



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

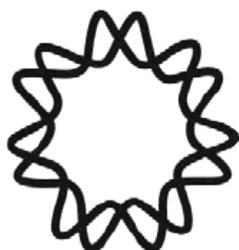
---

**OXIDACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS  
VOLÁTILES UTILIZANDO LA CLOROPEROXIDASA DE  
*Caldariomyces fumago***

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

**IBQ. JULIO CÉSAR CRUZ DE LA CRUZ**



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.

A mi querida esposa Carmen Adriana.

A la familia Cruz.

A la memoria de Winny.

..//..

## AGRADECIMIENTOS

A la Dr. Marcela Ayala Aceves por la confianza, paciencia, asesoría y dirección durante el desarrollo del proyecto.

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

Al comité tutorial: Dr. Edmundo Castillo Rosales y Dr. Leobardo Serrano Carreón, por el aporte y acertadas observaciones durante el trascurso del proyecto.

A los miembros del comité revisor y jurado: Dr. Agustín López Munguía Canales, Dra. María Brenda Valderrama Blanco, Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera y Dr. Jorge Luis Folch Mallol. Por su ayuda en el perfeccionamiento de la tesis.

Al apoyo técnico: Biol. Rosa Román Miranda, Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani, QFB. Myriam Ortiz García y Biol. Carlos Mario Caro, por su asistencia técnica.

Al programa de becas para estudios de posgrado otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). 2008-2010.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN212510.

A mis compañeros de laboratorio.

A la beca Cruz Morales por el apoyo incondicional.

Con especial cariño y afecto a Carmen Adriana por la motivación, apoyo y compañía aligerando las horas de trabajo.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....	4
RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
I. ANTECEDENTES .....	9
<b>1.1 Emisión de CAV's y su papel como contaminantes</b> .....	9
<b>1.2 Uso de enzimas en reacciones en fase gas</b> .....	13
<b>1.3 Cloroperoxidasa (CPO) de <i>Caldariomyces fumago</i></b> .....	23
<b>1.4 Inmovilización enzimática</b> .....	27
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	34
III. PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	35
<b>3.1 Materiales.</b> .....	35
<b>3.2 Equipo.</b> .....	36
<b>3.3 Métodos.</b> .....	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	79
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
ANEXOS .....	93
ARTÍCULO EN PREPARACIÓN .....	95

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades de compuestos azufrados volátiles más comunes.....	10
<b>Tabla 2.</b> Métodos de tratamiento utilizados para el control de CAV's.....	11
<b>Tabla 3.</b> Revisión bibliográfica de enzimas estudiadas y activas en sistemas de reacción sólido-gas. ....	21
<b>Tabla 4.</b> Principales parámetros que condicionan la actividad enzimática en sistemas de reacción sólido-gas. ....	18
<b>Tabla 5.</b> Actividad específica de la CPO con compuestos azufrados no volátiles.	26
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de conversión de dialquil sulfóxidos mediado por la CPO. ...	26
<b>Tabla 7.</b> Ventajas y desventajas de los biocatalizadores inmovilizados. ....	29
<b>Tabla 8.</b> Coeficientes de extinción molar para CAV's y peróxido de hidrógeno. ...	41
<b>Tabla 9.</b> Compuestos azufrados seleccionados como sustratos para la CPO.....	43
<b>Tabla 10.</b> Actividad específica de la CPO en la oxidación de CAV's. ....	46
<b>Tabla 11.</b> Valores cinéticos de la CPO catalizando CAV's. ....	50
<b>Tabla 12.</b> Productos de reacción en solución mediada por la Cloroperoxidasa...	54
<b>Tabla 13.</b> Propiedades físicas de CAV's y los productos generados por la reacción.....	55
<b>Tabla 14.</b> Coeficientes de extinción molar para el propanetiol, etil sulfuro y dimetil disulfuro.....	58
<b>Tabla 15.</b> Determinación de concentración molar en fase gas de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	60
<b>Tabla 16.</b> Determinación de concentración en fase gas de CAV's. ....	61
<b>Tabla 17.</b> Actividad retenida de la preparación enzimática CPO-PUR. ....	64
<b>Tabla 18.</b> Efecto de la sacarosa en la homogeneidad del biocatalizador. ....	65
<b>Tabla 19.</b> Actividad retenida de la preparación enzimática CPO-FV. ....	66
<b>Tabla 20.</b> Condiciones de temperatura humedad relativa y pH en el sistema sólido-gas.....	69

<b>Tabla 21.</b> Adsorción de sustrato en el biocatalizador CPO-FV. ....	74
<b>Tabla 22.</b> Ion espectral del DMDS estándar. ....	76
<b>Tabla 23.</b> Identificación de los productos de reacción en el control en fase gas... 76	76
<b>Tabla 24.</b> Identificación de los productos de reacción en fase gas. ....	77
<b>Figura 1.</b> Ciclo catalítico de la cloroperoxidasa. ....	25
<b>Figura 2.</b> Inmovilización covalente de enzimas dentro de poliuretano.....	31
<b>Figura 3.</b> Sistema para determinar concentración molar en aire de los sustratos. 40	40
<b>Figura 4.</b> Sistema de reacción en fase gas.....	42
<b>Figura 5.</b> Cromatogramas de HPLC que muestran la desaparición de sustrato mediado por la actividad enzimática de CPO.....	45
<b>Figura 6.</b> Comparación entre las velocidades reacción química, enzimática y total para la conversión de CAV's.....	47
<b>Figura 7.</b> Gráficos usados para calcular las constantes cinéticas $k_{cat}/K_m$ y $k_q$ ... 48	48
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas y espectros de masas para los productos de reacción del etil sulfuro, dimetil disulfuro y propanetiol.....	53
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas y espectros de masas para los productos de reacción del butanetiol, hexanetiol y bencenotiol.....	54
<b>Figura 10.</b> Mecanismo propuesto para la oxidación de compuestos azufrados bivalentes mediado por la CPO.....	56
<b>Figura 11.</b> Correlación entre propanetiol y su absorbancia para calcular el coeficiente de extinción molar mediante la ecuación de Lambert-Beer.....	59
<b>Figura 12.</b> Correlación entre la concentración de $H_2O_2$ en gas con respecto a la concentración en el reservorio de volatilización. ....	60
<b>Figura 13.</b> Determinación de la concentración en fase gas de peróxido de hidrógeno.. ....	62
<b>Figura 14.</b> Tabla psicrométrica para calcular la humedad relativa.....	67

<b>Figura 15.</b> Reservorio para mantener la humedad relativa del sistema.....	68
<b>Figura 16.</b> Concentración en fase gaseosa de los sustratos a la salida del sistema. .....	72
<b>Figura 17.</b> Perfil de moles acumulado de sustratos en el catalizador.....	73
<b>Figura 18.</b> Perfil de adsorción de DMDS y moles acumulados de sustratos en el catalizador.....	73
<b>Figura 19.</b> Cromatografía de gases de las muestras extraídas del biocatalizador basado en fibra de vidrio..	75

## ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
Aw	Actividad termodinámica del agua
CAV's	Compuestos azufrados volátiles
CoCl <sub>2</sub>	Cloruro de cobalto
CPO	Cloroperoxidasa
CV's	Compuestos volátiles
DCM	Diclorometano
DL <sub>50</sub>	Dosis letal
DMDS	Dimetil disulfuro
$\epsilon$	Coefficiente de extinción
FV	Fibra de vidrio
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Gox	Glucosa oxidasa
<i>h</i>	Gramos de agua sobre gramo de proteína
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HR	Humedad relativa
IPR-MUS	Dosis intraperitoneal en ratón
K <sub>q</sub>	Constante de velocidad química
LBADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>
MDI	Diisocianato difenil metileno
ORAL RAT	Dosis oral en ratas
PUR	Poliuretano
R <sub>z</sub>	Índice de pureza
R <sub>2</sub>	Coefficiente de correlación
TDI	Diisocianato de tolueno
SBA-15, SBA-16	Materiales de silica mesoporosa
AL-MSM-41	Material de silica mesoporoso

## RESUMEN

Este trabajo de investigación se realizó con el propósito de estudiar un sistema de reacción en fase sólido-gas para la oxidación de compuestos azufrados volátiles (CAV's), utilizando como catalizador la enzima cloroperoxidasa (CPO) del hongo *Caldariomyces fumago*. Este tipo de compuestos representan un problema de contaminación atmosférica debido a su volatilidad y su carácter maloliente. La CPO ha demostrado ser una enzima muy versátil capaz de catalizar diversas reacciones, algunas de interés industrial y en particular para el campo de la biorremediación. Entre estas reacciones se encuentran, la halogenación, deshidrogenación, dismutación de peróxido de hidrógeno y peroxigenación. Mediante su actividad de peroxigenasa, se ha reportado que la CPO puede catalizar la oxidación de compuestos organoazufrados no volátiles. En este trabajo, se comprobó que la CPO es capaz de catalizar la oxidación de sulfuros y tioles volátiles para formar sulfóxidos y disulfuros, respectivamente, en solución acuosa a pH 6. Esta última reacción es novedosa, ya que en la literatura no existe información sobre la capacidad de la CPO de catalizar la reacción de oxidación de tioles para generar disulfuros. Los productos de reacción son menos volátiles que los sustratos, lo cual reduce el carácter de contaminante atmosférico de estos compuestos azufrados. Finalmente, en este trabajo se implementó un sistema para explorar la capacidad de la CPO de catalizar reacciones de sulfoxidación en fase sólido-gas. Se controlaron parámetros como humedad relativa, carga enzimática del biocatalizador y concentración en fase gas y en fase sólida de los sustratos. Se encontró evidencia con un compuesto modelo, el dimetil disulfuro, de que la enzima es capaz de catalizar la reacción de sulfoxidación en este tipo de sistemas. Esta aplicación para una peroxidasa no ha sido descrita antes, por lo que representa un avance importante en el campo de la biocatálisis en fase sólido-gas.

## INTRODUCCIÓN

La emisión de gases contaminantes a la atmósfera tiene serias repercusiones ambientales, que van desde problemas globales como el adelgazamiento de la capa de ozono, hasta aquellos de menor magnitud. Un caso es el de los compuestos que son contaminantes por tener olores desagradables; como ejemplo de estos últimos se encuentran los compuestos azufrados volátiles (CAV's), que principalmente se caracterizan por su mal olor. Actualmente se cuenta con tecnologías de tratamiento de gases residuales para reducir la emisión de CAV's, sin embargo; por sus características (*i.e.*, complejidad química, baja concentración y altas velocidades de flujo) no existe un procedimiento que proporcione completo control sobre ellos, incluso usando de manera complementaria tratamientos fisicoquímicos y biotecnológicos; estos últimos se basan principalmente en el uso de células completas. En el campo de la biotecnología el uso de enzimas como catalizadores en la detoxificación de efluentes gaseosos ha sido poco explorado. En las últimas décadas se han realizado numerosos esfuerzos en el estudio de medios de reacción no convencionales que permitan el uso de enzimas de manera eficiente en procesos que tengan un mayor potencial para su aplicación industrial. Estas alternativas han sido el uso de sistemas multifásicos, fluidos supercríticos, líquidos iónicos y solventes orgánicos donde la constante es el catalizador biológico funcionando a bajos niveles de hidratación. Algunos de los parámetros clave para lograr la biocatálisis en estos sistemas pueden ser importantes también para la actividad enzimática en sistemas de fase sólido-gas. En la sección de antecedentes se presenta una revisión bibliográfica sobre el problema de contaminación que representan los CAV's. Posteriormente se revisa y discute el uso de enzimas en sistemas de fase sólido-gas; en la última parte, se presentan los antecedentes que justifican el estudio de la enzima cloroperoxidasa (CPO) para catalizar la oxidación de CAV's. Se hace mención también de las estrategias de inmovilización que se encuentran reportadas en la literatura para esta enzima, debido a que en este trabajo fue necesaria la obtención de un biocatalizador en fase sólida.

## I. ANTECEDENTES

### ***1.1 Emisión de CAV's y su papel como contaminantes***

La contaminación del medio ambiente se presenta a distintos niveles, es decir; se ven impactados mares, tierra, y atmósfera. Además, involucra un amplio intervalo de afectaciones que van desde problemas globales hasta aquellos no menos importantes pero que se manifiestan de manera local. (Finlayson-Pitts y Pitts, 1997). La emisión de gases a la atmósfera es un claro ejemplo de tal fenómeno, en particular los compuestos azufrados volátiles (CAV's), entre los cuales se encuentran principalmente el sulfuro de hidrógeno, dimetil sulfuro, dimetil disulfuro, metanetiol, carbón disulfuro, y carbonil sulfuro. De estos, el sulfuro de hidrógeno, metanetiol y carbonil sulfuro son gases a temperatura ambiente y presión atmosférica, mientras que los demás son líquidos volátiles bajo esas mismas condiciones.

Los CAV's son liberados a la atmósfera a través de fuentes naturales o fuentes derivadas de la actividad humana, como la producción de gas, plantas de tratamiento de aguas residuales, composteo, plantas químicas, procesamiento de alimentos, industria del papel, industria petrolera y actividades bioindustriales (Smet et al., 1998). La emisión de CAV's está relacionada principalmente con la degradación de compuestos orgánicos que contienen azufre tales como sulfolípidos y aminoácidos como metionina, cisteína y sus derivados, aunque también pueden formarse al exponerse la materia orgánica a fuentes de calor y durante los procesos aeróbicos (e.g., composteo) debido a la formación de micro sitios anaeróbicos y la actividad microbiana asociada a estos ambientes (Smet y Langenhove, 1998). En la tabla 1 se muestran algunas características de los CAV's más comunes.

El alto grado de corrosividad y el característico mal olor convierten a los CAV's en un verdadero problema de contaminación. Schiffman y Williams (2005) hacen una extensa revisión donde mencionan que el umbral de irritación (*i.e.*, concentración a

la cual aparecen los primeros síntomas toxicológicos clásicos) para los compuestos azufrados tiende a ser tres o cuatro órdenes de magnitud por arriba de umbral de detección (*i.e.*, la concentración mínima a la que un compuesto ya es perceptible en el ambiente por el sistema olfativo). Los bajos valores en el umbral de detección y la baja calidad hedónica de los CAV's implican que aún a pequeñas concentraciones en el ambiente, no tóxica para los humanos, dan lugar a olores desagradables (característicos de la putrefacción, huevo podrido, col y otros vegetales descompuestos, fétido y pungente) que pueden constituir un importante problema de salud pública, al crear condiciones inhóspitas para los trabajadores y personas que viven cerca de las industrias que emiten CAV's; también pueden causar problemas operacionales al corroer los equipos (*e.g.*, compresores, pipas y tuberías). Además, a niveles por encima del umbral de detección pueden ser perjudiciales para la salud humana, causando náuseas, dolores de cabeza, irritación en ojos, problemas respiratorio y síntomas neuropsicológicos (Andersson et al., 2004; Schiffman y Williams, 2005).

**Tabla 1.** Propiedades de compuestos azufrados volátiles más comunes.

<b>CAV's</b>	<sup>a</sup> <b>Umbral de detección (µg/m<sup>3</sup>)</b>	<sup>b</sup> <b>Punto de ebullición (°C)</b>	<sup>c</sup> <b>Presión de vapor (mmHg@20 °C)</b>
Metanetiol	70	6	1276
Etanetiol	8.7	35	442
Dimetil sulfuro	30,000	38	398
Propanetiol	13	67	122
Etil sulfuro	33	90	50
Dimetil disulfuro	2,200	109	22

<sup>a</sup>(Nagata, 1988),

<sup>b</sup>([www.sciencelab.com](http://www.sciencelab.com), [www.mathesongas.com](http://www.mathesongas.com), [www.chemblink.com](http://www.chemblink.com), [www.thegoodscentscopy.com](http://www.thegoodscentscopy.com), [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com), [www.lookchem.com](http://www.lookchem.com), [www.wku.edu](http://www.wku.edu), [msds.chem.ox.ac.uk](http://msds.chem.ox.ac.uk))

<sup>c</sup>([www.scribd.com](http://www.scribd.com))

Actualmente existen diversas estrategias tecnológicas para el control de CV's (compuestos volátiles, incluyendo azufrados); a pesar de ello, no se ha establecido un proceso eficaz que garantice la eliminación total de estos compuestos debido al gran número de factores que implica su tratamiento, por ejemplo: la composición cuantitativa y cualitativa de los CAV's, (*i.e.*, generalmente no se encuentran como agentes contaminantes solitarios sino en mezclas complejas de gases), altas velocidades del flujo, bajas concentraciones y complejidad química. También influyen factores relacionados con la inversión y costo de las tecnologías, como es el caso de la incineración, la cual es un método bastante eficaz pero considerablemente caro (Smet y Langenhove, 1998). Las tecnologías existentes para el tratamiento de efluentes contaminados con CV's pueden dividirse en fisicoquímicos y biotecnológicos. Usualmente es necesario aplicar una combinación de ellos para lograr resolver el problema lo más eficazmente posible. La depuración química y los bio-filtros son los métodos más usados. La tabla 2 muestra algunas de estas tecnologías utilizadas en el tratamiento de gases y aguas residuales.

**Tabla 2.** Métodos de tratamiento utilizados para el control de CAV's.

<b>Clasificación</b>	<b>Método de tratamiento</b>
Biotecnológico	Biofiltros
	Biodepurador
	Tratamiento con lodos activados
Fisicoquímico	Tratamientos térmicos
	Depuración (catalítica, alcalina y oxidativa)
	Absorción

(Smet et al., 1998).

Se ha reportado que la transformación de compuestos azufrados hasta niveles muy bajos se ve favorecida usando estrategias como oxidación, adsorción, destilación, y extracción (Ayala et al., 2000; Otsuki et al., 2000). El diseño de los sistemas para

eliminar CV's por cualquiera de las estrategias mencionadas previamente van desde el uso de simples filtros y sistemas de aeración apropiados, hasta el uso de agentes químicos (e.g., hipoclorito, ozono y permanganato de potasio; entre otros), absorbentes como sílica gel, carbón activado, zeolitas, alúmina, etc., la incineración y agentes enmascarantes del olor, como terpenos (Smet et al., 1998). Por el lado de la biotecnología, el uso de microorganismos degradadores de compuestos azufrados ha sido ampliamente estudiado, obteniéndose considerable éxito con la utilización consorcios de organismos provenientes de lodos activados (sedimentos de aguas residuales) o con el uso de cultivos puros de bacterias degradadoras de compuestos azufrados como *Thiobacillus* ssp., *T. thioparus*, *Hyphomicrobium* sp. y *Methanosarcina barkeri* sp., por mencionar algunos. Sin embargo, en concentraciones elevadas los CAV's han demostrado ser tóxicos para los organismos que los degradan, inhiben su crecimiento y como consecuencia su actividad, representado así una desventaja y desafío para el diseño de métodos de biotratamientos de CAV's. En algunos casos, el uso de microorganismos o células completas complica los procesos biotecnológicos, al introducir en el sistema la necesidad de mantener su maquinaria metabólica viable en todo momento, para ser utilizadas eficazmente en el tratamiento de efluentes contaminados (De Bo et al., 2003; Jan Sipma et al., 2003).

Los métodos fisicoquímicos también presentan ciertas desventajas, siendo algunas de ellas la gran cantidad de reactivos que se necesitan, la ocurrencia reacciones secundarias, el tamaño de las instalaciones requeridas o el costo de estas últimas. Por lo tanto, es necesario encontrar un balance entre las distintas metodologías ya existentes con el fin de implementar sistemas más eficientes o el diseño de nuevas tecnologías enfocadas al tratamiento de CAV's y así evitar los problemas que éstos representan a la salud humana, la industria y el medio ambiente.

## **1.2 Uso de enzimas en reacciones en fase gas**

El amplio número de reacciones que catalizan las enzimas y las condiciones en las que se desempeñan las han convertido en el objeto de diversos estudios, dirigidos en su mayoría al mejoramiento de enzimas como biocatalizadores para su uso a nivel industrial. La mayoría de las investigaciones sobre biocatálisis se basan en el uso de microorganismos o enzimas en ambientes acuosos. Sin embargo, muchos de los sustratos y productos de interés en algunas industrias son volátiles o insolubles en fases acuosas; por lo tanto, no siempre es posible usar un biocatalizador en medios convencionales. Algunas estrategias utilizadas para resolver este problema han sido el uso de sistemas multifásicos, sistemas micelares, fluidos supercríticos, líquidos iónicos, solventes orgánicos (Dimoula et al., 2007) o conducir la catálisis enzimática en un medio de reacción que involucre reactantes presentes en una fase gaseosa (Lamare and Legoy, 1993). Esta última metodología representa una atractiva alternativa que combina la ingeniería química con un enfoque biológico y ha mostrado ser efectiva por lo menos en procesos relativamente sencillos, como la determinación y análisis de gases y vapores mediante dispositivos analíticos.

El desarrollo de bio-reactores sólido-gas amplía el panorama y confiere potencial para el uso de enzimas como biocatalizadores en procesos a gran escala en sistemas de reacción no convencionales (Barzana et al., 1987; Dimoula et al., 2007). Sin embargo, el uso de enzimas en sistemas en fase sólido-gas debe acoplarse con otras técnicas como la inmovilización o el uso de enzimas liofilizadas para favorecer la catálisis, ya que métodos en los que el biocatalizador se encuentre suspendido en una mezcla de sustrato y vapor de agua permanece relativamente inexplorados, en contraste con aquellos sistemas en los que la enzima es puesta directamente en contacto con un medio acuoso o solvente orgánico.

La biocatálisis en medios de reacción sólido-gas presenta algunas ventajas sobre los sistemas comúnmente usados, es decir; sistemas sólido-líquido o líquido-

líquido. A continuación se describen algunas de las principales características y ventajas de un sistema sólido-gas (Lamare and Legoy, 1993; Sylvain et al., 2005).

