
- Zaks A., Klivanov A.** 1988. The effect of water on enzymatic action in organic media. *The Journal of Biological Chemistry* 263:8017–8021.
- Zhang L-H, Bai C-H, Wang Y-S, Jiang Y-C, Hu M-C, Li S-N, Zhai Q-G.** 2009. Improvement of chloroperoxidase stability by covalent immobilization on chitosan membranes. *Biotechnology Letters* 31:1269–1272.

### INGENIERÍA DE SOLVENTES PARA LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EMPLEANDO PEROXIDASAS

Berenice Trujillo Martínez, Rafael Vázquez Duhalt, Marcela Ayala Aceves. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001. C.P. 62210. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. Fax (+777)3172388. beniche@ibt.unam.mx

*Palabras clave: ingeniería de solventes, peroxidasa, coeficiente de actividad termodinámica*

**Introducción.** La peroxidasa versátil (VP) de *Bjerkandera adusta* presenta actividad de lignino y manganoso peroxidasa y es capaz de oxidar compuestos aromáticos en presencia de solventes orgánicos (1). La partición desfavorable del sustrato hacia la enzima es uno de los problemas relacionados con la catálisis en solventes orgánicos (2). La ingeniería de solventes permite seleccionar el solvente apropiado mediante una serie de criterios que toman en cuenta las propiedades tanto del solvente como del sustrato (3). En este trabajo se emplea el coeficiente de actividad termodinámica (3) con el fin de seleccionar el solvente más adecuado para la oxidación de compuestos orgánicos empleando a la VP.

**Metodología.** Se estimaron los coeficientes de actividad termodinámica ( $\gamma_S$ ) mediante la relación  $\gamma_S=1/SV_m$  (1), empleando un sustrato modelo: 9-metilantraceno (9MA) en solventes miscibles en agua: dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo (ACN) y tert-butanol (t-BUT), calculando la solubilidad del sustrato (S) en mezclas de solvente-agua. Se evaluó la estabilidad y actividad específica de la enzima en presencia de cada solvente orgánico. Todos los experimentos se hicieron al menos por triplicado.

**Resultados y discusión.** La relación entre la eficiencia catalítica de la enzima y el coeficiente de actividad termodinámica del sustrato ( $\gamma_S$ ) en dos solventes (A y B) diferentes es (3):

$$\frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_A}{\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_B} = \frac{\gamma_{SA}}{\gamma_{SB}}$$

Dicha ecuación indica que es posible predecir en qué solvente se favorecería la actividad de la enzima, conociendo  $\gamma_S$ . El cuadro 1 contienen los coeficientes de actividad termodinámica ( $\gamma_S$ ) calculados a partir de la solubilidad de 9-MA en los solventes DMSO, ACN y t-BUT a concentraciones diferentes, desde 0 a 100%.

Cuadro 1. Coeficiente de actividad termodinámica para 9MA

% Solvente	ACN	ln $\gamma$ DMSO	t-BUT
0	17.22	17.22	17.22
20	13.27	13.35	13.40
50	8.65	10.52	7.84
100	3.97	1.11	5.38

Los resultados indican que el DMSO es el solvente más adecuado, debido a que un valor mayor de  $\gamma_S$  indicaría una partición más favorable. Para determinar el efecto de la concentración del solvente sobre la estabilidad de la VP, se midieron las constantes de inactivación en presencia de 50% v/v de cada solvente (Cuadro 2). De este cuadro, se puede inferir que para DMSO, el valor de actividad específica depende únicamente de la partición del sustrato hacia la enzima y no del efecto del solvente, como el caso del ACN y t-BUT. Tanto el  $\gamma_S$  como la  $k_{inactivación}$  demostraron que el DMSO es un buen solvente para llevar a cabo la oxidación de 9MA. Al medir la actividad de la enzima en las diferentes mezclas, se observa que en DMSO, la actividad es mayor que en t-BUT (2.3 veces) y ACN (2.8 veces).

Cuadro 2. Constante de inactivación y actividad específica de VP con 9-MA

50% Solvente	*Actividad residual (%)	$k_{inactivación}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Actividad específica c/9MA ( $\text{min}^{-1}$ )
DMSO	96.6	-6.0E-5	71.3
t-BUT	86.6	-1.4E-3	30.7
ACN	15.1	-5.6E-2	25.1

\* 1 hr de incubación en la mezcla con 50% solvente

**Conclusiones.** La estimación del  $\gamma_S$  es una herramienta útil para la selección de un solvente adecuado para las peroxidases. Basándonos en el  $\gamma_S$ , la estabilidad y la actividad específica, el solvente DMSO resultó ser el conveniente para llevar a cabo la oxidación de 9MA, con una actividad mayor a la reportada en 1 y 2.

**Agradecimiento.** Al proyecto Conacyt 56718 y a la Biol. Rosa Román por su apoyo técnico.

#### Bibliografía.

- (1) Wang, Y, Vázquez-Duhalt, R, Pickard, M. A. (2003). Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Can J Microbiol.* 49:675-682
- (2) Ryu, K, Dordick J. S. (1992). How do organic solvents affect peroxidase structure and function? *Biochem.* 31:2588-2598
- (3) Schmitke, J. L, Wescott, C. R, Klibanov, A. M. (1996). The mechanistic dissection of the plunge in enzymatic activity upon transition from water to anhydrous solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3360-3365