- Comúnmente se asume que la transferencia de masa en fase gas es más eficiente que en solución, lo anterior previene que un medio de reacción gaseoso esté limitado por problemas de difusión. Sin embargo, hay evidencia de que esta ventaja puede no aplicar a todos los sistemas enzimáticos sólido-gas, debido a que no todas las enzimas interactúan con el sustrato en fase gaseosa, sino que este debe adsorberse al soporte antes de estar disponible para la enzima (Dimoula et al., 2009).
- No es necesaria la adición de solventes (por lo que se impiden reacciones laterales no deseadas que podrían ocurrir en un sistema líquido). Además, los problemas de solubilidad de productos y sustratos no existe. De esta manera se simplifica la separación, la purificación.
- La inmovilización se vuelve en ocasiones innecesaria o mucho más simple, debido a que el catalizador se encuentra en un estado sólido. Esto facilita la recuperación de manera sencilla del producto. Además, se pueden utilizar aditivos para, mejorar la estabilidad térmica de los biocatalizadores.
- Productos inhibitorios, tóxicos o volátiles puede ser removidos de manera continua. El riesgo de contaminación microbiana es mucho más bajo.

No obstante, el campo de aplicación de sistemas sólido-gas permanece limitado comparado con los sistemas líquidos comúnmente usados, ya que se basa en el carácter volátil de los sustratos y los productos. Las propiedades físicas y químicas de los sustratos y productos de una reacción son por lo tanto de crucial importancia para un sistema sólido-gas, ya que éstas condicionan la eficiencia del proceso. Además, debido a que la humedad relativa del sistema determina la hidratación de la enzima, es necesario encontrar las condiciones apropiadas para

resolver el compromiso que existe entre la actividad termodinámica del agua ( $A_w$ ) y la actividad enzimática. El agua no sólo tiene efectos sobre la velocidad de reacción sino también sobre la termoestabilidad del catalizador (Debeche et al., 2005; Lamare and Legoy, 1993; Sylvain et al., 2005).

La función del agua y su relación con la actividad enzimática puede ser explicada a través de cuatro efectos; primero, el agua por sí misma puede ser requerida como reactante de las reacciones químicas biocatalizadas (e.g., reacciones de hidrólisis) o contribuir a la energía libre de reacción mediante el cambio entrópico generado al unirse la enzima al sustrato y favorecer la reacción (Kornblatt y Kornblatt, 1997). Segundo, las moléculas de agua pueden formar parte integral de la estructura interna de la proteína y proveer interacciones específicas, como puentes de hidrógeno. De esta manera estabilizan la estructura nativa de la proteína (Franks et al., 1993; Gronenborn y Clore, 1997).

Por otro lado, el agua en contacto con la superficie del polipéptido también tiene implicaciones en la función proteica. Hay evidencia de que algunas proteínas sólo llegan a ser activas al alcanzar cierto grado de hidratación. Finalmente, el agua provee un medio fluido para la difusión de los sustratos y productos. En este sentido quedan claros los requerimientos de ciertas reacciones y enzimas de las dos primeras funciones mencionadas anteriormente, no obstante, el uso de agua como medio de difusión no es único, como lo demuestra el uso de solventes orgánicos o medios de reacción gaseosos (Dunn y Daniel, 2004). En este sentido, el proceso de hidratación o disponibilidad de agua de una proteína se puede expresar de distintas maneras. En la literatura se estudia comúnmente el factor “ $h$ ” que representa gramos de agua por gramo de proteína.

Es importante tener algunas consideraciones en mente al hacer uso de cualquiera de estas expresiones (i.e.,  $A_w$  o  $h$ ); por ejemplo, para el caso de la actividad de agua, diferentes proteínas pueden tener distintos grados de hidratación aún cuando estén equilibradas en el mismo valor de HR (humedad relativa), mientras

que para el caso de  $h$ , esta podría representar diferencias significativas en la superficie cubierta por el agua de proteínas de distinto tamaño, por lo que comparar el efecto del mismo valor de  $h$  sobre la actividad enzimática de enzimas de distinta masa molecular puede ser erróneo. Se ha propuesto expresar el fenómeno de la hidratación en relación al cociente molar del agua con respecto a la proteína, sin embargo se tiene un problema similar. La expresión de la hidratación proteica como función de la superficie cubierta por el agua parece ser adecuada. Sin embargo, no existe un consenso del área cubierta por una sola molécula de agua y además el área de la superficie accesible al agua no es siempre conocida (Dunn y Daniel, 2004). En resumen, existen dos factores particularmente importantes a tomarse en cuenta para el diseño de sistemas sólido-gas (enzima-sustrato). El primer factor de importancia es la actividad termodinámica del agua ( $A_w$ ). Este factor es importante porque afecta el estado de hidratación del biocatalizador y por lo tanto su actividad catalítica; además, los casos en los que el agua participa en la reacción, la cantidad de agua determina el equilibrio de la reacción. El segundo factor implica dos parámetros físicos; la temperatura y la presión total del sistema. Ambos afectan la presión parcial de los distintos componentes. El efecto de estos dos parámetros se puede ver reflejado directamente en la actividad del biocatalizador, al determinar la concentración de los sustratos en fase gas.

A continuación se describen algunos ejemplos de investigaciones enfocadas al estudio del efecto del agua (reportado como  $h$ ) sobre la actividad enzimática en sistemas de reacción sólido-gas, que demuestran que la catálisis enzimática es posible en condiciones de bajo contenido de agua. Lind y colaboradores (2004), estudiaron el efecto del agua sobre la actividad hidrolítica de la lipasa B y la estereasa de hígado de cerdo y detectaron actividad enzimática a niveles de 0.052 y 0.029  $h$  respectivamente. Como era de esperarse, la velocidad de hidrólisis aumentó con la hidratación, sugiriendo que el agua juega un papel preponderante al estabilizar la estructura de estas enzimas y facilita la flexibilidad requerida para lograr la máxima actividad. Sin embargo, un bajo contenido de agua no limitó por

completo la actividad de la enzima. Cabe mencionar que es aceptado de manera general que el umbral de hidratación mínimo para detectar actividad enzimática es aproximadamente de 0.2 *h* (Lind et al., 2004).

Por otro lado, en una revisión acerca del uso de sustratos en fase gaseosa para estudiar la catálisis enzimática a niveles de baja hidratación, Dunn y colaboradores (2004) mencionan entre otros ejemplos, que para la enzima alcohol deshidrogenasa de levadura se tenía establecido 0.016 *h* como valor mínimo para detectar actividad enzimática; sin embargo se demostró posteriormente que tiene cierta actividad a niveles cercanos a cero (0.005 *h*). Resultados como los anteriores demuestran que la actividad enzimática aumenta con la hidratación pero ponen en duda la generalización de un umbral a partir del cual la actividad enzimática se pierda completamente, dejando abierto el panorama para el uso de enzimas en condiciones de deshidratación elevada.

A mediados de la década de los ochentas, el uso de células completas o enzimas en sistemas sólido-gas comenzó a ser reportado en la literatura con más frecuencia. El uso de células completas en sistemas sólido-gas tales como *Methylocystis sp.*, *Pseudomonas putida*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Rhodococcus erythropolis* ha sido reportado para la biorremediación de compuestos orgánicos volátiles en gases residuales contaminados (Barzana et al., 1987; Lamare and Legoy, 1993; Lind et al., 2004; Sylvain et al., 2005; Yagi et al., 1969). Diversas enzimas han sido examinadas en condiciones sólido-gas, como la deshidrogenasa de hígado de caballo, la deshidrogenasa de *Sulfolobus solfataricus*, la alcohol oxidasa de *Pichia pastoris*, la alcohol deshidrogenasa de la levadura del pan y enzimas lipolíticas, como lipasas y curtinasas. En la tabla 3 se muestra una lista de la mayoría de las enzimas estudiadas a la fecha en sistemas sólido-gas y las principales condiciones en las que se ha demostrado que son capaces de reaccionar. De estos la humedad relativa, la presión de vapor de los reactantes, pH, temperatura y la concentración de enzima resultan ser los parámetros más relevantes (Tabla 4).

**Tabla 4.** Principales parámetros que condicionan la actividad enzimática en sistemas de reacción sólido-gas.

---

- Carga enzimática
  - Temperatura
  - pH
  - Humedad relativa de sistema
  - Tiempo de residencia
  - Concentración de sustratos en fase gas
- 

En términos del estado de ionización de un catalizador sólido se sabe que este depende del pH de la solución al que estuvo expuesto antes de su preparación. Se ha observado que las preparaciones liofilizadas exhiben un perfil de actividad vs pH similar al de la enzima libre. Dordick y colaboradores (2008) estudiaron este fenómeno mientras investigaban el uso de sales orgánicas simples para aumentar la actividad de preparaciones enzimáticas liofilizadas y usadas en solvente orgánicos. Ellos observaron la dependencia al pH mostrada por una preparación enzimática KCl-CS (subtilisina *carlsberg*, de *Bacillus licheniformis* amortiguada en fosfato orgánico y adicionada con sales de cloruro de potasio). El perfil de pH fue similar al mostrado por la enzima libre, la actividad óptima en la reacción de transesterificación con subtilisina *Carlsberg* en hexano se encontró en la preparación liofilizada a partir de una solución de pH 7.2, este valor de pH es el óptimo para la reacción hidrolítica en solución acuosa (Ru et al., 1999; Serdakowski and Dordick, 2008).

Estos resultados fueron consistentes con los encontrados por Yang y colaboradores (1993), ellos estudiaron a detalle este fenómeno también llamado “memoria de pH” en la subtilisina *Carlsberg* y concluyeron que el pH óptimo de la preparación enzimática (liofilizada) usada en solventes orgánicos generalmente coincide con el pH óptimo en agua, aunque en cierta medida depende del tipo de solvente, el contenido de agua y el método preparación del biocatalizador (Yang et

al., 1993). Este comportamiento también se ha observado en la tripsina y la quimiotripsina, las cuales exhiben valores óptimos en su actividad de transesterificación cuando son liofilizadas en una solución con pH igual al óptimo en agua (Zaks and Klivanov, 1985; Zaks and Klivanov, 1988).

Otro ejemplo de la importancia del pH pero esta vez en reacciones en fase gas es el estudio realizado por Dravis y colaboradores (2000); ellos demostraron el papel que desempeña el estado de ionización a nivel de microambiente en reacciones en fase gas; estudiando la conversión de compuestos alifáticos halogenados de cadena corta catalizada por la haloalcano deshalogenasa de *Rhodococcus rhodochromus* en un medio de reacción gaseoso. Los autores estudiaron el efecto de la trietilamina adicionada de forma gaseosa en su sistema de reacción. Dado que la reacción involucra la formación de un ion haluro y la liberación de protones, se propuso que la trietilamina funcionaría como secuestrador de dichas moléculas formadas en el sitio activo de la enzima, permitiendo de esta manera el recambio de la enzima. Los experimentos mostraron un aumento de actividad de casi 10 veces, dichos resultados sugerían que además de que la trietilamina funge como amortiguador del pH local en el catalizador también mantiene la basicidad del ambiente, es decir, dada su naturaleza básica este compuesto efectúa un cambio en el pH en la microcapa acuosa alrededor de la enzima; esto fue demostrado formulando catalizadores y controlando su pH con amortiguadores orgánicos (Tris-HCl) y sólidos (lisina-lisina monoclorada) previo a la liofilización, simulando el posible intervalo en el que se encuentra el cambio de pH generado por la trietilamina (8-11). Se observó que el perfil de actividad fue similar al de las reacciones que realizadas en presencia de trietilamina.

La importancia de los ejemplos anteriores consisten en que demuestran la influencia del estado de ionización en un catalizador sólido en términos de actividad y que es posible controlarlo, ya sea ajustando el pH de la solución enzimática antes de la inmovilización, o como lo demostró Dravis y colaboradores

(2000) por primera vez, con la adición de un compuesto gaseoso capaz de realizar cambios en el estado de ionización durante la reacción (Dravis et al, 2000).

Otro de los factores importantes y que ha sido poco estudiado es la adsorción del sustrato al soporte o fase sólida en que se encuentra la enzima. Actualmente, sólo existe un ejemplo en la naturaleza de una enzima cuyo sustrato natural es un gas. Yagi y colaboradores (1969) demostraron que la hidrogenasa de *Desulfovibrio desulfuricans* en estado seco es capaz de activarse al unirse a una molécula de hidrógeno y catalizar la conversión de dos formas diatómicas distintas de este compuesto, que difieren en la relación entre los *espines* de sus núcleos (de para-hidrógeno a orto-hidrógeno), tal conversión se realiza sin que protones provenientes de un medio acuoso participen en el mecanismo de reacción. En un artículo posterior los mismos autores demostraron que la hidrogenasa en estado seco puede catalizar la reducción del citocromo  $c_3$  con hidrógeno gaseoso (Kimura et al., 1979a). Para los demás ejemplos citados en la literatura, es de suponerse que la catalisis se lleva a cabo mediante la adsorción del sustrato de la fase gas hacia el biocatalizador.

**Tabla 3.** Revisión bibliográfica de enzimas estudiadas y activas en sistemas de reacción sólido-gas.

No.	Enzima	EC	Sustrato	Presión de vapor del sustrato (mmHg) <sub>@20 °C</sub>	Producto	Presión de vapor del producto (mmHg) @ 20°C	Preparación del biocatalizador
1	Ureasa	3.5.1.5	Urea	NR	Amoniaco, CO <sub>2</sub>	NR	Liofilización
2	Hidrogenasa de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> y <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> .	1.12.2.1	Hidrógeno, ferricitocromo c3	NR	H <sup>+</sup> , ferrocitocromo c3	NR	Liofilización
3	Alcohol oxidasa de <i>Pichia pastoris</i>	1.1.3.13	Etanol	44.6	Acetaldehído	740	DEAE celulosa micro granular
4	Alcohol deshidrogenasa de lavadura de pan	1.1.1.1	n-alcohol	NR	n-aldehído o n-acetona	NR	Liofilización
5	Lipasa pancreática porcina	3.1.1.3	Etanol y Ácido acético	44.6 y 11.0	Acetato de etilo	105	Secado en horno
6	Cutinasa <i>Fusarium solani pisi</i>	3.1.1.74	a) n-propanol+metil propionato b) metil, etil o propil propionato y H <sub>2</sub> O	NR	a) metanol + propil propionato b) metanol, etanol, propanol	NR	Adsorción en "Chromosorb P"
7	Haloalcano deshalogenasa de <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	3.8.1.5	1-clorobutano, 1,3-dicloropropano	80.2 y 27.7	1-butanol y 3-cloro-1-propanol	0.58 y 1.13	Liofilización
8	Alcohol oxidasa	1.1.3.13	Etanol	44.6	Acetaldehído	740	Adsorción en perlas de vidrio
9	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>	1.1.1.2	Acetofenona	0.3	1-fenil-etanol	0.1	Adsorción en perlas de vidrio
10	Lipasa B de <i>Candida rugosa</i>	3.1.1.3	Etil butirato	12.8	Etanol	44.6	Papel de fibra de vidrio
11	Lipasa <i>Pseudomonas cepaciae</i>	3.1.1.3	a) Acetato de etilo + H <sub>2</sub> O, b) Acetato de vinilo y n-propanol	76 ,89.1 y 14.9	a) etanol, ácido acético b) propil acetato + alcohol vinílico	NR	Fibra de carbón y fibra de vidrio no porosos
12	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>	1.1.1.2	Acetofenona	0.3	1-fenil-etanol	NR	Liofilización y soporte en perlas de vidrio

OXIDACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS VOLÁTILES UTILIZANDO LA  
CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago*

Continuación...

No.	Concentración de enzima	Concentración de sustrato	Temperatura de reacción (°C)	Humedad relativa (%)	Flujo	pH	Tiempo de residencia	Presión (Atm)	Referencia
1	NR	Aire saturado	20	60.0 - 85.0	Lote	7.8	1 - 5 h	NR	(Skujins and McLaren, 1967)
2	74 pmo/ml-0.38 nmol/ml	6.2 µmol/ml	30	NR	Lote	7	NR	0.15	(Kimura et al., 1979b; Yagi et al., 1976; Yagi et al., 1969)
3	16-27 mg E / g soporte	NR	50-60	6.0 - 27.0	Lote	7.5	0.5 -20 h	NR	(Barzana et al., 1987)
4	2.5 mg/ml	Aire saturado	22-50	0.0 -100.0	25 ml/min	NR	NR	0.17	(Fangxiao and Alan, 1996a; Fangxiao and Alan, 1996b)
5	NR	Aire saturado	25-55	56.0 - 92.0	Lote	NR	10 h	1	(Hwang and Park, 1997)
6	33 mg/g de soporte	Aire saturado	50-60	5.0 - 60.0	500 µmol/min	7.5	0.5 s	NR	(Sylvain et al., 1997)
7	0.5 mg/ml	Aire saturado	20-45	0.0 - 100.0	Lote	7 a 11	NR	NR	(Bryan C. Dravis, 2000)
8	2100 - 2200 U/kg de soporte	0.0015 - 0.0017 Kmol / m3	25	NR	30 - 60 cm <sup>3</sup> /min	7.5	NR	1	(Hidaka and Matsumoto, 2000)
9	NR	Aire saturado	25-60	50	15 ml/min	NR	NR	NR	(Clara et al., 2004)
10	0.6 mg/cm <sup>2</sup>	NR	20	7.4 - 60.0	Lote	7	0.1 - 0.6 h	NR	(Lind et al., 2004)
11	1-20 mg/g de soporte	Aire saturado	30-60	80	80 ml/min	7	15 s	1	(Debeche et al., 2005)
12	19.8 mg y 0.0021 mg E/mg PV	Aire saturado	40	10.0 - 90.0	15 ml/min	7	NR	NR	(Dimoula et al., 2007; Dimoula et al., 2009)

NR: no reportado.

Entre los pocos trabajos que estudian el factor de adsorción se encuentra el realizado por Dimoula y colaboradores (2009), donde estudiaron por primera vez la adsorción del sustrato en un sistema de reacción sólido-gas utilizando la enzima alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis* como catalizador en estado seco. Dentro de las conclusiones más importantes de su trabajo se encuentra el hecho de que el fenómeno de absorción determina la disponibilidad de sustrato y por tanto la cinética de la reacción. Las variables que afectan principalmente la adsorción son: temperatura, humedad, volatilidad del sustrato, concentración en fase gas e interacción sustrato-soporte (Debeche et al., 2005; Dimoula et al., 2009).

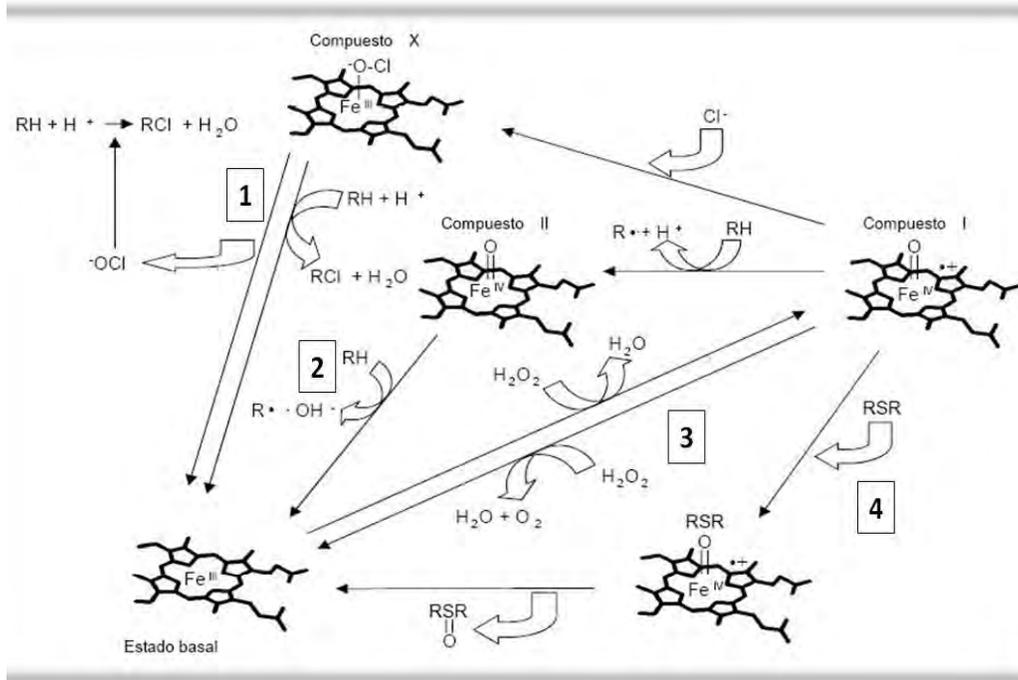
Actualmente se tiene suficiente evidencia de que algunas enzimas son catalíticas en sistemas sólido-gas, pero aún queda bastante que investigar en este campo con el propósito de optimizar sistemas de reacción enzimáticos en condiciones no convencionales. El uso de esta tecnología puede en un futuro cercano ser aplicada en diversos campos como la producción de compuestos volátiles usados como fragancias y aromas, aplicaciones analíticas como biosensores o para la eliminación de compuestos tóxicos de gases residuales (Barzana et al., 1987; Lamare and Legoy, 1993).

### **1.3 Cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago***

La CPO (EC 1.11.1.10) es una hemo proteína monomérica con un peso molecular de 42 kD y glicosilada (18 y 20 %). Esta enzima es secretada por el hongo filamentoso *Caldariomyces fumago*, sus peculiaridades estructurales dificultan clasificarla en comparación con otras hemoperoxidasas de hongos, tales como la lignino peroxidasa, las peroxidasa de *Coprinus cinereus* y la manganeso peroxidasa, entre otras (Welinder, 1992). Las principales diferencias consisten en que la CPO tiene una cisteína (Cys29) como ligando proximal de su grupo prostético (grupo hemo), de manera similar al citocromo P<sub>450</sub>, siendo en las hemo peroxidadas clásicas un residuo de histidina. Además, la cavidad superior del sitio activo es polar y contrasta con el ambiente no polar en el sitio activo del citocromo

P<sub>450</sub>. Estas características hacen de la CPO un híbrido entre dos familias distintas; las peroxidasa y los citocromos P<sub>450</sub>. La CPO también es una peroxidasa inusual con respecto a sus aminoácidos catalíticos, ya que el ácido glutámico (Glu183) localizado en la zona distal del grupo hemo funge como catalizador ácido-base, facilitando la reacción entre la peroxidasa y el peróxido de hidrógeno. En contraste, las hemoperoxidasas clásicas usan como catalizador ácido-base un residuo de histidina o arginina. (Sundaramoorthy et al., 1995).

La CPO es considerada la más versátil dentro de las hemoperoxidasas ya que tiene baja especificidad por sus sustratos y es capaz de catalizar diversas reacciones, entre las cuales están la halogenación [1] (cloración, bromación y yodación) como actividad natural. Además, también puede catalizar reacciones características de otras hemoperoxidasas (deshidrogenación) [2], catalasas (dismutación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [3] y reacciones tipo citocromo P<sub>450</sub> (peroxigenación) [4]. En la figura 1 se muestra ciclo catalítico de la CPO. En su modo catalítico de peroxigenación (ruta 4) la CPO cataliza reacciones de epoxidación de alquenos, hidroxilación bencílica y oxidación de sulfuros orgánicos (Rantwijk y Sheldon, 2000). Debido a su actividad peroxigenasa, la CPO es capaz de llevar a cabo la transformación de compuestos azufrados a sus respectivos sulfóxidos, incluyendo tiofenos, alquil sulfuros y sulfuros aromáticos. Se propone que el mecanismo por el cual se catalizan dichas reacciones involucra la transferencia directa de oxígeno dada por la interacción del sustrato con el compuesto.



**Figura 1.** Ciclo catalítico de la cloroperoxidasa (Valderrama et al., 2002).

Ayala y colaboradores (1998) estudiaron desde un punto de vista ambiental la capacidad catalítica de la CPO para la oxidación de compuestos azufrados en *diesel* primario, ya que éstos constituyen el principal contaminante de este combustible. Los resultados mostraron que la CPO fue capaz de oxidar la mayor parte de la fracción azufrada contenida en el hidrocarburo. La tabla 5 muestra las actividades específicas de la CPO para compuestos aromáticos azufrados modelo (Ayala et al., 2000). Así mismo, se ha estudiado la capacidad de la CPO para oxidar azufrados desde otros enfoques como el de la química fina o farmacéutica.

Colona y colaboradores (1997) estudiaron la síntesis enantioselectiva de dialquil sulfóxidos catalizada por la CPO, ya que los sulfóxidos quirales son intermediarios importantes para la síntesis de ciertos fármacos. La enzima fue capaz de catalizar la oxidación de compuestos ciclo alquil-metilados, alquil-metil azufrados, alquil-aril azufrados y dialquil azufrados, en la mayoría de los casos el exceso enantiomérico rebasó el 95 % para el compuesto de configuración *R*. En la tabla 6 se muestra el

porcentaje de conversión para algunos de estos compuestos (Colonna et al., 1997; Rantwijk y Sheldon, 2000). Los ejemplos anteriores hacen notar que la versatilidad de la enzima no sólo describe la capacidad de la CPO para catalizar una amplia gama de sustratos, sino también ilustran el potencial de aplicación que posee esta enzima y que éste no está limitado sólo a su uso en el campo de la biorremediación.

**Tabla 5.** Actividad específica de la CPO con compuestos azufrados no volátiles.

<b>Sustrato</b>	<b>Actividad específica (min<sup>-1</sup>) *</b>
Tiantreno	1310 ± 132
2,2'-bi-tiofeno	840 ± 8
Difenil sulfuro	831 ± 32
Dibenzotiofeno	129 ± 9
Etil fenil sulfuro	1725 ± 145
Benzenotiol	116 ± 5
Tioanisol	2917 ± 58
Difenil disulfuro	352 ± 10

\* Condiciones de reacción; pH 3, KCl, 20 µM de sustrato, 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ayala et al., 2000).

**Tabla 6.** Porcentaje de conversión de dialquil sulfóxidos mediado por la CPO.

<b>Sustrato</b>	<b>Conversión (%)</b>
Ciclo pentil metil sulfuro	98
Ciclo hexil metil sulfuro	85
Alil metil sulfuro	98
Pentil metil sulfuro	75
Octil metil sulfuro	40
Isopropil metil sulfuro	98
<i>t</i> -Butil metil sulfuro	80

(Colonna et al., 1997)

La baja especificidad de sustrato y las múltiples reacciones que puede catalizar la CPO hacen de esta la enzima más versátil conocida dentro de las hemoperoxidasas y le proporciona un enorme potencial para convertirse en un catalizador industrial importante. Por esta razón, se han realizado numerosos esfuerzos para mejorar el rendimiento y la estabilidad de la CPO. Con este propósito se ha intentado expresar la proteína de manera recombinante, con la finalidad de usar herramientas de mutagénesis sitio dirigida y así lograr un mejor entendimiento de la relación entre su estructura y función (Conesa et al., 2001; van de Velde et al., 2001). También existen ejemplos de modificación química o el uso de antioxidantes con el propósito de mejorar la actividad y estabilidad para su uso a nivel industrial (Grey et al., 2008; Liu and Wang, 2007).

#### **1.4 Inmovilización enzimática**

En este trabajo se implementó un sistema en continuo para la oxidación de CAV's gaseosos catalizada por CPO. Aunque en otros trabajos reportados en la literatura se utilizan sistemas en lote con la enzima simplemente liofilizada, en nuestro caso resultó importante contar con la enzima inmovilizada en un soporte que no genere caídas de presión y minimice la pérdida de la enzima. Por este motivo, fue importante realizar una revisión bibliográfica sobre la inmovilización de enzimas, enfocándonos en lo reportado para la CPO.

Definida como una técnica utilizada para confinar enzimas o células en una cierta región definida de espacio, sin pérdida de actividad catalítica y que puede reutilizarse continua y repetidamente (Katchalski-Katzir, 1993), la inmovilización de enzimas ha emergido con gran auge relativamente en pocos años. La primera enzima inmovilizada y usada a nivel industrial fue reportada en 1967 por Chibata y colaboradores en la compañía japonesa Tanake Seiyaku, quienes desarrollaron columnas de aminoacilasa de *Aspergillus oryzae* para la resolución de DL-aminoácidos a su correspondientes enantiómeros activos. Hasta hoy en día diversos campos en la industria han adoptado en sus procesos este tipo de

metodología. Tales industrias van desde la alimenticia, farmacéutica y química, incluyendo el de la química industrial (Katchalski-Katzir, 1993), como lo demuestra la síntesis enzimática de acrilamida, proceso que fue desarrollado por Yamada y colaboradores en Japón hace algunos años y que sustituyó el proceso químico con una amplia ventaja en reducción de costos e incremento en la producción. Actualmente este proceso genera miles de toneladas de acrilamida al año usando células inmovilizadas.

Ejemplos como los mencionados con anterioridad demuestran que la inmovilización resulta en algunos casos una herramienta efectiva para mejorar el rendimiento de los procesos catalizados enzimáticamente. Sin embargo, la inmovilización como método para obtener mejores rendimientos en producción no es un sistema universal ni aplicable de manera indiscriminada, deben tenerse en cuenta diversos factores (tipo de reacción, enzima, soporte, medio y condiciones de reacción) de los que dependerá la estrategia a seguir.

Existen diversos procedimientos para inmovilizar enzimas, algunos de ellas son:

- Enzimas unidas a un soporte, en donde la enzima es adsorbida o unida de manera covalente.
- Preparaciones donde la enzima es atrapada en geles, fibras o microcápsulas
- Sistemas en los que la enzima es mantenida en solución y separada por una membrana.
- Entrecruzamiento de enzimas o cristales enzimáticos

Las principales ventajas y desventajas de los biocatalizadores inmovilizados se muestran en la tabla 7. Las enzimas inmovilizadas son generalmente muy estables, y frecuentemente más estables que su contraparte soluble. Esto ha permitido a los bioingenieros diseñar una gran variedad de reactores de distinta configuración. Los reactores con enzima inmovilizada gozan de ventajas como

operar en continuo, la posibilidad de inmovilizar altas cargas de biocatalizador, prolongada actividad enzimática, altas velocidades de flujo, reducción en costo, energía y productos de desecho, fácil escalamiento y simplificación del proceso de purificación (Katchalski-Katzir, 1993).

**Tabla 7.** Ventajas y desventajas de los biocatalizadores inmovilizados.

<b>Ventajas</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Fácil operación y control de los reactores</li><li>• Fácil recuperación y purificación del producto</li><li>• Amplia variedad en diseño de reactores</li><li>• Permite el uso en procesos continuos</li><li>• Estabilidad enzimática</li></ul>
<b>Desventajas</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pérdida de actividad</li><li>• Reducción de actividad por unidad de volumen</li><li>• Limitaciones de difusión</li><li>• Costo adicional</li></ul>

(Katchalski-Katzir, 1993).

Debido al interés que se tiene por las reacciones que cataliza la cloroperoxidasa y su potencial de aplicación a escala industrial, esta enzima ha sido objeto de diversos estudios de inmovilización sobre soportes de distinta naturaleza. En general, la CPO ha sido inmovilizada mediante dos estrategias: [1] absorción no covalente en talco (Aoun et al., 1998) y celita (Andersson et al., 1999); [2] inmovilización covalente en perlas de vidrio porosas (Kadima y Pickard, 1990), materiales mesoporosos de silicato (Jung et al., 2008; Terrés et al., 2008), silica gel (Petri et al., 2004), quitosano (Zhang et al., 2009) y poliuretano (Fred van de Velde, 2001). A continuación se mencionan algunos ejemplos de los trabajos hasta ahora realizados; Kadima y Pickard (1990) inmovilizaron de manera covalente esta proteína en vidrio amino propílico, reportaron que no había elución enzimática del catalizador, lo cual permite reusarlo, además de las altas cargas enzimáticas que se lograron inmovilizar (100 mg/g de vidrio). Sin embargo, la preparación enzimática no tuvo la actividad esperada, en comparación con la

enzima libre. Además, no se encontraron diferencias significativas con la enzima soluble en términos de pH-actividad, pH-estabilidad y estabilidad térmica (Kadima y Pickard, 1990). Otra estrategia realizada por Terrés y colaboradores (2008), fue la inmovilización de la CPO en materiales mesoporosos con distintos tamaños de poros; como SBA-16 y Al-MCM-41. Al determinar la actividad y termoestabilidad de las preparaciones, encontraron que la enzima inmovilizada soporta largos tiempos de incubación a 45 °C, de dos a tres veces más que la enzima nativa, pero en términos de actividad la enzima inmovilizada en Al-MCM-41 fue 50 veces menos activa que la enzima libre (Terrés et al., 2008).

Con un enfoque similar, Jung y colaboradores (2008) investigaron la estabilidad operacional de la CPO inmovilizada en SBA-15 durante reacciones de oxidación de indol usando como oxidante el peróxido de hidrógeno. Debido a la inactivación de la cloroperoxidasa por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acoplaron a la reacción la enzima glucosa oxidasa (Gox) para generar peróxido *in situ*. Como resultados obtuvieron que la mezcla SBA-15-CPO y SBA-15-Gox en reacción pudo ser reusada hasta 130 veces sin pérdida significativa de actividad. No obstante, las velocidades de reacción obtenidas fueron bajas debido a que el sistema depende de la generación *in situ* del peróxido de hidrógeno por parte de la glucosa oxidasa, además de que el pH óptimo de la reacción de la CPO y la Gox son diferentes. Este problema podría en principio solucionarse aumentando la concentración de GOx en el medio, sin embargo un aumento drástico en la concentración de peróxido va acompañado de un aumento en la velocidad de inactivación de la CPO (Jung et al., 2008). Por otro lado, Petri y colaboradores (2004) reportaron la inmovilización de la cloroperoxidasa de manera covalente en silica gel. En términos operacionales con respecto a la CPO libre, lograron conseguir una preparación enzimática más estable a pH y agentes oxidantes. Unieron covalentemente alrededor del 43% de enzima disponible para la inmovilización, pero solo obtuvieron 19% de la actividad esperada en el biocatalizador (Petri et al., 2004). El caso más exitoso reportado en la actualidad en términos de carga enzimática y actividad retenida para inmovilización de la CPO es el de Martin Bakker y colaboradores (2001), quienes



de esta técnica es la absorción física de la enzima sobre el soporte, y resulta ser una estrategia fácil y barata, además que ha mostrado ser eficiente para el uso de biocatalizadores en fase gas, debido a que en estas condiciones la desorción de proteína es mínima. La estructura del soporte también influye de manera importante en sistemas de reacción en fase gas, ya que materiales sólidos compactos limitan la difusión, mientras que los materiales fibrosos o porosos permiten fácilmente el paso del gas a través del biocatalizador. Otro parámetro importante es el carácter hidrofóbico o hidrofílico del soporte, lo cual influirá en su interacción con los sustratos y productos. En este sentido los soportes hidrofóbicos son usados preferencialmente en sistemas sólido-gas, debido a que se necesita una pequeña cantidad de agua para alcanzar altos valores de actividad termodinámica (Debeche et al., 2005). El uso de fibras ofrece algunas ventajas con respecto a las clásicas camas empacadas, polvos, perlas o membranas biocatalíticas.

Las fibras tienen macroestructuras abiertas que permiten altas velocidades de flujo y bajas caídas de presión, la transferencia de masa es más eficiente, tienen alta resistencia mecánica, la relación superficie/volumen es mayor y el proceso de escalado se torna sencillo. Debeche y colaboradores (2005) reportaron por primera vez la inmovilización de la lipasa de *P. cepaciae* en soportes estructurados de fibra de vidrio (aluminoborosilicato) y carbón (basado en poliuretano) para su uso precisamente en reacciones en fase sólido-gas. Lograron obtener un catalizador mucho más activo que el obtenido con la misma enzima en otros materiales como perlas de vidrio y membranas de nylon, haciendo suponer que el diseño de fibras puede ser una estrategia con potencial para el uso de biocatalizadores en fase gas.

Por otro lado, Clara y colaboradores (2004) complementaron la inmovilización por adsorción en materiales de vidrio con la adición de polioles o azúcares, con la finalidad de incrementar la estabilidad operacional de los biocatalizadores utilizados en reacciones en fase gaseosa. Se ha demostrado que los polioles,

tales como la sacarosa, estabilizan las preparaciones enzimáticas sólidas, ya que tienden a agruparse alrededor de la proteína y formar puentes de hidrógeno con la superficie de ésta, sustituyendo así el agua. Las moléculas de proteína en consecuencia son más compactas y termodinámicamente más estables, lo que les confiere protección en contra de la desnaturalización térmica (Clara et al., 2004; Iyer y Ananthanarayan, 2008). Algunos grupos de investigación han demostrado que la sacarosa es también capaz de proteger a la enzima de la desnaturalización térmica en altos valores de humedad relativa y en la presencia de reactantes. Además sus resultados indican que la presencia de sacarosa en el catalizador no tiene efecto alguno sobre la actividad catalítica de la enzima. La adición de sacarosa incrementó 40 veces la vida media de la enzima alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis* inmovilizada por adsorción y utilizada por primera vez en catálisis enzimática sólido/gas para producir (R)-1-fenil etanol. La degradación de la enzima fue irrelevante aún en temperaturas operacionales arriba de 50 °C y no se observaron efectos adversos en la actividad de la enzima. Estos resultados hacen notar que las reacciones en fase gas con alcohol deshidrogenasa pueden ser tan efectivas en términos de actividad y estabilidad como las reacciones en medios de reacción líquidos (Clara et al., 2004).

Además de las ventajas que la inmovilización ofrece por sí misma, ésta también permite hacer mejoras o adaptarse a las necesidades de cada proceso, por ejemplo; la inmovilización de enzimas en presencia de polioles o azúcares, antioxidantes, grupos funcionales, cofactores, etc., potencializa el uso de biocatalizadores en sistemas de reacción tanto convencionales como no convencionales. En conclusión, la inmovilización es una herramienta que beneficia la aplicación de enzimas en procesos industriales, confiriéndoles diversas ventajas que les permiten competir con los catalizadores químicos y amplía su espectro de aplicación. Dentro de estas aplicaciones la inmovilización complementa de manera fundamental el uso de enzimas en sistemas de reacción no convencionales como las reacciones en fase sólido-gas, ya que no existe una tecnología donde la enzima se encuentre en estado gaseoso.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

Debido a la baja especificidad de la CPO al catalizar reacciones de oxidación de compuestos azufrados, se plantea que esta enzima será capaz también de oxidar compuestos azufrados volátiles en fase gaseosa.

### Objetivo

Estudiar un sistema de reacción en fase sólido-gas para la oxidación de compuestos azufrados utilizando como catalizador a la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*.

### **Objetivos particulares:**

- Evaluar en términos cinéticos la oxidación de CAV's catalizado por la cloroperoxidasa en solución acuosa.
- Determinar la naturaleza química de los productos.
- Inmovilizar la enzima en soportes apropiados para fase sólido-gas (poliuretano, fibra de vidrio) y caracterizarla.
- Implementar un sistema en fase sólido-gas para la oxidación de CAV's en presencia de CPO
- Estudiar con la CPO los factores que generalmente afectan la actividad enzimática en sistemas sólido-gas: tales como humedad relativa, concentración de sustratos en fase gas, adsorción de sustratos al soporte.

### III. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Materiales.

Enzima.

La cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* (CPO) fue producida y purificada en el laboratorio de acuerdo a Pickard y colaboradores (1991). Se obtuvo un  $R_z$  (absorbancia 403 nm/ absorbancia 280 nm) de 1.2 a 1.4. La CPO pura tiene un  $R_z$  de 1.4 (Pickard et al., 1991).

Reactivos.

Fosfato monobásico de sodio, pentafosfato de sodio, fosfato dibásico de sodio, cloruro de potasio, acetato de sodio, hidróxido de sodio, cloruro de cobalto, acetonitrilo, diclorometano, sacarosa, ácido acético; J.T BAKER.

Acetato de etilo, Guaicol, monoclorodimedona, etil sulfuro, dimetil disulfuro, peróxido de hidrógeno, terbutil hidroperóxido, ABTS, tiosulfato de sodio, brij 35, brij 52, metabisulfito de sodio; SIGMA- ALDRICH.

Propanetiol, etanetiol. FLUKA

Hypol 2002. Donado por Dow de México ([www.dow.com](http://www.dow.com))

### **3.2 Equipo.**

Espectrofotómetro.

Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Beckman *life Science UV/vis* modelo DU®530

Cromatógrafo de líquidos (HPLC).

La cromatografía líquida de alta resolución se realizó en una unidad Perkin Elmer equipada con una bomba serie 200 y un detector UV de arreglo de iodos modelo 235 C. Los datos se analizaron con el software Turbochrom (Perkin Elmer). Se utilizó una columna (2.1 X 100  $\mu\text{m}$ ) Hypersil ODS (Agilent Technologies).

Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).

Se utilizó un cromatógrafo de gases (GC; Agilent, modelo 6809 *network GS system*) acoplado a un espectrómetro de masas (MS; Agilent modelo 5973 *network mass selective detector*)

### **3.3 Métodos.**

a) *Cuantificación de proteína.*

La concentración de proteína se midió usando el método espectrofotométrico Bradford utilizando el reactivo de *Bio-Rad*®. Se preparó la muestra en 800  $\mu\text{L}$  de amortiguador 60 mM de fosfatos pH 6 y se añadió 200  $\mu\text{L}$  del reactivo. Después de 5 minutos se midió la absorbancia a 595 nm. También se calculó la concentración de proteína usando el coeficiente de extinción molar ( $85,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) de la cloroperoxidasa a 398 nm.

*b) Determinación de actividad.*

Ensayo con monoclorodimedona. La mezcla de reacción (1 mL) contenía 870  $\mu\text{L}$  de amortiguador 60 mM de acetatos pH 3, 100  $\mu\text{L}$  de KCl 200 mM, 20  $\mu\text{L}$  de monoclorodimedona 5 mM y 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  200mM. La desaparición de monoclorodimedona fue monitoreada por espectrofotometría. El coeficiente de extinción molar usado para la monoclorodimedona fue de  $12,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 278 nm (Manoj y Hager, 2008).

Ensayo con guaicol. La mezcla de reacción (1 mL) contenía 940  $\mu\text{L}$  de amortiguador 60 mM de fosfatos pH 6, 50  $\mu\text{L}$  de guiacol 100 mM y 10 ó 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  200 mM. La aparición del producto fue monitoreada por espectrofotometría a 470 nm. El coeficiente de extinción molar usado fue de  $26,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . (Manoj y Hager, 2008).

Ensayo con ABTS. La mezcla de reacción (1mL) contenía 960  $\mu\text{L}$  de buffer 60 mM acetatos pH 3, 20  $\mu\text{L}$  de ABTS 50 mM, y 17  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  120 mM. El coeficiente de extinción molar del sustrato es de  $36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La reacción fue monitoreada por espectrofotometría a 414 nm. (Manoj y Hager, 2008).

*c) Oxidación enzimática de los azufrados en solución.*

La velocidad inicial de reacción se determinó en reacciones de 1mL (80% amortiguador 60 mM fosfatos pH 6 y 10% acetonitrilo), con 2 a 100  $\mu\text{L}$  de compuesto azufrado 50 mM y 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  200 mM. El tiempo de reacción fue de 10 minutos y a temperatura ambiente (25 a 30 °C). La transformación fue monitoreada y cuantificada por HPLC mediante la disminución en el área del pico del sustrato a su máxima absorbancia en luz UV.

*d) Extracción e identificación de productos de reacción.*

Para la obtención de productos en solución cada reacción se escaló a 10 mL, se monitoreó por HPLC a una longitud de onda 220 nm usando como eluyente una fase de acetonitrilo (ACN) en agua al 30% a un flujo de 0.5 mL/min. Se monitoreó la desaparición de sustrato, hasta alcanzar más del 70% de conversión aproximadamente. Al término de la reacción los productos fueron extraídos con diclorometano (DCM) o acetato de etilo, se tomó la fase orgánica y se eliminó el exceso de agua con sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), para posteriormente identificar los productos por GC-MS.

*e) Inmovilización.*

CPO-PUR. Se inmovilizó a la CPO en poliuretano usando el protocolo reportado por Martin Bakker y colaboradores (2000). La solución enzimática (2 mL) fue mezclada con Brij-52 (50 $\mu\text{L}$ ; 4%),  $\text{CoCl}_2$  (125  $\mu\text{L}$ ; 1mM), en un tubo para centrifugación Corning de 50 mL. Se añadieron a la mezcla 2 gramos de Hypol 2002 precalentado a 35 °C, la mezcla se agitó vigorosamente por 30 segundos a temperatura ambiente. Después de la polimerización, el tubo se colocó en hielo para evitar la desactivación térmica de la enzima. El polímero se guardó en refrigeración por lo menos dos horas antes de usarse. La espuma finalmente fue lavada con 60 mM de amortiguador de acetatos pH 5 antes de determinar su carga y actividad enzimática (Bakker et al., 2000).

CPO-FV. La inmovilización se realizó a temperatura ambiente en fibra de vidrio comercial, la solución enzimática (1 mL) fue mezclada con sacarosa en un exceso molar de 1,000 con respecto a la enzima. La solución enzima-sacarosa fue añadida de manera uniforme a la fibra de vidrio 2.5  $\text{cm}^2$  aproximadamente e inmediatamente liofilizada y guardada por 24 horas a 4 °C antes de su uso (Clara et al., 2004; Debeche et al., 2005).

*f) Medición de carga y actividad de la enzima inmovilizada CPO-PUR y CPO-FV.*

La cantidad de enzima inmovilizada en poliuretano (PUR ) fue calculada midiendo la diferencia entre la concentración de enzima en los lavados y la enzima total antes de la inmovilización. La actividad halogenasa de la espuma se determinó de manera discontinua en un volumen de 20 mL. La absorbancia fue medida en el espectrofotómetro a una longitud de onda fija de 278 nm mediante el ensayo con monoclorodimedona. Se tomaba un alícuota (1 mL) cada periodo de tiempo establecido arbitrariamente y se medía la absorbancia. Los resultados se graficaron en función del tiempo y se determinó la pendiente por regresión lineal, con los valores de las pendientes se calcularon la actividades específicas para cada muestra de CPO-PUR. Los resultados son el promedio de por lo menos tres mediciones independientes. Para el caso de la CPO inmovilizada en fibra de vidrio se le determinó actividad específica con el ensayo con monoclorodimedona (inciso b) resuspendiendo una porción de la fibra-CPO en amortiguador de fosfatos pH 5.

*g) Determinación del coeficiente de extinción molar de los compuestos azufrados.*

El coeficiente de extinción molar se determinó realizando una serie de diluciones de los compuestos de interés (i.e., propanetiol, etil sulfuro y dimetil disulfuro). Dichas diluciones se hicieron en acetonitrilo en un intervalo de 1 a 5 mM. Posteriormente, midió la absorbancia entre 200 y 300 nm para determinar la máxima absorbancia de cada sustrato. Los valores de absorbancia para cada dilución a la longitud de onda de maxima absorbción de cada compuesto fueron graficados en función de la concentración. Los resultados mostraron un comportamiento lineal, ajustándose a la ecuación de Lambert-Beer en la cual la concentración es proporcional a la absorbancia ( $A=\epsilon CL$ ) donde:

A = Absorbancia

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar

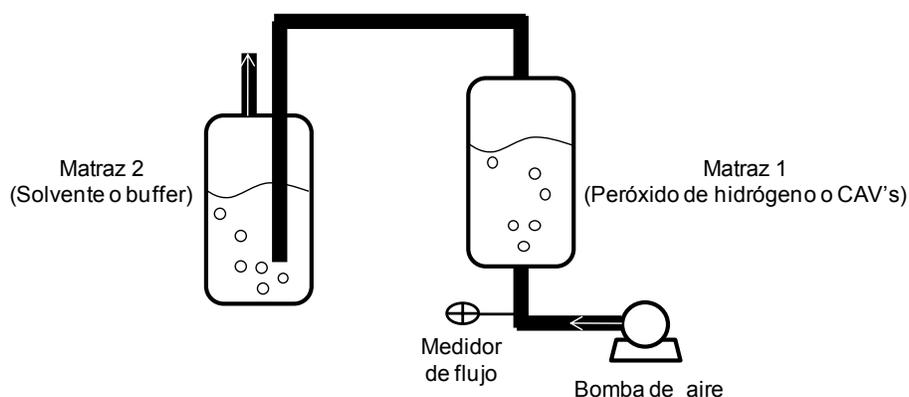
C= concentración

$L$  = distancia que viaja la luz a través de la muestra (1 cm)

La pendiente de la línea ( $\Delta y/\Delta x$ ) es el coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ). El coeficiente de extinción molar se expresa en unidades de  $M^{-1}cm^{-1}$ .

*h) Determinación de concentración en fase gas.*

La concentración molar en gas de los sustratos se calculó correlacionando el flujo de aire pasado a través del reservorio con el sustrato (matraz 1) con la concentración de éste último acumulado en el matraz de recuperación (matraz 2, el cual contenía 50 mL de amortiguador 60 mM fosfatos pH 6 para el caso del  $H_2O_2$  o 50 mL de acetonitrilo para los compuestos azufrados), como se observa en la figura 3. Por el matraz 1, que contenía una concentración bien establecida de sustrato, se hizo pasar un flujo de aire de 10-20 vvm ( $L_{aire}L_{medio}^{-1}min^{-1}$ ), el cual se burbujeó en el matraz 2 de donde se tomó una muestra cada 5 minutos. La muestra se analizó por espectrofotometría y se determinó la concentración de cada compuesto usando la absorbancia y el coeficiente de extinción molar a 240 nm,  $39.9 M^{-1}cm^{-1}$ ; 220 nm,  $120 M^{-1}cm^{-1}$ ; 230 nm,  $170 M^{-1}cm^{-1}$ ; 254 nm,  $384 M^{-1}cm^{-1}$  para el peróxido de hidrógeno, propanetiol, etil sulfuro y dimetil disulfuro respectivamente, tabla 8.



**Figura 3.** Sistema para determinar concentración molar en aire de los sustratos.

**Tabla 8.** Coeficientes de extinción molar para CAV's y peróxido de hidrógeno.

<b>Compuesto</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>Coefficiente de extinción molar (mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)</b>
Propanetiol	220	0.190 ± 0.004
Etil sulfuro	230	0.170 ± 0.006
Dimetil disulfuro	254	0.384 ± 0.009
Peróxido de hidrógeno	240	<sup>a</sup> 0.039

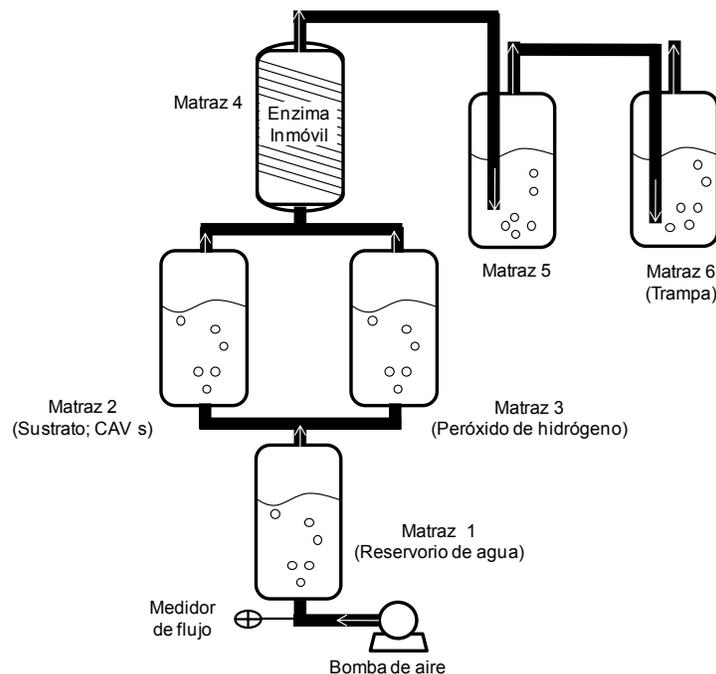
<sup>a</sup> (Noble y Gibson, 1970).

*i) Reacción en fase gas.*

Las reacciones en fase gas se llevaron a cabo usando una cantidad conocida de la preparación CPO-PUR o CPO-FV, con actividad y carga enzimática previamente establecidas. Se utilizaron dos reactores de volúmenes distintos (2 y 10 mL) para las distintas reacciones que se ensayaron. El sistema consistió en (figura 4):

- a) Matraz 1; 1L de agua como reservorio para humidificar la corriente gaseosa y mantener la humedad en el sistema.
- b) Matraz 2; una solución de 15 mL CAV's-acetonitrilo de concentración conocida.
- c) Matraz 3; 15 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 14.6 M.
- d) Matraz 4; Reactor empacado con la preparación enzimática.
- e) Matraz 5; 20 mL de ACN más 100 µL de hexano como compuesto de referencia para los análisis por GC-MS y un exceso de molar de tiosulfato de sodio con respecto a la concentración de peróxido de hidrógeno acumulado durante el tiempo de reacción. La finalidad del tiosulfato fue reducir el peróxido de hidrógeno en exceso y minimizar la oxidación no enzimática en solución.
- f) Matraz 6; Trampa con solvente (Etanol)

El aire de entrada ( $20 \text{ L}_{\text{aire}}\text{L}_{\text{medio}}^{-1}\text{min}^{-1}$ ) se humidificó al pasar por el reservorio de agua (matraz 1), esta corriente húmeda se dividió en 2 ( $10 \text{ L}_{\text{aire}}\text{L}_{\text{medio}}^{-1}\text{min}^{-1}$ , en cada línea) y se distribuyó en el matraz 2 y 3 para ser enriquecida con los sustratos; después ambas corrientes se hicieron converger nuevamente y se hicieron pasar a través del bioreactor (Matraz 4). La corriente gaseosa fue recibida en el matraz de recuperación (matraz 5) y después se hizo pasar por una trampa (Matraz 6) con 1 L de solvente para eliminar cualquier rastro del compuesto azufrado en la corriente gaseosa. Del matraz 5 se tomó una muestra para posteriormente analizar los productos de reacción por GC-MS. El tiempo de muestreo fue de 10 minutos hasta que se consumió todo el volumen en el matraz 2 (1 hora aproximadamente). Al final de la reacción, se recuperó el biocatalizador y se realizó la extracción de los compuestos acumulados en cada preparación enzimática usada en las reacciones en fase gas.



**Figura 4.** Sistema de reacción en fase gas.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Selección de sustratos

Los compuestos utilizados en este trabajo fueron azufrados de carácter volátil (CAV's), siendo la volatilidad el principal criterio para su selección, además de que estuvieran disponibles comercialmente. En la tabla 9 se muestran algunas de sus propiedades como el umbral de detección, punto de ebullición y presión de vapor. Además, todos los compuestos seleccionados tienen una baja calidad hedónica, lo que significa que tienen olores desagradables, comparables a la putrefacción y vegetales descompuestos, son fétidos y pungentes. Las características descritas en el párrafo anterior sumadas a un bajo valor en el umbral de detección y valores de presión de vapor elevado, implican que son perceptibles en el ambiente aún estando en concentraciones del orden de ppm, lo cual les confiere el carácter de compuestos contaminantes.

**Tabla 9.** Compuestos azufrados seleccionados como posibles sustratos para la CPO.

CAV's	<sup>a</sup> Umbral de detección ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	<sup>b</sup> Punto de ebullición ( $^{\circ}\text{C}$ )	<sup>c</sup> Presión de vapor ( $\text{mmHg}_{@20\text{ }^{\circ}\text{C}}$ )
Etanetiol	8.7	35	442
Propanetiol	13	67	122
Etil sulfuro	33	90	50
Butanetiol	2.8	98	45
Dimetil disulfuro	2,200	109	22
Hexanetiol	15	152	4.5

<sup>a</sup> (Nagata, 1988)

<sup>b</sup> ([www.sciencelab.com](http://www.sciencelab.com), [www.mathesongas.com](http://www.mathesongas.com), [www.chemblink.com](http://www.chemblink.com), [www.thegoodscentscopy.com](http://www.thegoodscentscopy.com), [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com), [www.lookchem.com](http://www.lookchem.com), [www.wku.edu](http://www.wku.edu), [msds.chem.ox.ac.uk](http://msds.chem.ox.ac.uk))

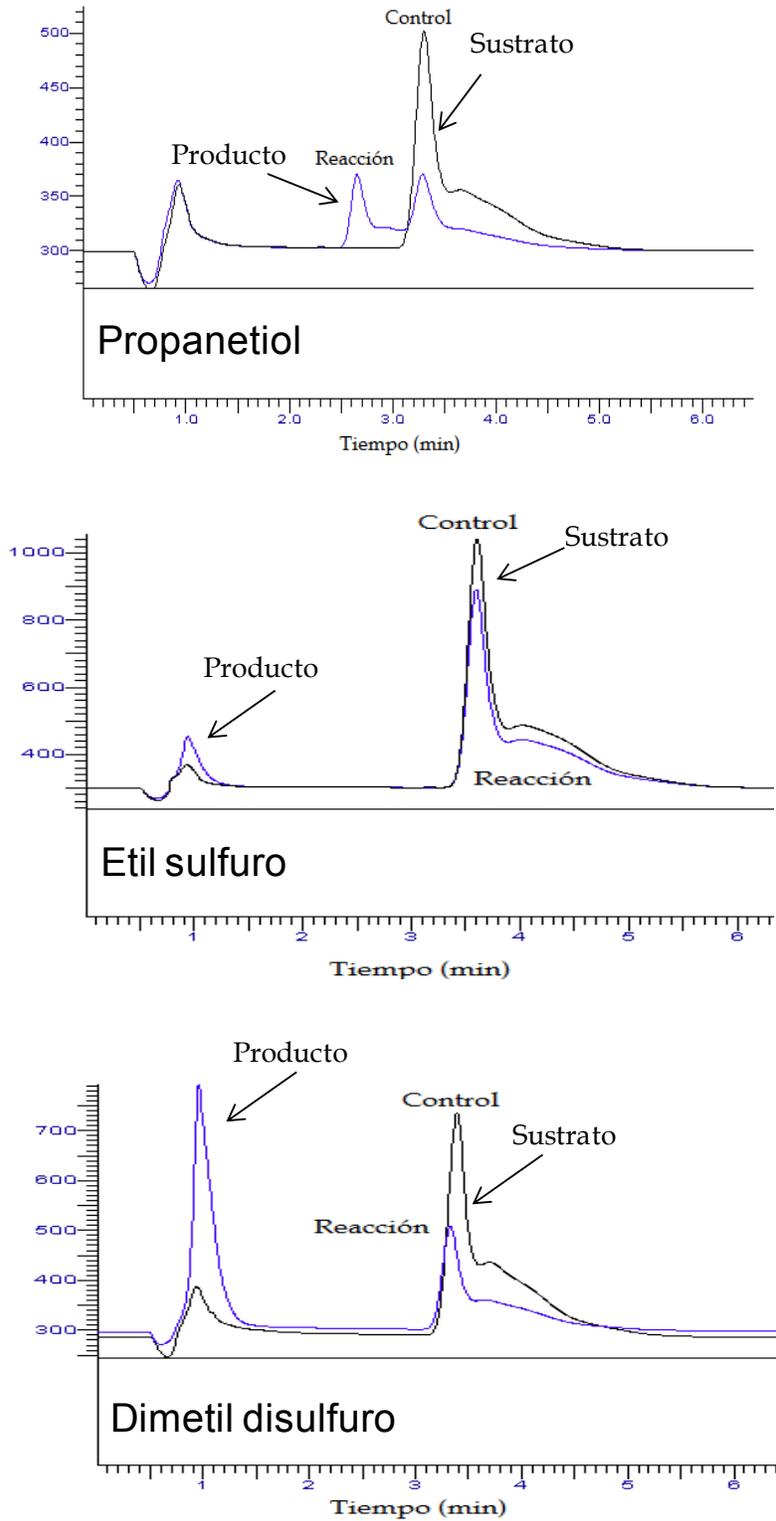
<sup>c</sup> ([www.scribd.com](http://www.scribd.com)).

## **4.2 Caracterización cinética de la CPO en solución**

La cloroperoxidasa ha demostrado ser una enzima sumamente versátil y desde un punto de vista ambiental resulta interesante la posibilidad de usar dicha característica para la oxidación de compuestos contaminantes. Se sabe que la CPO es poco específica para la oxidación de compuestos azufrados; se ha reportado la oxidación mediada por la CPO de compuestos azufrados no volátiles, tanto aromáticos como alifáticos y tioles (Ayala et al., 2000; Colonna et al., 1997; Hager, 1974). Estos antecedentes sugieren que la enzima es capaz de reconocer la molécula de azufre en compuestos con estructura química muy diferente, se propone el uso de la CPO para la detoxificación de efluentes gaseosos contaminados con compuestos azufrados, pero de naturaleza volátil. Dada esta condición y las propiedades intrínsecas de los CAV's, resulta atractivo explorar un sistema sólido-gas (enzima-sustrato).

El primer paso para estudiar dicho sistema fue determinar si los compuestos seleccionados eran sustratos de la CPO en solución acuosa. Se realizaron reacciones en solución acuosa (amortiguador pH 6) conteniendo 10 % de acetonitrilo para favorecer la solubilidad de los CAV's, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante y 1 mM de CAV's. El progreso de la reacción se monitoreó por HPLC (figura 5). Como habíamos hipotetizado, los CAV's seleccionados en la tabla 9 resultaron ser sustratos de la CPO. Aunque se detectó oxidación química en ausencia de la enzima, se puede apreciar en los cromatogramas que en el mismo tiempo de reacción la conversión del sustrato fue mayor cuando la enzima está presente, lo cual demuestra que la CPO acelera la reacción. En algunos casos fue posible notar la aparición de productos con tiempo de retención menor que el sustrato, lo cual sugiere de manera cualitativa la naturaleza polar de los productos en relación al sustrato (figura 5). Las reacciones con etanetiol no fueron reproducibles, debido a que la gran volatilidad de este compuesto bajo las condiciones en que se realizó. El etanetiol tiene un punto de ebullición de 35 °C y un valor de presión de vapor de 442 mmHg.

OXIDACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS VOLÁTILES UTILIZANDO LA CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago*



**Figura 5.** Cromatogramas de HPLC que muestran la desaparición de sustrato mediada por la actividad enzimática de CPO, tiempo de reacción 10 minutos. Reacción enzimática (línea azul) y Control sin enzima (línea negra)

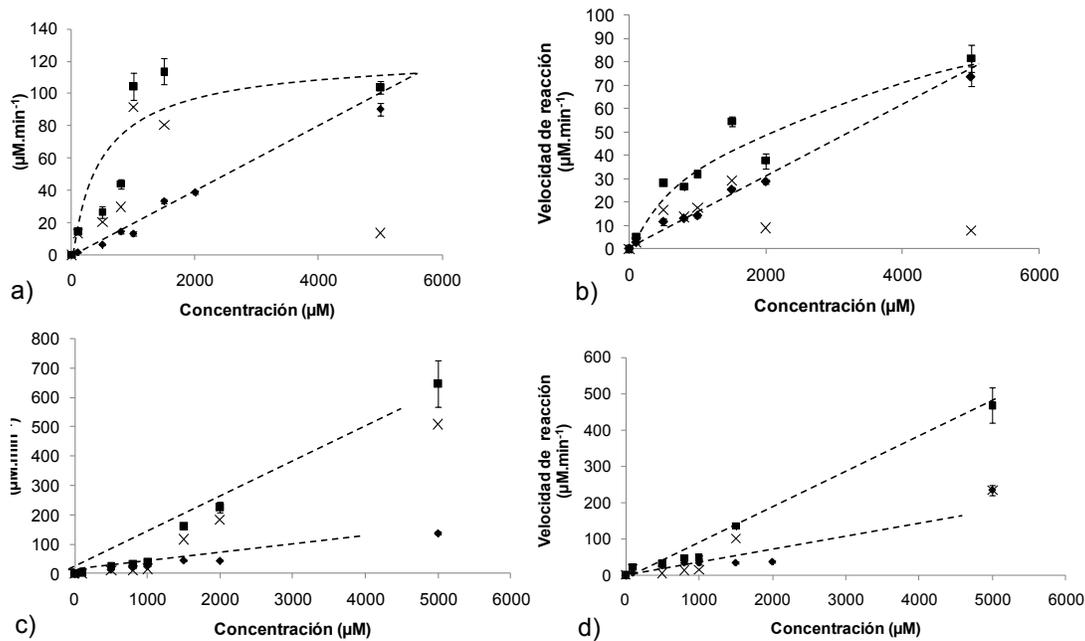
Se cuantificaron los porcentajes de conversión enzimática y actividad específica de los compuestos azufrados. Los valores de actividad específica obtenidos (tabla 10) resultaron un orden de magnitud menor que las actividades reportadas en estudios previos para compuestos azufrados aromáticos y alifáticos no volátiles (tabla 5). Cabe mencionar que las condiciones utilizadas para la determinación de las actividades en la tabla 5 fueron distintas a las de esta tesis, ya que se realizaron a pH 3, con KCl y 20  $\mu$ M de sustrato; sin embargo, dan una idea clara de que la enzima es menos eficiente catalizando la oxidación de CAV's comparado con azufrados de naturaleza aromática. Los controles mostraron porcentajes de oxidación química por el peróxido de hidrógeno en un grado mayor al esperado. Pese a estos resultados no se puede descartar el potencial de la CPO como catalizador en la oxidación de compuestos azufrados volátiles ya que la presencia de la enzima acelera la reacción. Los valores de conversión enzimática fueron calculados de la siguiente manera; al porcentaje de conversión total (química mas enzimática) se restó el valor de la oxidación química (solo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de los controles; el resultante fue el porcentaje de oxidación enzimática, este último valor fue el utilizado para calcular actividad específica. La tabla 10 muestra los resultados obtenidos bajo las siguientes condiciones: 0.1 mM de CAV's y 1 mM de peróxido de hidrógeno, amortiguador pH 6.

**Tabla 10.** Actividad específica de la CPO en la oxidación de CAV's\*.

CAV's	Conversión total % (10 min)	Conversión Química % (10 min)	Conversión Enzimática % (10 min)	CPO ( $\mu$ mol)	Actividad específica (min <sup>-1</sup> )
Propanetiol	44	36	7	47.6	31 $\pm$ 2.6
Etil sulfuro	44	27	17	47.6	34 $\pm$ 2.4
Butanetiol	64	16	47	71.4	199 $\pm$ 6.9
Dimetil disulfuro	57	14	42	23.8	188 $\pm$ 4.0
Hexanetiol	56	45	11	71.4	48 $\pm$ 4.9

\*Condiciones de reacción; 0.1mM de CAV's, 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y pH 6.

Con la finalidad de obtener las constantes cinéticas en medio acuoso para los CAV's, se realizaron reacciones a pH 6 variando la concentración de CAV's en presencia de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 10 % de acetonitrilo. En la figura 6 se grafica la velocidad de la reacción química (en ausencia de enzima) y la de la reacción enzimática para diferentes concentraciones de sustrato. Bajo las condiciones ensayadas, se observa una cinética de primer orden para la reacción química. En presencia de la enzima, la velocidad fue mayor; sin embargo a medida que aumentó la concentración de sustrato, se alcanzó la saturación de la enzima. Normalmente un incremento en la concentración de sustrato incrementa la velocidad de la reacción enzimática hasta que los sitios activos se saturan; a determinadas concentraciones de sustrato, la velocidad química rebasa a la enzimática en los casos a y b de la figura 6. Para el caso de los tioles por otro lado aún no se llega a la saturación enzimática en las mismas condiciones de reacción.



**Figura 6.** Comparación entre las velocidades reacción química (♦), enzimática (x) y total (■) (química más enzimática) para la conversión de CAV's. a) dimetil sulfuro [E]= 75 nM; b) etil sulfuro [E]= 75 nM; c) propanetiol [E]= 50 nM; d) butanetiol [E]= 75 nM.

A partir de los datos obtenidos para la velocidad de reacción química (figura 6, rombos en negro) de los CAV's se calcularon las constantes de velocidad química

( $k_q$ ) para cada uno. Por otro lado, con el propósito de comparar parámetros catalíticos entre ellos, se calcularon los valores de  $k_{cat}/K_m$  a partir de los datos de actividad específica (figura 7, inciso a). Debido a las diferencias entre los perfiles velocidad de reacción de los tioles con el resto de los CAV's se ajustaron las velocidades de reacción del dimetil disulfuro y el etil sulfuro a una ecuación de primer orden, usando sólo las secciones lineales a partir de origen de cada curva. En la figura 7 se muestra los gráficos obtenidos con dicho ajuste y su coeficiente de correlación ( $R^2$ ). La pendiente de estas líneas es la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ , inciso a) o la constante de velocidad química ( $k_q$ , inciso b). Los parámetros  $k_{cat}$  y  $K_m$  no se pudieron calcular por separado, pero su cociente ( $k_{cat}/K_m$ ) se puede utilizar para comparar la eficiencia catalítica de la enzima.

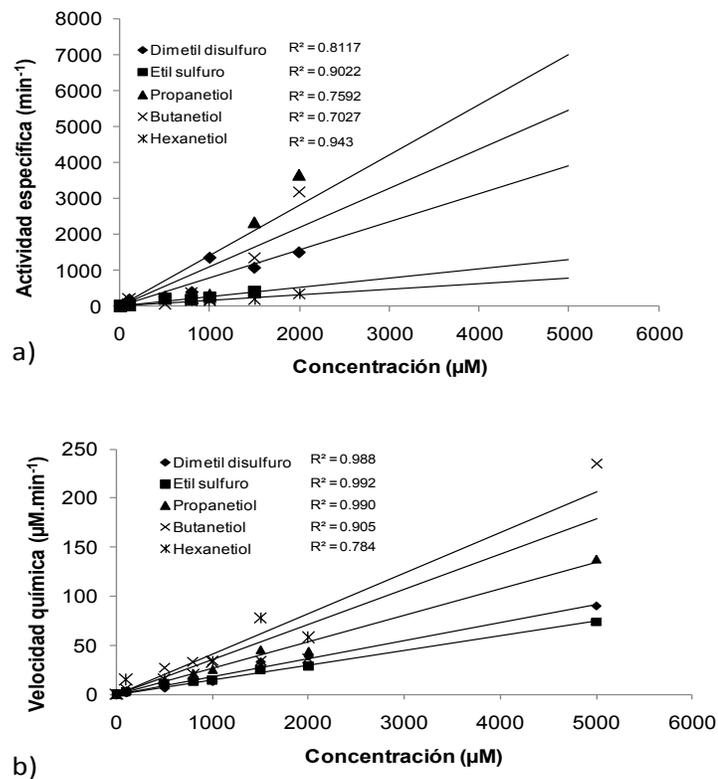


Figura 7. Gráficos usados para calcular las constantes cinéticas  $k_{cat}/K_m$  y  $k_q$ .

Para el caso de  $k_q$ , se considera que:

$$V = k[S][H_2O_2]$$

Si  $[H_2O_2]$  se mantiene constante, entonces se define  $k_q = k[H_2O_2]$ , como la constante de pseudo primer orden de reacción en ausencia de enzima.

Para el caso de  $k_{cat}/K_m$ , la ecuación usada fue la siguiente:

$$[1] \quad \frac{V_0}{[E]} = \frac{k_{cat} [S]}{K_m + [S]}$$

En este caso, la reacción con el CAV es el paso limitante, ya que la reacción entre enzima y peróxido tiene una constante de velocidad de segundo orden de  $2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Si  $V_0/[E]$  es igual a la actividad específica ( $A_{esp}$ ) y  $[S] \ll K_m$ , la ecuación 1 se simplifica de la siguiente manera;

$$[2] \quad \frac{V_0}{[E]} = \frac{k_{cat}}{K_m} [S]$$

Donde,

$$[3] \quad k_{cat}/K_m = K$$

Entonces sustituyendo en 2;

$$A_{esp} = K [S].$$

Los valores cinéticos obtenidos se resumen en la tabla 11.

**Tabla 11.** Valores cinéticos de la CPO catalizando CAV's.

CAV's	$k_q$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	“Catalytic Proficiency” [( $k_{cat}/K_m$ )/ $k_q$ ] ( $\text{M}^{-1}$ )	$k_d^{\ddagger}$ (M)
Etil sulfuro	0.0149	$4.29 \times 10^3$	$17.28 \times 10^6$	$5.78 \times 10^{-8}$
Dimetil disulfuro	0.0183	$13.04 \times 10^3$	$42.76 \times 10^6$	$2.33 \times 10^{-8}$
Propanetiol	0.027	$23.33 \times 10^3$	$51.84 \times 10^6$	$1.92 \times 10^{-8}$
Butanetiol	0.0414	$18.17 \times 10^3$	$26.34 \times 10^6$	$3.79 \times 10^{-8}$
Hexanetiol	0.0358	$2.63 \times 10^3$	$4.41 \times 10^6$	$2.26 \times 10^{-7}$

$k_q$  Constante de velocidad química.

$k_d^{\ddagger}$  Constante de disociación del sustrato en el estado de transición.

Los valores mostrados en la tabla son resultado promedio de tres réplicas distintas; el error entre las replicas fue menos del 15% para todos los casos.

En términos de eficiencia catalítica los valores de  $k_{cat}/K_m$  que han sido reportados para azufrados no volátiles van del orden de  $10^6$  a  $10^8$  ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ); por ejemplo; para el caso del tioanisol  $k_{cat}/K_m = 2.30 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y para el tiantreno  $k_{cat}/K_m = 1.60 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Ayala et al., 2000; Ayala et al., 1998). Comparativamente, la CPO tiene valores menores de eficiencia catalítica para la oxidación de CAV's (Tabla 11). Los tioles propanetiol y butanetiol son mejores sustratos que el resto de los azufrados volátiles estudiados en este trabajo; el hexanetiol, por ser un azufrado menos polar presentó problemas de solubilidad en concentraciones por arriba de 2 mM en las condiciones de reacción ensayadas. Generalmente las mejores enzimas en términos de eficiencia catalítica muestran valores de  $k_{cat}/K_m$  en el orden de  $10^8$ , máximo superior determinado por la difusión. Bajo este enfoque la CPO no es una enzima tan eficiente catalizando la oxidación CAV's, dado que es 5 órdenes de magnitud menos eficiente con respecto al valor óptimo de  $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  para las enzimas más eficientes. Sin embargo, es importante resaltar la ventaja que desde el punto de vista ambiental representa la baja especificidad de la CPO, siendo capaz de catalizar la oxidación de una amplia gama de compuestos azufrados incluyendo aquellos de naturaleza volátil.

Otro parámetro que pudo calcularse y se muestra en la tabla es 11, es el término denominado “*catalytic proficiency*” o “*efectividad catalítica*” que puede considerarse como una medida de la competitividad de un catalizador biológico (Radzicka y Wolfenden, 1995) y está dado por el cociente de la constante de segundo orden o eficiencia catalítica para determinado sustrato ( $k_{cat}/K_m$ ) entre la constante de velocidad de la misma reacción en ausencia de la enzima ( $k_q$ ). El término de efectividad catalítica ha sido interpretado como la capacidad de una enzima para disminuir la barrera de activación para un sustrato en solución. Además si se expresa en unidades de concentración (el valor inverso) puede ser interpretado como la constante de disociación de la enzima por el sustrato en el estado de transición.

El orden de magnitud reportado para algunas enzimas en términos de efectividad catalítica va del orden de  $10^8$  hasta  $10^{23}$ , por ejemplo; la ciclofilina humana tiene un valor de  $5.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  y la OMP descarboxilasa de  $2.0 \times 10^{23} \text{ M}^{-1}$ , siendo sus constantes de disociación por el sustrato en el estado de transición de  $1.8 \times 10^{-3} \text{ M}$  y  $5 \times 10^{-24} \text{ M}$ , respectivamente. Los ejemplos anteriores ofrecen una idea del intervalo en el que se encuentra la CPO con respecto a su eficiencia catalizando la oxidación de compuestos azufrados volátiles (en general, del orden de  $10^6$  en términos de efectividad catalítica y  $10^{-8}$  para constante de disociación). Podemos observar que la CPO no es tan eficiente, sin embargo es capaz de catalizar la oxidación de compuestos azufrados volátiles, por lo que se abre el panorama y deja en perspectivas posibles trabajos con el propósito de mejorar en la CPO y aumentar su potencial catalítico rediseñando su sitio activo mediante mutagénesis sitio dirigida, modificación química o cualquier herramienta al alcance que permita hacer de la CPO una enzima aun más atractiva para su uso en la industria o para el campo de la biorremediación para la detoxificación de efluentes contaminantes como es el caso de esta investigación.

### **4.3 Identificación de productos de reacción**

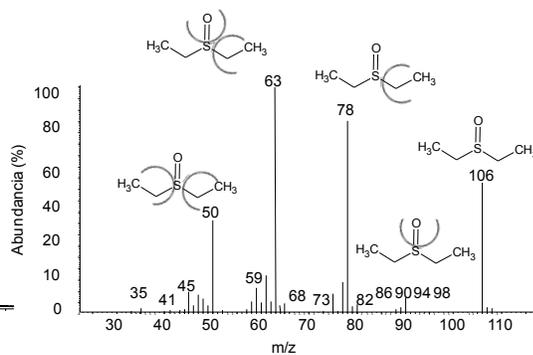
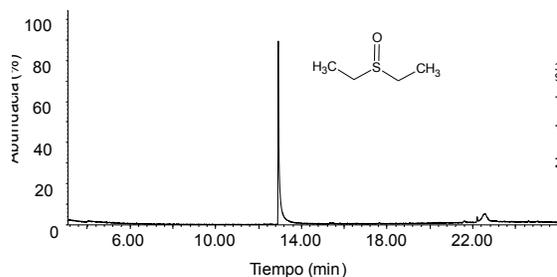
Los productos de la oxidación de CAV's en fase acuosa se identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Las figuras 8 y 9 muestran los cromatogramas y espectros de masas obtenidos para los productos de oxidación de cada uno de los sustratos seleccionados excepto para el etanetiol, (Tabla 9). A partir de estos datos se logró identificar la naturaleza química de los productos de la reacción catalizada enzimáticamente; la tabla 12 enlista los sustratos y sus respectivos productos de reacción. Sus propiedades físicas se muestran en la tabla 13.

Es notable la diferencia en la presión de vapor y el punto de ebullición de los sustratos y sus respectivos productos. La oxidación genera compuestos con un mayor punto de ebullición y una menor presión de vapor. Los cambios en estas propiedades se ven reflejados directamente en la volatilidad de los CAV's oxidados. En consecuencia, los productos son menos volátiles o no volátiles, lo cual elimina su carácter de contaminantes atmosféricos. Los valores de umbral de detección no han sido determinados para los productos mostrados en la tabla 13, es probable que este valor aumente de manera considerable en comparación con su contraparte no oxidada.

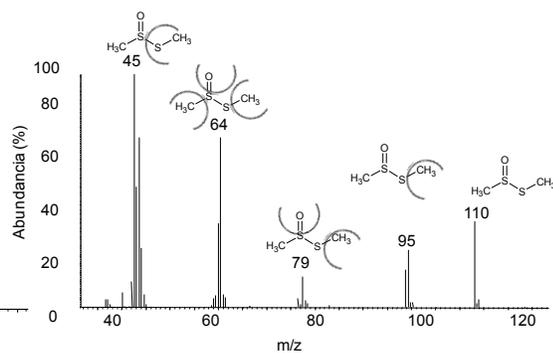
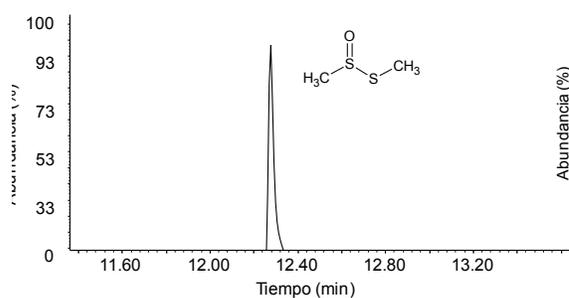
De acuerdo con los valores en la tabla 13 y en términos de toxicidad, parece no haber diferencias significativas entre los sustratos y los productos, sin embargo, desde un punto de vista ambiental, la oxidación de este tipo de compuestos puede representar un primer paso de detoxificación, ya que al oxidarse, los CAV's se convierten en compuestos no volátiles. Este primer paso de contención permitiría en principio tenerlos disponibles en solución para ser tratados en una segunda etapa de descontaminación con organismos degradadores o algún tratamiento fisicoquímico.

OXIDACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS VOLÁTILES UTILIZANDO LA CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago*

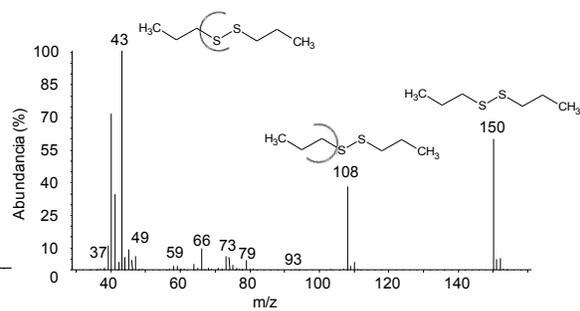
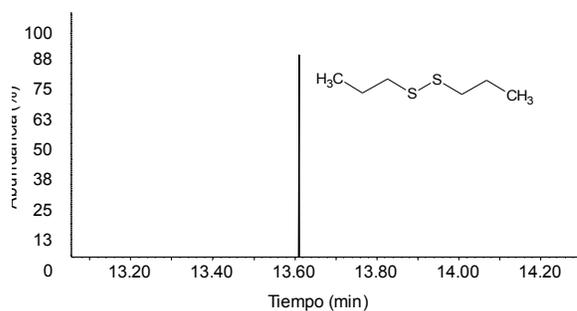
a) Etil sulfuro



b) Dimetil disulfuro



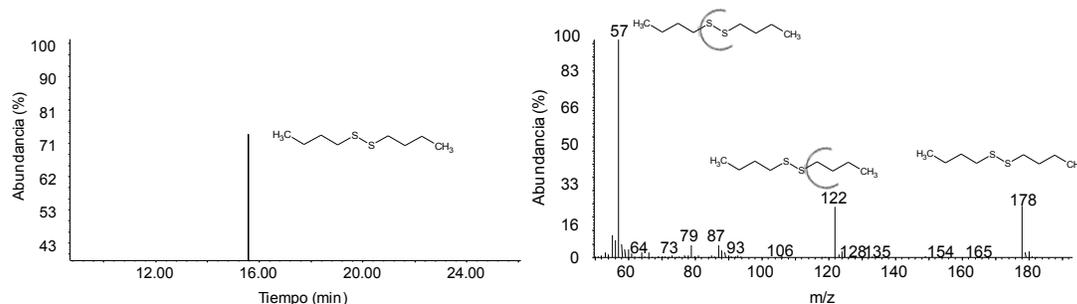
c) Propanetiol



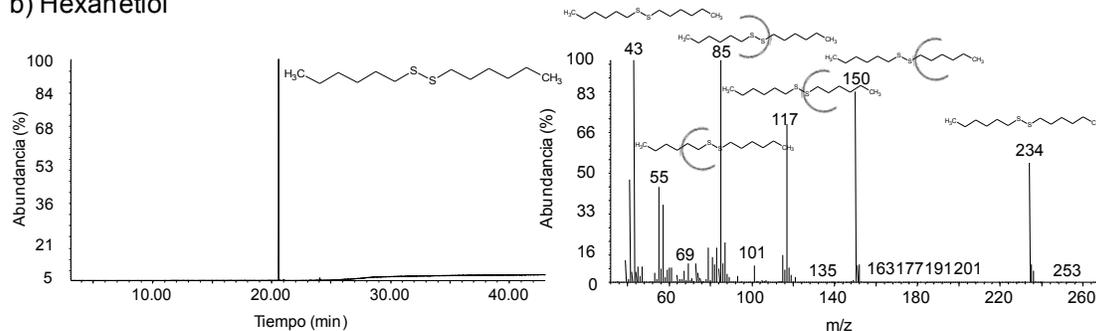
**Figura 8.** Cromatogramas y espectros de masas para los productos de reacción del etil sulfuro (a), dimetil disulfuro (b) y propanetiol (c).

OXIDACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS VOLÁTILES UTILIZANDO LA CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago*

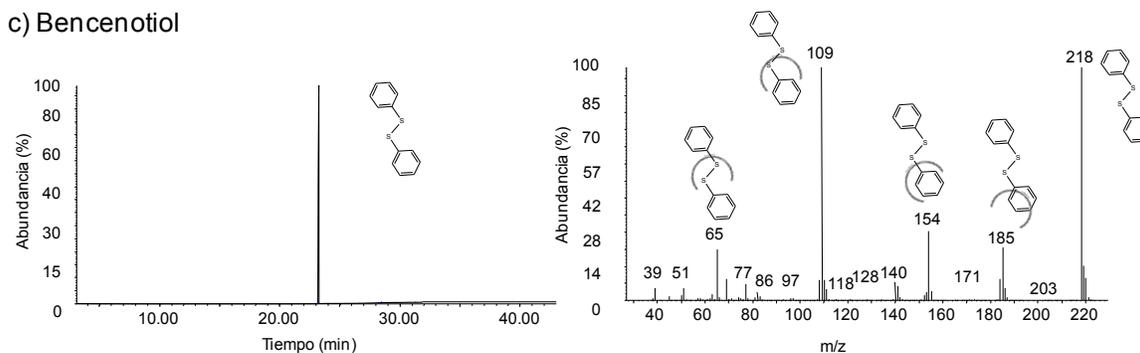
a) Butanetiol



b) Hexanetiol



c) Bencenotiol



**Figura 9.** Cromatogramas y espectros de masas para los productos de reacción del butanetiol (a), hexanetiol (b) y bencenotiol(c).

**Tabla 12.** Productos de reacción en solución mediada por la Cloroperoxidasa.

Sustrato	Producto	Iones espectrales (m/z)
Dimetil disulfuro	S-óxido dimetil disulfuro	110(78)[M <sup>+</sup> ], 95(41), 79(6), 64(100), 45(98)
Etil sulfuro	Etil sulfóxido	106(14)[M <sup>+</sup> ], 90(2), 78(100), 63(69), 50(51)
n-Propanetiol	Propil disulfuro	150(33)[M <sup>+</sup> ], 108(23), 43(100), 27(13)
n-Butanetiol	Butil disulfuro	178(39)[M <sup>+</sup> ], 122(36), 57(100), 41(52), 29(38)
n-Hexanetiol	Hexil disulfuro	234(184)[M <sup>+</sup> ], 150(27), 117(19), 85(33), 55(18), 43(100)
Bencenotiol	Fenil disulfuro	218(62)[M <sup>+</sup> ], 185(16), 154(18), 109(100), 77(11) 65(44)

[M<sup>+</sup>], Ion molecular.

**Tabla 13.** Propiedades físicas de CAV's y los productos generados por la reacción.

CAVs	<sup>a</sup> Umbral de detección ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	<sup>b</sup> Punto de ebullición ( $^{\circ}\text{C}$ )	<sup>c</sup> Presión de vapor (mmHg@20 $^{\circ}\text{C}$ )	<sup>d</sup> DL <sub>50</sub> (g /kg)
Etil sulfuro	33	90	50	ORAL RAT 5.90
Etil sulfóxido	NR	212	0.25	ORAL RAT 5.60
Dimetil disulfuro	2,200	109	22	ORAL RAT 0.19
S-óxido dimetil disulfuro	NR	202	0.4	NR
Propanetiol	13	67	122	ORAL RAT 1.79
Propil disulfuro	NR	196	0.35	ORAL RAT 2.00
Butanetiol	2.8	98	45	ORAL RAT 1.50
Butil disulfuro	NR	226	0.0039	NR
Hexanetiol	15	152	4.5	ORAL RAT 1.2
Hexil disulfuro	NR	305	0.00027	NR
Bencenotiol	26	169	1.4	IPR-MUS 0.267
Difenil disulfuro	NR	310	NR	IPR-MUS 0.100

NR; no reportado.

<sup>a</sup> (Nagata, 1988)

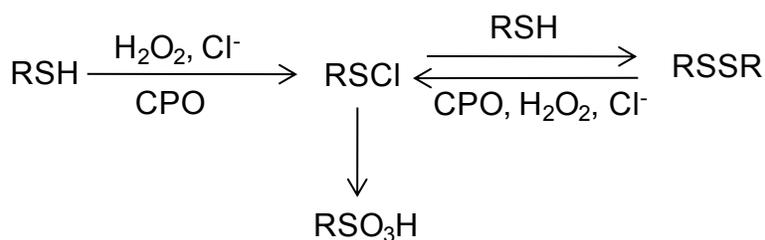
<sup>b,d</sup> (www.sciencelab.com, www.mathesongas.com, www.chemblink.com, www.thegoodscentcompany.com, www.chemspider.com, www.lookchem.com, www.wku.edu, msds.chem.ox.ac.uk)

<sup>c</sup> (www.scribd.com)

En cuanto a la naturaleza química de los productos, la oxidación de sulfuros en solución generó los correspondientes sulfóxidos. El mecanismo catalítico de la CPO para la oxidación de azufrados probablemente involucra la transferencia directa de oxígeno dentro del sitio activo de la enzima, como lo sugiere la evidencia obtenida de la incorporación cuantitativa de oxígeno marcado ( $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ ) dentro del sulfóxido (Casella et al., 1992; Goto et al., 1999; Van Deurzen et al., 1997). También se ha propuesto la formación de un radical libre inestable localizado en el sulfuro, pero esta posibilidad aún no se ha demostrado (Tuyman et al., 1998; Kobayashi et al., 1987). Por otro lado, durante la identificación de los productos pudo hacerse una observación interesante: la oxidación de los tioles produjo el respectivo disulfuro de cada sustrato. Se pudo observar por GS-MS la formación de un enlace disulfuro como producto de reacción para el propanetiol, butanetiol, hexanetiol y el bencenotiol, este último como control no volátil.

Reacciones de este tipo no han sido reportadas antes para la CPO bajo las condiciones en las que se llevaron los ensayos en solución.

Las reacciones fueron hechas en ausencia del ion cloruro y pH 6. La formación de disulfuros en reacciones catalizadas por la CPO ha sido reportada en condiciones de pH=3 y en presencia del ion cloruro; se ha propuesto que bajo estas condiciones la reacción involucra la formación de un intermediario sulfenil cloruro. El mecanismo propuesto (figura 10) en la literatura bajo condiciones ácidas involucra distintos pasos; primero, la CPO cataliza la formación de especies sulfenil cloruro, los cuales reaccionan con otra molécula del tiol para formar el correspondiente disulfuro. Además, la CPO puede catalizar la reacción inversa; es decir, la formación de algunas moléculas de disulfuro a sus respectivas especies sulfenil cloruro. El mecanismo sugiere que el único papel de la CPO es el de formar el intermediario sulfenil y es este último el que reacciona de manera química para dar el disulfuro (Silverstein et al., 1974).



**Figura 10.** Mecanismo propuesto para la oxidación de compuestos azufrados bivalentes mediado por la CPO (Silverstein et al., 1974).

Sin embargo puede descartarse que esté sucediendo un mecanismo similar en nuestros ensayos dadas las condiciones usadas en el presente estudio. Ya que las reacciones se realizaron a pH 6 y en ausencia de cloruro. Con la finalidad de confirmar que la formación de compuestos disulfuros estuviera siendo realmente catalizada por la cloroperoxidasa, se utilizó como control al bencenotiol, un tiol aromático no volátil y que no es oxidado por peróxido en ausencia de la enzima. Se identificó al fenil disulfuro (figura 9 y tabla 12) como el producto de la oxidación

de bencenotiol. Estos resultados demuestran que la enzima es capaz de catalizar la formación de disulfuros a partir de tioles.

Hipotetizando el mecanismo de reacción desde un punto de vista electrónico, el compuesto I (Valderrama et al., 2002) podría sustraer un electrón del grupo tiol, como ocurre con los fenoles, para formar un radical libre; esta especie, después de perder un protón, puede reaccionar con un segundo radical similar para formar el disulfuro. La actividad de la CPO ha sido relacionada con el potencial de ionización de los sustratos (Ayala et al., 2000), por lo que la baja eficiencia catalítica de la CPO en la oxidación de tioles puede ser explicada en términos de la alta energía de ionización mostrada por los sustratos (alrededor de 9.2 eV). No obstante experimentos más detallados deben ser realizados para establecer el mecanismo catalítico involucrado en la oxidación de tioles a disulfuros.

En conclusión, la CPO de *C. fumago* es capaz de catalizar la oxidación de azufrados de cadena corta y mercaptanos para generar los correspondientes sulfóxidos y disulfuros. Los productos generados son compuestos menos volátiles y su carácter de contaminante atmosférico es reducido por la oxidación.

#### **4.4 Diseño del sistema de reacción en fase gas: determinación de concentración de sustratos en fase gaseosa.**

Uno de los principales factores que condicionan la catálisis en fase gas es la volatilidad de los sustratos, este parámetro está directamente relacionado con la concentración los reactantes y su disponibilidad para reaccionar. Por esta razón se construyó un sistema para volatilizar y determinar la concentración de los sustratos en aire. El primer problema que enfrentamos en este sentido fue que el peróxido de hidrógeno es un compuesto poco volátil y la CPO es una enzima dependiente de peróxido de hidrógeno; en nuestro sistema el peróxido es necesario para la formación del compuesto I, la especie enzimática reactiva a partir de la cual se cataliza la oxidación de los sustratos. Se encontró que al

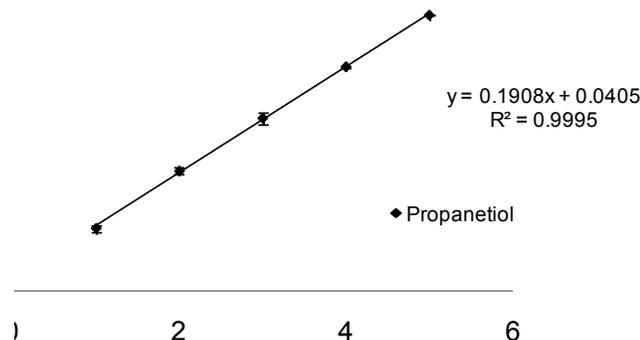
burbujear aire a través de un reservorio de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el aire burbujeado se enriquece y arrastra las moléculas de peróxido. Para los CAV's no hubo tal problema ya que por naturaleza son volátiles. Una vez que se contó con la forma de volatilizar a los sustratos había que estimar y controlar la concentración de cada reactivo en fase gaseosa.

Se determinó la concentración en fase gaseosa para el peróxido de hidrógeno y para tres de los sustratos azufrados (propanetiol, dimetil sulfuro y etil sulfuro). La concentración de los sustratos en fase gas se calculó midiendo la concentración en el matraz de recuperación por espectrofotometría y relacionándola con la velocidad de flujo aplicado al sistema en determinado tiempo (véase metodología inciso h). Fue necesario obtener previamente los coeficientes de extinción molar para cada uno de los sustratos azufrados. La tabla 14 muestra los valores obtenidos. Para el caso del peróxido de hidrógeno, se utilizó el valor reportado en la literatura (Noble y Gibson, 1970).

**Tabla 14.** Coeficientes de extinción molar para el propanetiol, etil sulfuro y dimetil disulfuro.

<b>Compuesto</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>Coefficiente de extinción molar (mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)</b>
Propanetiol	220	0.190 ± 0.004
Etil sulfuro	230	0.170 ± 0.006
Dimetil disulfuro	254	0.384 ± 0.009

Los coeficientes de extinción fueron calculados a partir de la ecuación de Lambert-Beer. La figura 11 ejemplifica este ajuste para el propanetiol, donde la pendiente de la recta es el coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ).



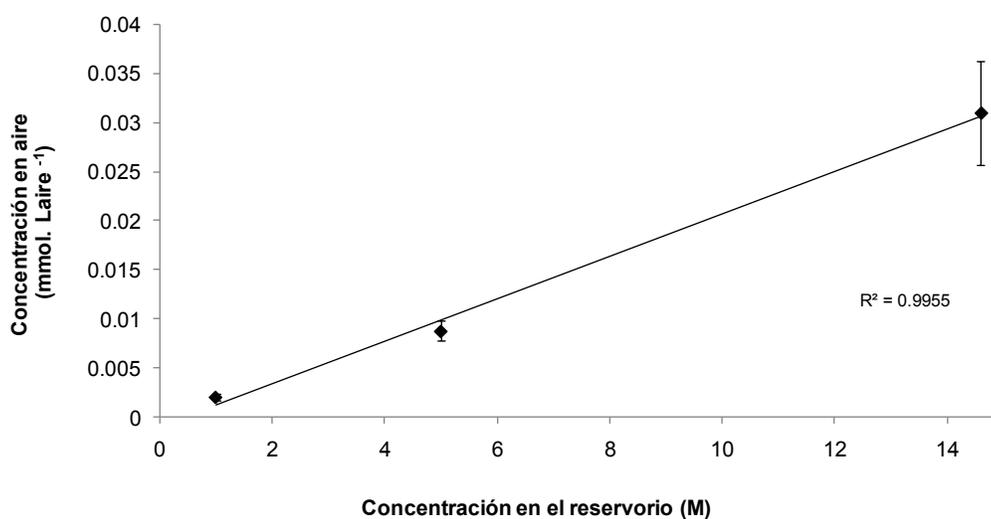
**Figura 11.** Correlación entre la concentración de propanetiol y su absorbancia para calcular el coeficiente de extinción molar mediante la ecuación de Lambert-Beer.

Los experimentos para determinar la concentración en fase gaseosa del peróxido de hidrógeno se realizaron a dos concentraciones iniciales y dos valores de flujo diferentes. La tabla 15 muestra los resultados obtenidos; observamos que existe una tendencia lineal entre el flujo, la concentración del reservorio y la concentración en aire; no obstante, bajo estas condiciones las concentraciones en fase gas fueron muy bajas como para considerarse concentraciones catalíticas (al menos 0.1 mM). Sin embargo, como se mencionó anteriormente la acumulación de peróxido de hidrógeno tiene un comportamiento lineal, lo cual permite extrapolar el sistema de volatilización para lograr una concentración en aire deseada, ya sea manipulando la concentración del reservorio (figura 12) o el flujo que pasa a través de él (figura 13).

Para el caso del peróxido de hidrógeno, con la finalidad de alcanzar una concentración catalítica en aire se utilizó la solución de peróxido más concentrada que se pudo obtener comercialmente (14.6 M) con la que se logró una concentración molar en aire de 0.062 mM, cercano a valores catalíticos en agua.

**Tabla 15.** Determinación de concentración molar en fase gas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en reservorio (M)	Flujo de Aire (L <sub>aire</sub> ·L <sub>medio</sub> <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	Concentración en fase gas (μmol. L <sub>aire</sub> <sup>-1</sup> )
1	5	2.0 ± 0.3
5	5	8.7 ± 1.0
14.6	5	31 ± 4.0
14.6	10	62.0 ± 8.4



**Figura 12.** Correlación entre la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en gas con respecto a la concentración en el reservorio de volatilización, flujo 5 L·L<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>.

Los resultados con respecto a la concentración de los sustratos azufrados en fase gas se muestran en la tabla 16. Se observó un perfil lineal entre la concentración de CAV's en gas, la concentración en el reservorio y el flujo, similar al de la figura 12 y 13 (datos no mostrados). Las concentraciones de azufrado en fase gas bajo las condiciones ensayadas dieron como resultado valores de concentración de CAV's en aire comparables a las que se requieren en fase acuosa para observar actividad enzimática.

**Tabla 16.** Determinación de concentración en fase gas de CAV's.

CAV's	Concentración (M)	Flujo de Aire (L.L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	Concentración en fase gas (mmol. L <sub>aire</sub> <sup>-1</sup> )
Etil sulfuro	13.63	5	24.9 ± 1.0
Propanetiol	11.53	5	7.9 ± 0.9
Dimetil disulfuro	1.13	10	0.4 ± 0.03
Dimetil disulfuro	0.22	10	0.1 ± 0.01

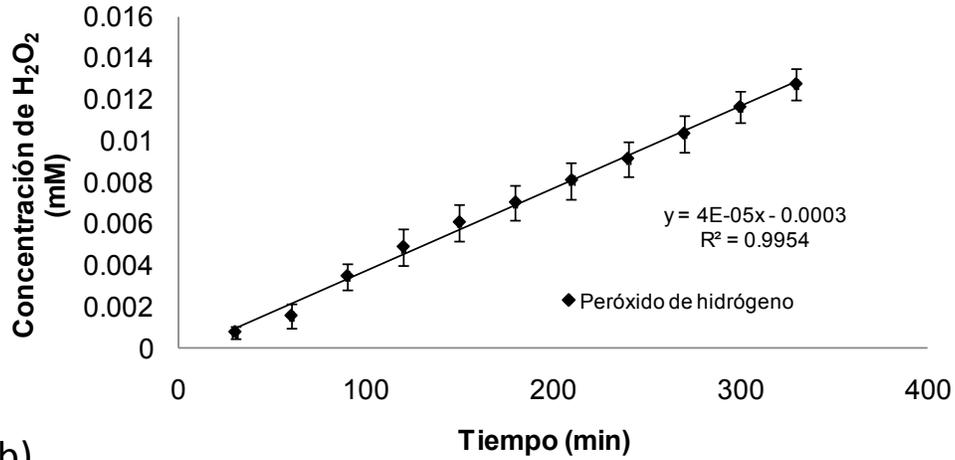
Además, para el dimetil disulfuro se realizaron experimentos con una concentración inicial menor en el reservorio (aproximadamente 10 y 50 veces menos que las concentraciones usadas con los otros CAV's); los resultados mostraron un completo control en el sistema para establecer concentraciones de hasta 0.1 mM en aire. Concluimos que se puede controlar la concentración en fase gas de los sustratos a la medida que se requiere.

#### **4.5 Inmovilización y carga enzimática**

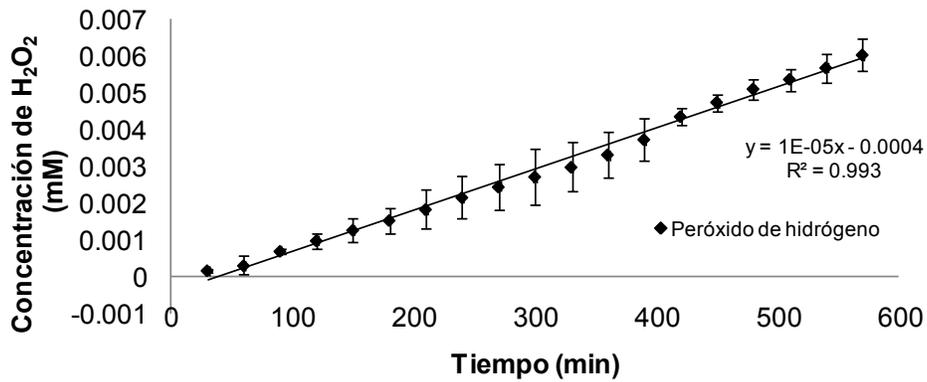
Dada la naturaleza de nuestro objetivo experimental y del sistema en continuo que se implementó para lograr la volatilización del peróxido, fue necesaria la inmovilización de la cloroperoxidasa. Se utilizaron dos metodologías con distinto enfoque, es decir; inmovilización covalente en poliuretano e inmovilización no covalente en fibra de vidrio. El primer método se basó en el uso de un pre-polímero (poliisocianato) hidrofílico de poliuretano (HYPOL 2002) en el que mediante una reacción de copolimerización con la CPO ésta última queda unida de manera covalente en el polímero recién formado. La inmovilización CPO-poliuretano se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Martin Bakker y colaboradores (2000).

OXIDACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS VOLÁTILES UTILIZANDO LA CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago*

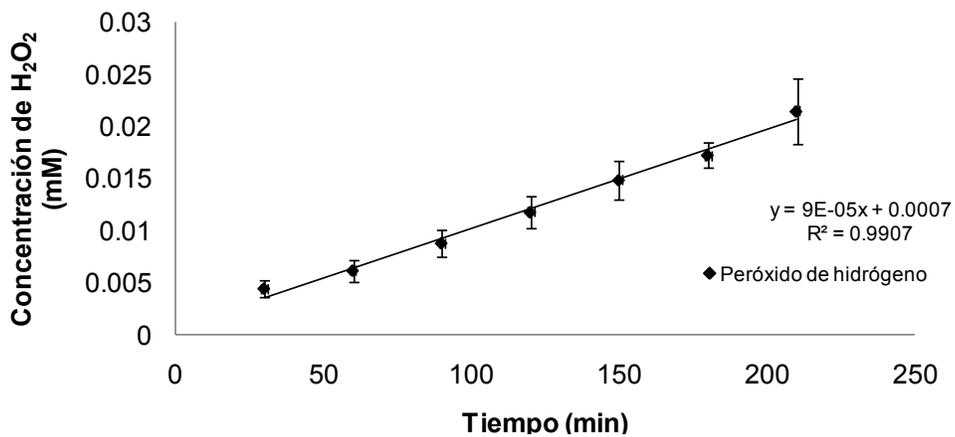
a)



b)



c)



**Figura 13.** Determinación de la concentración en fase gas de peróxido de hidrógeno. 1 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 5 L.L.<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> de aire (a), 5 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 5 L.L.<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> de aire (b) y 5 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 10 L.L.<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> de aire (c).

La mayor actividad retenida medida con el ensayo con monoclorodimedona fue de 430 U/g de PUR, es decir, cerca del 10% de la actividad antes de la inmovilización. El porcentaje de actividad retenida para tres de nuestras preparaciones de muestras en la tabla 17. También se midió actividad usando el ensayo con guaiacol y ABTS (datos no mostrados) para descartar que la naturaleza de la reacción tuviera un efecto en la actividad observada en el catalizador, sin embargo los resultados fueron similares a los descritos para el ensayo con monoclorodimedona.

Entre los factores que pueden explicar la baja actividad de estas preparaciones está el uso del detergente Brij, cuyo papel en la inmovilización es emulsionar la preparación CPO-PUR y facilitar la polimerización de los monómeros de poliisocianato. La enzima pudo perder su actividad en presencia de Brij debido al efecto desnaturizante que tiene el detergente. Es oportuno mencionar que el prepolímero usado en nuestros ensayos no fue exactamente el mismo usado por Bakker y colaboradores, y quizás esto explique la aparente inactivación de la enzima durante la inmovilización. En este caso se utilizó un Hypol 2002 proporcionado por Dow. Este prepolímero tiene un porcentaje menor en términos de grupos isocianato (NCO; 6.6%) disponibles para reaccionar mientras que el prepolímero usado por Bakker y colaboradores (Hypol 3000) tiene 9.8%.

Además, el origen de los grupos isocianato reactivos son de distinta naturaleza, siendo TDI (diisocianato de tolueno) y MDI (diisocianato difenil metileno) para el Hypol 2002 y solamente TDI para el Hypol 3000; esta diferencia le confiere una hidrofobicidad ligeramente mayor al Hypol 2002, usado en este trabajo. Por último, la reacción es exotérmica y aunque la mezcla de reacción se enfría para minimizar la desnaturización de la enzima, es probable que una parte de ésta se inactive. La técnica no fue adecuada para los fines del proyecto por lo que se optó por explorar otra metodología.

**Tabla 17.** Actividad retenida de la preparación enzimática CPO-PUR.

Catalizador	Actividad esperada (U/g de PUR)	Actividad medida con el catalizador (U/g de PUR)	Actividad retenida (%)
1	19,200 ± 462	40 ± 1.6	0.2
2	4,400 ± 254	176 ± 6.16	4
3	4300 ± 546	430 ± 35	10

La inmovilización no covalente en fibra de vidrio fue la segunda opción (ver metodología, inciso e) y resultó más eficiente que la metodología CPO-PUR. Brevemente, una solución concentrada de enzima se pone en contacto con la fibra de vidrio y la mezcla se liofiliza. Antecedentes en el grupo de trabajo sugerían que la CPO se inactiva durante el proceso de liofilización y que esta inactivación se reduce en presencia de sacarosa. La literatura ofrece algunos ejemplos en donde se combina la liofilización con la adición de crioprotectores como la sacarosa; un caso exitoso es la inmovilización de la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis* (LBADH) usada en un reactor en fase gas. La enzima liofilizada en presencia de sacarosa mostró una actividad comparable con la enzima en solución y además presentó mayor termoestabilidad, cerca de 40 veces más que la enzima nativa. Se sabe que la sacarosa funge como agente protector durante el congelamiento y posterior liofilización, evitando la desnaturalización de la proteína (Clara et al., 2004; Iyer y Ananthanarayan, 2008).

Con el propósito de prevenir la inactivación de la CPO al inmovilizarla en fibra de vidrio, adicionamos sacarosa a nuestra preparación; sin embargo, los controles sin sacarosa mostraron que la enzima no se inactiva, probablemente los grupos polares presentes en la fibra de vidrio protegen en cierto grado a la enzima. Sin embargo, la adición de sacarosa sí tuvo un efecto en la homogeneidad del catalizador, como se puede observar en la tabla 18. Brevemente, los datos de la se calcularon midiendo la cantidad de enzima presente en 3 secciones distintas (de peso conocido) del catalizador; las secciones se muestrearon como se ilustra

en la tabla 18. En ausencia de sacarosa, diferentes secciones de la fibra de vidrio contienen diferente cantidad de enzima, tanto en peso como en unidades enzimáticas. Por otro lado, se observó que en presencia de sacarosa todas las secciones muestreadas contienen cantidades similares de enzima.

**Tabla 18.** Efecto de la sacarosa en la homogeneidad del biocatalizador CPO-FV.

<b>Sin sacarosa</b>		<b>Con sacarosa</b>	
Enzima esperada: 0.238 mg/muestra		Enzima esperada: 0.232 mg/muestra	
Zona de muestreo	Enzima (mg)	Zona de muestreo	Enzima (mg )
1	0.166 ± 0.0016	1	0.226 ± 0.0015
2	0.044 ± 0.0017	2	0.183 ± 0.0146
3	0.099 ± 0.0015	3	0.231 ± 0.0083

Forma de Muestreo	1	
		2
		3

El catalizador con mayor actividad que se preparó siguiendo este procedimiento de inmovilización tuvo mas de 8,000 U/g de FV; al sumergir la fibra de vidrio en una solución acuosa, la enzima se redisuelve y esta enzima resuspendida retiene más del 90% de actividad originalmente inmovilizada. Esto se resume en la tabla 19, donde se muestran los resultados obtenidos de 4 inmovilizaciones distintas. Se puede apreciar que en términos de unidades enzimáticas no hay diferencia significativa antes y después de la inmovilización. Además se midió actividad del catalizador CPO-FV después de un mes de almacenamiento y no se detectó pérdida de actividad ni elución de la proteína.

**Tabla 19.** Actividad retenida de la preparación enzimática CPO-FV.

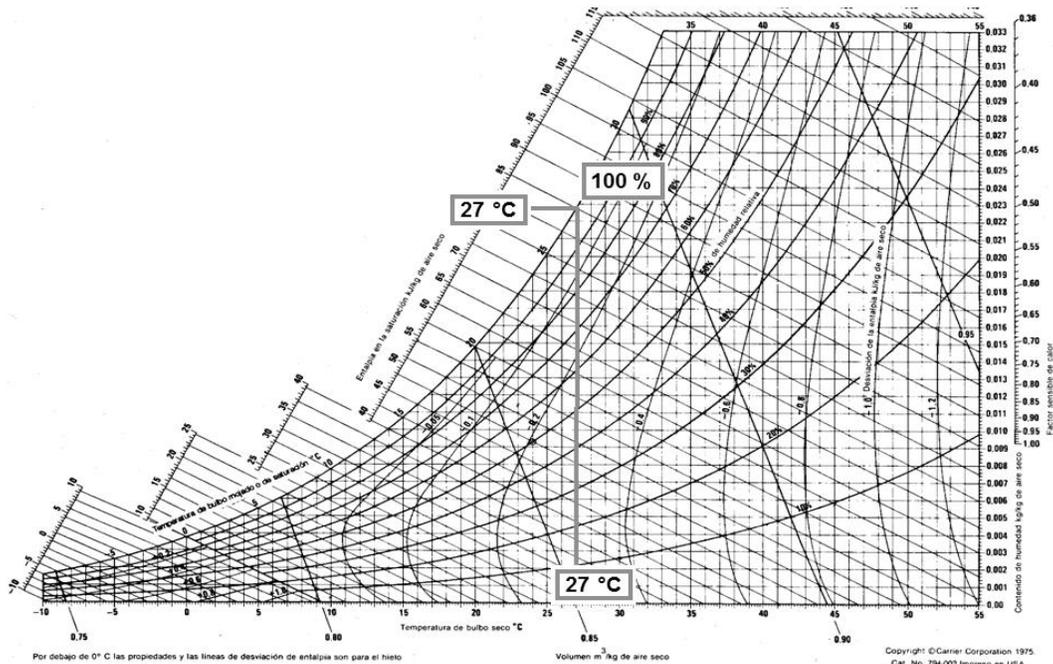
Catalizador	Enzima antes de inmovilizar (U)	Enzima después de inmovilizar (U)	U recuperadas (%)	Actividad (U/g de FV)
1	1,130 ± 95	1,470 ± 111	100	9,187
2	1,600 ± 42	1,300 ± 112	81	8,126
3	800 ± 78	800 ± 8	100	5,000
4	820 ± 42	800 ± 82	97	5,000

Por último, con el fin de comprobar que la enzima sigue siendo activa cuando se encuentra depositada en la fibra de vidrio, se midió la halogenación de un sustrato en una microemulsión con bajo contenido de agua, formada a partir de hexano-isopropanol-buffer (46/47.7/6.3). En este sistema, la enzima soluble tuvo una actividad específica de  $128 \text{ min}^{-1}$ , mientras que la enzima en fibra de vidrio tuvo una actividad de  $16 \text{ min}^{-1}$ . Esta alternativa de inmovilización en fibra de vidrio ha sido reportada para otras enzimas, no así para la cloroperoxidasa.

#### **4.6 Humedad relativa, pH y temperatura**

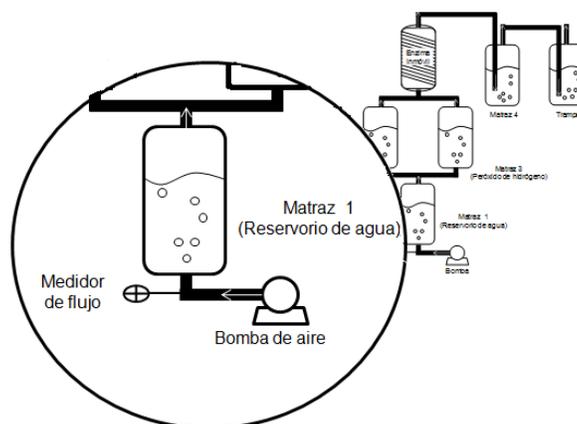
En esta sección se explican los criterios para fijar la humedad relativa del sistema, la temperatura de reacción y el pH al que se preparó el biocatalizador. Estos parámetros se mantuvieron fijos, en valores que consideramos son los más favorables para la catálisis de la cloroperoxidasa. Dentro de los parámetros que condicionan la catálisis en fase gas, uno de los más importantes es la humedad relativa en el sistema, como se describió en el apartado 1.2. Diversos estudios sobre el efecto del agua en la catálisis enzimática han demostrado la dependencia que la catálisis tiene con respecto al agua, ya sea funcionando como medio de reacción, parte funcional de la estructura enzimática, fungiendo como sustrato o simplemente como medio de difusión (Dunn and Daniel, 2004; Fangxiao y Alan, 1996a). Además la literatura ofrece diversos ejemplos de sistemas de reacción

enzimáticos en fase gas donde la humedad es determinante para la actividad. En este orden de ideas se estableció para nuestros experimentos en fase gas la mejor condición posible en términos de humedad. Mediante el método de bulbo húmedo y bulbo seco se determinó la temperatura de la corriente gaseosa que entraba al sistema, las temperaturas registradas en ambos bulbos se relacionaron entre sí en una tabla psicométrica como se muestra la figura 14 y de esta manera se estimó la humedad relativa.



**Figura 14.** Tabla psicométrica para calcular la humedad relativa.

En una primera serie de mediciones se determinó un valor de HR de 64 % en el sistema; al no observar reacción y para descartar que la disponibilidad de agua en la reacción sólido-gas fuese la limitante en la actividad de la CPO, se tomó la decisión de aumentar este valor y mantener el sistema al 100 % de humedad, esto último se realizó ajustando un reservorio de agua en el sistema de reacción y burbujear en él la corriente gaseosa utilizada para volatilizar los sustratos (figura 15).



**Figura 15.** Reservorio para mantener la humedad relativa del sistema.

Como se observa en la Tabla 4, la temperatura del sistema de reacción también es un parámetro estudiado en sistemas en fase gas. En sistemas cerrados, tipo lote, la temperatura es importante pues determina la presión de vapor y por tanto la concentración en fase gas de sustratos y productos. Por otro lado, la temperatura puede influir de forma importante en la actividad de la enzima: temperaturas altas provocan la desnaturalización de la proteína. Teniendo en cuenta que los sustratos CAV's son suficientemente volátiles para alcanzar concentraciones altas en la corriente gaseosa a temperatura ambiente; que la enzima es estable a temperatura ambiente durante días pero puede perder actividad en unas horas al exponerla a temperaturas mayores a 50 °C (Ayala et al., 2002; Bayramoglu et al., 2008); y que los vapores de peróxido pueden sufrir descomposición térmica (Hoare et al., 1958), decidimos realizar las reacciones a temperatura ambiente (27 °C).

Las inmovilizaciones se realizaron con la CPO en solución a pH 6, que es el óptimo para reacciones de transferencia de oxígeno. De esta manera asumimos que ese estado de ionización se conserva en nuestro catalizador después de la liofilización y durante las reacciones en fase gas. En resumen, las reacciones en fase gas se llevaron bajo las condiciones enlistadas en la tabla 20.

**Tabla 20.** Condiciones de temperatura humedad relativa y pH en el sistema sólido-gas.

---

<b>Temperatura (°C)</b>	27
<b>Humedad relativa (%)</b>	100
<b>pH</b>	6

---

#### ***4.7 Oxidación de compuestos azufrados volátiles en fase gas con CPO inmovilizada***

El objetivo principal de nuestro proyecto fue explorar la posibilidad de que la cloroperoxidasa fuese activa en reacciones sólido-gas. Para probar esta hipótesis se construyó un sistema de reacción, se establecieron las condiciones adecuadas para la reacción, en base en una revisión bibliográfica previa. Las condiciones de reacción experimentadas en términos generales fueron las siguientes: la concentración peróxido de hidrógeno fue de  $0.062 \text{ mmol.L}_{\text{aire}}^{-1}$  y las concentraciones de CAV's variaron entre 0.1 y  $48 \text{ mmol.L}_{\text{aire}}^{-1}$ ; la humedad relativa se controló en 100%; la inmovilización de la enzima se realizó a pH 6; y el sistema operó a temperatura ambiente ( $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Además, se utilizaron dos reactores de volumen distinto, con los cuales se establecieron tiempos de residencia de 0.3 y 10 segundos; con respecto a la enzima se usó entre 1 y 10 mg de biocatalizador con una carga enzimática de 1-10 mg CPO/g soporte. Las reacciones se llevaron a cabo durante 1, 2 y 10 horas. Cada 10 minutos se tomó una muestra correspondiente a la salida del efluente gaseoso y se analizó por espectrometría de masas.

Inicialmente, se realizaron pruebas con el sistema sólido-gas usando propanetiol y etil sulfuro como sustratos y como catalizador la preparación de CPO-PUR. Después de una hora de operación, se encontró que el catalizador se inactivaba por completo. Por otro lado, se detectaron trazas del producto de reacción en el soporte. El producto también se detectó en un control usando PUR sin enzima. Utilizando un estándar externo, se compararon las cantidades de sustrato en el

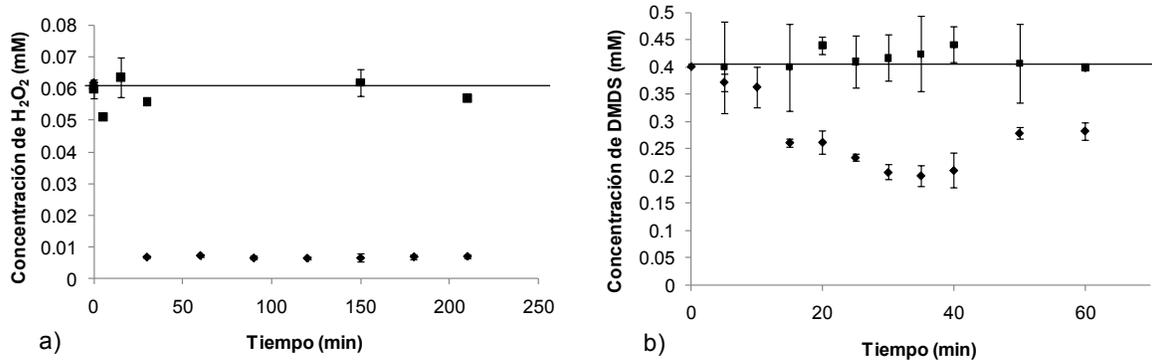
efluente de salida para el sistema con CPO-PUR y el control con sólo PUR. No se detectó una reducción significativa del sustrato en ninguno de los casos. Con estas pruebas iniciales, pudimos concluir que al usar propanetiol y etil sulfuro como sustratos se tiene oxidación química independiente de la presencia de la enzima. Además, bajo las condiciones de operación, el biocatalizador se inactiva totalmente en una hora. Es bien sabido que las peroxidasas sufren un proceso de desactivación generada por el peróxido (Valderrama et al., 2002). Comparando con los sistemas acuosos, en este sistema la concentración de peróxido en fase gas debería ser suficiente para generar actividad sin provocar rápida desactivación de la enzima como la que se observó en estas pruebas iniciales. Sin embargo, es probable que en el soporte PUR la concentración local de peróxido sea mayor que la esperada y si no hay una interacción apropiada de la enzima con el sustrato, entonces la desactivación por peróxido sería un fenómeno muy factible.

Con base en estas observaciones iniciales se cambiaron algunas condiciones del sistema de reacción. Se seleccionó el dimetil disulfuro (DMDS) como sustrato. De acuerdo con los resultados obtenidos en solución (tabla 11), este sustrato es el que tiene la menor velocidad de oxidación química no enzimática y es, comparativamente, mejor sustrato que los demás CAV's ensayados. Adicionalmente, se redujo la concentración del sustrato en fase gaseosa a 0.14 mM con el fin de favorecer una mayor conversión, ya que la reacción se encuentra limitada por la concentración de peróxido (0.1 mM), la cual no puede incrementarse más debido a limitaciones en el sistema usado para este trabajo. También se decidió usar el catalizador basado en fibra de vidrio (CPO-FV), que retiene mayor actividad que el basado en PUR. Además, se controló la humedad relativa al 100%, con el fin de favorecer la actividad enzimática. Se utilizó una cantidad de biocatalizador equivalente a 10 mg de CPO y el sistema se operó bajo estas condiciones por diez horas. Bajo estas condiciones, no se detectó la presencia de producto en el efluente de salida ni en el biocatalizador.

Otro factor importante en la catálisis en fase gas y que sin embargo ha sido un parámetro poco estudiado y reportado en la literatura, es el fenómeno de absorción de sustrato en el catalizador y su efecto en la catálisis enzimática (Kerasina et al., 2009). Por lo general se da mayor énfasis al fenómeno de la adsorción de agua, debido el papel que ésta desempeña en la catálisis. El único ejemplo de una enzima catalizando una reacción sobre un sustrato en fase gas es la hidrogenasa de *Desulfovibrio desulfuricans*. La catálisis en un sistema en fase sólido-gas implica un sistema heterogéneo donde el sustrato se encuentra en estado gaseoso mientras que la enzima se encuentra en un estado sólido; para interactuar con el sitio activo de la enzima, el sustrato debe adsorberse en el soporte o fase sólida en que se encuentra la enzima. Por esta razón se vuelve relevante la interacción soporte-sustrato y la cantidad de sustrato que puede ser adsorbido en el biocatalizador, ya que de eso dependerá la velocidad de la reacción. En ese contexto medimos la adsorción de peróxido de hidrógeno y dimetil disulfuro en nuestro catalizador CPO-FV.

En la figura 16 se muestra el comportamiento en la corriente de salida de la concentración de los sustratos en fase gaseosa; éstos se adsorben a velocidades y cantidades distintas. Como se puede observar en el perfil para el dimetil disulfuro, la concentración del sustrato a la salida decae en comparación con la concentración de entrada (0.4 mM) durante los primeros 40 min de operación del sistema; después de este tiempo, el soporte comienza a saturarse y la concentración de salida comienza a elevarse de nuevo. En teoría, cuando el soporte está saturado, la concentración de entrada y salida deben ser iguales. Por otro lado, la concentración de salida del peróxido no se eleva después de 210 min de operación, lo cual indica que la saturación está lejos de alcanzarse.

OXIDACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS VOLÁTILES UTILIZANDO LA CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago*



**Figura 16.** Concentración en fase gaseosa de los sustratos a la salida del sistema (a) peróxido de hidrógeno y (b) Dimetil disulfuro. (♦) en presencia del catalizador y (■) en ausencia del catalizador.

Los datos presentados en la figura 16 permiten calcular los moles adsorbidos y acumulados en el catalizador bajo estas condiciones de operación (0.4 mM de CAV y 0.062 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fase gaseosa); la figura 17 muestra que después de una hora de operación, aproximadamente  $6 \times 10^{-03}$  moles de dimetil disulfuro se han acumulado en el soporte, mientras que para igualar esa cantidad de moles de peróxido de hidrógeno adsorbidos se requieren 3.5 horas de operación; en una hora se acumulan sólo  $0.7 \times 10^{-03}$  moles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La proporción de azufrado/peróxido después de una hora de operación es de aproximadamente 10 veces más; considerando que la estequiometría de la reacción entre DMDS y peróxido es de 1:1, bajo estas condiciones el máximo de conversión de DMDS en una hora sería 10%. Con la finalidad de igualar la proporción de sustratos acumulados en el catalizador y aumentar la conversión teórica se decidió disminuir la concentración del dimetil disulfuro en la corriente de entrada a 0.14 mM.

OXIDACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS VOLÁTILES UTILIZANDO LA CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago*

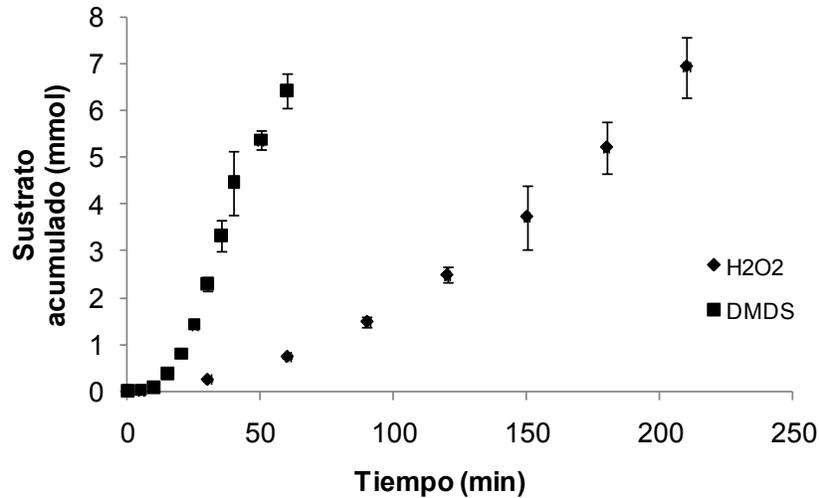


Figura 17. Perfil de moles de sustrato acumulado en el catalizador.

La figura 18 muestra el perfil de adsorción bajo esta nueva condición y los moles de DMDS adsorbidos en 1 hora. Como esperábamos, los moles adsorbidos de azufrado disminuyeron al grado de reducir la proporción de este último con respecto al peróxido de 10 a sólo 2 veces más, como lo muestra la tabla 21. Esto implica que en teoría debería convertirse el alrededor del 50 % del DMDS adsorbido y acumulado en el catalizador. De esta manera se esperaba que el sistema en condiciones de reacción favorables y proporciones adecuadas de sustratos, nos permitiera determinar si la cloroperoxidasa es capaz de catalizar reacciones en un sistema sólido-gas

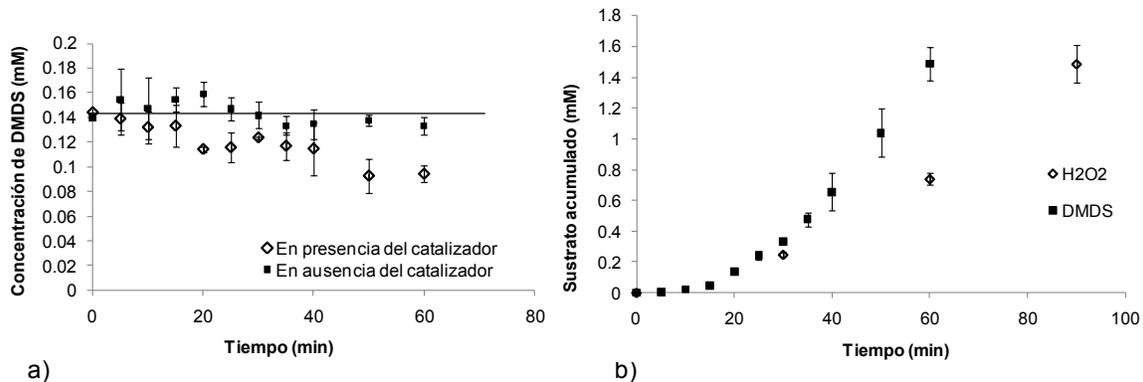


Figura 18. Perfil de adsorción de DMDS (a) y moles acumulados de sustratos en el catalizador (b).

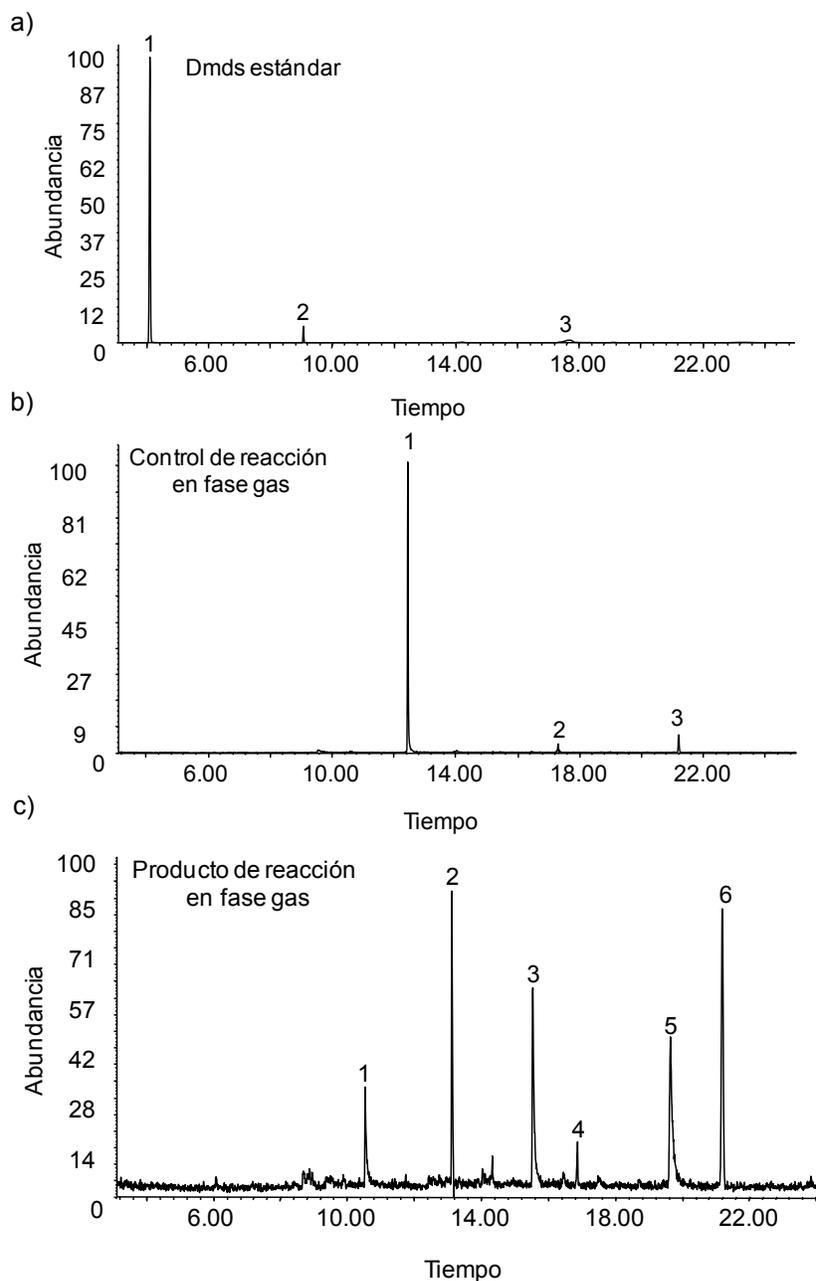
**Tabla 21.** Adsorción de sustrato en el biocatalizador CPO-FV.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulado (mmol)</b>	<b>DMDS acumulados (mmol)</b>
60	0.73 ± 0.03	1.48 ± 0.10

Debido a la menor volatilidad de los productos y a su polaridad, es posible que éstos se adsorban en el soporte del biocatalizador. Al final de la reacción el biocatalizador se lavó con un solvente inmiscible en agua y la muestra se analizó por espectrometría de masas. Se encontró una señal correspondiente al sulfóxido. Esta señal no se observó en la reacción control con fibra de vidrio pero sin enzima.

En la figura 19 se muestran las señales detectadas por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM).

OXIDACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS VOLÁTILES UTILIZANDO LA CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago*



**Figura 19.** Cromatografía de gases de las muestras extraídas del biocatalizador basado en fibra de vidrio. (a) DMDS estándar; (b) control, con peróxido y fibra de vidrio en ausencia de CPO; (c) reacción en presencia de CPO.

Como control, en el panel A se muestra el resultado para DMDS puro. Se observa mayoritariamente la señal de DMDS y dos pequeñas contaminaciones de otros compuestos azufrados (datos EM, Tabla 22).

**Tabla 22.** Ion espectral del DMDS estándar. Los números corresponden a los marcados en la Figura 19.

Panel A: DMDS puro

Señal	Compuesto	Iones espectrales (m/z)
1	Dimetil disulfuro	94(100)[M <sup>+</sup> ], 79(59), 61(12), 45(62), 32(3)
2	Metil propil disulfuro	122(70)[M <sup>+</sup> ], 94(9), 80(100), 64(14), 43(68)
3	1-cloro-2-metilsufonil-etileno	140(4)[M <sup>+</sup> ], 125(11), 79(15), 63(100), 45(6)

[M<sup>+</sup>], Ion molecular.

Por otro lado, en el panel B se muestran las señales que se obtuvieron al lavar la fibra de vidrio después de un tratamiento control; este tratamiento control consistió en operar el sistema utilizando las mismas condiciones que para la reacción (humedad, flujo, concentración de sustratos, tiempo) excepto que se utilizó fibra de vidrio liofilizada con sacarosa y sin enzima. En esta muestra se observan las señales de acetofenona, que es una contaminación, y compuestos de silicio que probablemente provienen de la fibra de vidrio, aunque también se pueden generar como producto de la degradación de la columna capilar utilizada en la CG (Tabla 23).

**Tabla 23.** Identificación de los productos de reacción en el control en fase gas. Los números corresponden a los marcados en la Figura 19.

Panel B: control de reacción en fase gas

Señal	Compuesto	Iones espectrales (m/z)
1	Acetofenona	120(34)[M <sup>+</sup> ], 105(100), 91(2), 77(99), 63(4), 51(33)
2	Derivado de silicio	ND
3	Derivado de silicio	ND

[M<sup>+</sup>], Ion molecular. ND. No determinado

Como se esperaba, el sustrato DMDS no se detectó debido a su naturaleza volátil. Tampoco se detectó ningún derivado azufrado generado por oxidación química.

En el panel C se muestran los compuestos detectados después de la reacción utilizando el catalizador de fibra de vidrio con CPO. En este caso, se detectaron varias señales (Tabla 24). Las señales 4 y 6 corresponden a los derivados de silicio observados también en el control. La señal 2 es la más abundante y corresponde al S-óxido dimetil disulfuro, el producto identificado previamente en la reacción fase acuosa. El producto, con un tiempo de retención de 13.10 min, está ausente en el control sin enzima.

**Tabla 24.** Identificación de los productos de reacción en fase gas. Los números corresponden a los marcados en la Figura 19.

Panel C: reacción en fase gas		
Señal	Compuesto	Iones espectrales (m/z)
1	Dimetil sulfona	94(65)[M <sup>+</sup> ], 79(100), 63(8), 48(8), 28(10)
2	S-óxido dimetil disulfuro	126(52)[M <sup>+</sup> ], 81(70), 63(58), 47(99), 45(85)
3	Metano (metil-sulfenil)(tiometano)	124(1)[M <sup>+</sup> ], 61(100), 45(12), 35(20), 27(15)
4	Derivado de silicio	ND
5	5-cloro-2,4-ditiohexano 2,2,4,4-tetraóxido	220(1)[M <sup>+</sup> ], 94(100), 79(40), 63(59), 43(6)
6	Derivado de silicio	ND

[M<sup>+</sup>], Ion molecular. ND. No determinado

En el panel C se observan otras señales que corresponden a compuestos azufrados y que solamente se observan en esta muestra, es decir, no se observaron en las reacciones en fase acuosa ni en el control (panel B). La señal 1 corresponde a la dimetil sulfona, que podría haberse generado a partir de trazas de dimetil sulfuro (DMS) presente en el DMDS. Debido a que el DMS más volátil que el DMDS, no se detecta en la ventana de análisis definida para el DMDS (panel A, figura 19). Las señales 3 y 5 fueron identificadas como derivados oxidados y halogenados, respectivamente. Con base en lo que conocemos del mecanismo de reacción de la cloroperoxidasa, es difícil explicar cómo pudieron

haberse formado estos compuestos a partir del DMDS. Es claro que la enzima juega un papel en su formación, puesto que estas señales no fueron detectadas en el control sin enzima. Cabe señalar que estos resultados son cualitativos, pues el sistema de análisis no permite cuantificar de forma apropiada a cada uno de los productos. Por tanto, la abundancia de estos nuevos productos y el mecanismo por el cual se generan es tema de estudios futuros.

Con estos resultados se confirmó la oxidación del DMDS mediado por la CPO en un medio de reacción gaseoso. Este tipo de reacciones no han sido reportados nunca con la CPO y representa un paso importante en la búsqueda de posibles aplicaciones para esta enzima, la cual ya tiene un enorme potencial de aplicación. El estudio más detallado y la optimización de reacciones en fase gas con la cloroperoxidasa permitirán evaluar su uso en el área de la biorremediación pero también en diferentes campos, como el de la síntesis orgánica. Este trabajo concluye de forma muy prometedora, al demostrar que bajo las condiciones adecuadas, la cloroperoxidasa es catalíticamente activa en un sistema de reacción sólido-gas.

## V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se demostró que los sulfuros y tioles volátiles pueden ser sustratos para la cloroperoxidasa en un medio de reacción predominantemente acuoso, con 10% v/v de solvente orgánico. Se obtuvieron valores de actividad específica para la oxidación de CAV's un orden de magnitud menores que los previamente reportados para compuestos azufrados de naturaleza aromática. Cabe mencionar que también se observaron valores de oxidación química elevados bajo las condiciones experimentadas. Sin embargo, a concentraciones de enzima del orden de nanomolar, la velocidad de la reacción es gobernada por la catálisis de la cloroperoxidasa.

En cuanto a los productos, se encontró que los sulfuros se transforman en sulfóxidos, como ha sido reportado para otros sulfuros no volátiles. De manera inesperada, se encontró que los tioles se convierten en el disulfuro correspondiente. Esta reacción se confirmó utilizando el bencenotiol, un tiol de naturaleza aromática, no volátil y que no se oxida en ausencia de la enzima; también en este caso se comprobó la formación del disulfuro. Esta reacción no había sido reportada previamente para la cloroperoxidasa y los resultados de este trabajo confirman que en las condiciones adecuadas la enzima es capaz de catalizar reacciones que involucran la formación de un enlace disulfuro.

Se implementó un sistema en continuo que permite la volatilización de los sustratos ( $H_2O_2$  y CAV's), siendo posible controlar la concentración de los compuestos en fase gaseosa a través de la manipulación el flujo de aire y la concentración en el reservorio del sustrato. Se pudieron establecer concentraciones en fase gas de 48 mM hasta 0.1mM de compuesto azufrado y 0.06 mM de  $H_2O_2$ . Se logró establecer condiciones de saturación de agua (100% HR) en aire, agregando al sistema de reacción en fase gas un reservorio con agua para humidificar la corriente de aire antes de que ésta pase por el catalizador.

La enzima fue inmovilizada en fibra de vidrio, obteniéndose un catalizador homogéneo en términos de carga enzimática y que retiene más del 85% de actividad. Mientras que la inmovilización en poliuretano no arrojó resultados satisfactorios. Por último, encontramos que es importante considerar la cantidad de sustrato adsorbido al soporte del biocatalizador; este es un aspecto poco estudiado en el campo de la biocatálisis en sistemas sólido-gas; sin embargo, es muy posible que varios de los ejemplos reportados en la literatura requieran la adsorción de los sustratos a la fase sólida para tener una interacción catalíticamente efectiva con la enzima.

El resultado más importante de este trabajo es que se demostró la capacidad de la CPO de catalizar la oxidación en fase gas del dimetil disulfuro a su respectivo sulfóxido, comprobando la hipótesis que se planteó al comienzo de este proyecto. Hasta donde sabemos, este es el primer ejemplo de una peroxidasa utilizada en sistemas sólido-gas. Los resultados de esta investigación demuestran que es posible el uso de la CPO en reacciones en fase gas y dejan abierto el panorama para futuros estudios de tipo cinético y termodinámico, con aplicaciones no sólo en el área de biorremediación, sino en otras áreas que involucran la generación de productos con alto valor agregado.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son una primera aproximación al fenómeno de la catálisis en fase gaseosa mediado por la cloroperoxidasa, y dado que las evidencias experimentales indican que esta enzima es capaz de ser activa en tales condiciones, se generan algunas perspectivas para trabajos futuros acerca del tema, por ejemplo el estudio de manera puntual de la absorción de sustrato en el catalizador y su relación con la naturaleza del soporte. En el transcurso del proyecto se demostró la importancia que este parámetro tiene en la catálisis en fase gaseosa, ya que determina la disponibilidad del sustrato para reaccionar con la enzima.

Otro posible tema de futuros estudios es el desarrollo de un sistema con las condiciones adecuadas para sobrellevar el problema de limitación de peróxido de hidrógeno, este parámetro es clave para la activación de la enzima y fue una limitante con la que nos enfrentamos en nuestra investigación. Además, es necesario que dicho sistema sea capaz de proporcionar datos cuantitativos de manera adecuada para llevar un mejor control de la reacción. Finalmente, sería apropiado reunir más evidencias de la catálisis en fase gaseosa mediado por la CPO con otros sustratos, por ejemplo con otros CAV's como el propanetiol, este último resultó ser el segundo mejor sustrato de acuerdo a los datos cinéticos obtenidos en nuestros ensayos en solución acuosa. Sin embargo, no necesariamente debe limitarse el estudio a compuestos de naturaleza azufrada; sería interesante observar si la enzima es capaz de catalizar reacciones tipo peroxigenasa sobre otros sustratos o reacciones que no sean de tipo peroxigenasa con sustratos de otra naturaleza química.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersson, F., T.S. Annika, A. Karlsson, B.H. Svensson, and J.R. Ejlertsson. 2004. Occurrence and abatement of volatile sulfur compounds during biogas production. *Journal of the air & waste management association*. 54:855-861.
- Andersson, M., B.K. Samra, H. Holmberg, and P. Adlercreutz. 1999. Use of celite-immobilised chloroperoxidase in predominantly organic media. *Biocatalysis and biotransformation*. 17:293-303.
- Aoun, S., C. Chebli, and M. Baboulène. 1998. Noncovalent immobilization of chloroperoxidase onto talc: catalytic properties of a new biocatalyst. *Enzyme and microbial technology*. 23:380-385.
- Ayala, M., N.R. Robledo, A. Lopez-Munguia, and R. Vazquez-Duhalt. 2000. Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase-catalyzed oxidation of diesel fuel. *Environmental science & technology*. 34:2804-2809.
- Ayala, M., R. Tinoco, V. Hernandez, P. Bremauntz, and R. Vazquez-Duhalt. 1998. Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel processing technology*. 57:101-111.
- Ayala, M., E. Horjales, M.A. Pickard, and R. Vazquez-Duhalt. 2002. Cross-linked crystals of chloroperoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 295:828-831.
- Bakker, M., F. Van de Velde, F. Van Rantwijk, and R.A. Sheldon. 2000. Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams. *Biotechnology and bioengineering*. 70:342-348.
- Barzana, E., A. Klibanov, and M. Karel. 1987. Enzyme-catalyzed, gas-phase reactions. *Applied biochemistry and biotechnology*. 15:25-34.

- Bayramoglu, G., S. Kiralp, M. Yilmaz, L. Toppare, and M.Y. Arica. 2008. Covalent immobilization of chloroperoxidase onto magnetic beads: Catalytic properties and stability. *Biochemical Engineering Journal*. 38:180-188.
- Bryan C. Dravis, K.E. Lejeune, A.D. Hetro, and A.J. Russell. 2000. Enzymatic dehalogenation of gas phase substrates with haloalkane dehalogenase. *Biotechnology and bioengineering*. 69:235-241.
- Casella, L., M. Gullotti, R. Ghezzi, S. Poli, T. Beringhelli, S. Colonna, and G. Carrea. 1992. Mechanism of enantioselective oxygenation of sulfides catalyzed by chloroperoxidase and horseradish peroxidase. Spectral studies and characterization of enzyme-substrate complexes. *Biochemistry*. 31:9451-9459.7.
- Clara, F., H. Matthias, H. Werner, D. Thomas, and B. Jochen. 2004. Optimization of enzymatic gas-phase reactions by increasing the long-term stability of the catalyst. *Biotechnology progress*. 20:975-978.
- Colonna, S., N. Gaggero, G. Carrea, and P. Pasta. 1997. A new enzymatic enantioselective synthesis of dialkyl sulfoxides catalysed by monooxygenases. *Chemical communications*: 439-44.
- Conesa, A., F. Van de Velde, F. Van Rantwijk, R.A. Sheldon, C.A.M.J.J. van den Hondel, and P.J. Punt. 2001. Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *The journal of biological chemistry*. 276:17635-17640.
- De Bo, I., J. Heyman, J. Vincke, W. Verstraete, and H. Van Langenhove. 2003. Dimethyl sulfide removal from synthetic waste gas using a flat poly(dimethylsiloxane)-oated composite membrane bioreactor. *Environmental science & technology*. 37:4228-4234.

- Debeche, T., C. Marmet, L. Kiwi-Minsker, A. Renken, and M.A. Juillerat. 2005. Structured fiber supports for gas phase biocatalysis. *Enzyme and microbial technology*. 36:911-916.
- Dimoula, K., A. Spiess, and J. Buechs. 2007. Gas phase reactions catalyzed by enzymes: Investigation of pressure effect. *Journal of biotechnology*. 131:S83-S84.
- Dimoula, K., P. Martina, B. Jochen, and C.S. Antje. 2009. Substrate and water adsorption phenomena in a gas/solid enzymatic reactor. *Biotechnology journal*. 4:712-721.
- Dunn, R.V., and R.M. Daniel. 2004. The use of gas phase substrates to study enzyme catalysis at low hydration. *Philosophical transactions of the royal society of london. Series B: Biological sciences*. 359:1309-1320.
- Fangxiao, Y., and J.R. Alan. 1996a. The role of hydration in enzyme activity and stability: 1. Water adsorption by alcohol dehydrogenase in a continuous gas phase reactor. *Biotechnology and bioengineering*. 49:700-708.
- Fangxiao, Y., and J.R. Alan. 1996b. The role of hydration in enzyme activity and stability: 2. Alcohol dehydrogenase activity and stability in a continuous gas phase reactor. *Biotechnology and bioengineering*. 49:709-716.
- Finlayson-Pitts, B.J., and J.N. Pitts. 1997. Tropospheric air pollution: Ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science*. 276:1045-1051.
- Franks, F. 1993. Protein hydration. In Protein biotechnology (ed.F. Franks), pp. 437-465. Totawa, NJ: *The Humana Press Inc.*

- Goto, Y., T. Matsui, S.I. Ozaki, Y. Watanabe and S. Fukuzumi. 1999. Mechanisms of sulfoxidation catalyzed by high-valent intermediates of heme enzymes: electron-transfer vs oxygen-transfer mechanism. *Journal of the american chemical society*. 121:9497-9502.
- Grey, C.E., F. Rundbäck, and P. Adlercreutz. 2008. Improved operational stability of chloroperoxidase through use of antioxidants. *Journal of biotechnology*. 135:196-201.
- Gronenborn, A. & Clore, M. 1997. Water in and around proteins. *Biochemistry*. 19:18–21.
- Hidaka, N., and T. Matsumoto. 2000. Gaseous ethanol oxidation by immobilized enzyme in a packed bed reactor. *Industrial & engineering chemistry research*. 39:909-915.
- Hoare, D.E., J.B. Protheroe, and A.D. Walsh. 1958. Thermal decomposition of hydrogen peroxide vapour. *Nature*. 182:654-654.
- Hwang, S.O., and Y.H. Park. 1997. Gas phase ethyl acetate production in a batch bioreactor. *Bioprocess and biosystems engineering*. 17:51-54.
- Iyer, P.V., and L. Ananthanarayan. 2008. Enzyme stability and stabilization-- Aqueous and non-aqueous environment. *Process biochemistry*. 43:1019-1032.
- Jan Sipma, A., J.H. Janssen, L.W. Hulshoff, and P.G. Lettinga. 2003. Development of a novel process for the biological conversion of H<sub>2</sub>S and methanethiol to elemental sulfur. *Biotechnology and bioengineering*. 82:1-11.

- Jung, D., C. Streb, and M. Hartmann. 2008. Oxidation of indole using chloroperoxidase and glucose oxidase immobilized on SBA-15 as tandem biocatalyst. *Microporous and mesoporous materials*. 113:523-529.
- Kadima, T.A., and M.A. Pickard. 1990. Immobilization of chloroperoxidase on aminopropyl-glass. *Applied and environmental microbiology*. 56:3473-3477.
- Katchalski-Katzir, E. 1993. Immobilized enzymes, learning from past successes and failures. *Trends in biotechnology*. 11:471-478.
- Kimura, K., Y. Nakahara, T. Yagi, and H. Inokuchi. 1979a. Electrical conduction of hemoprotein in the solid phase: Anhydrous cytochrome c<sub>3</sub> film. *The journal of chemical physics*. 70:3317-3323.
- Kimura, K., A. Suzuki, H. Inokuchi, and T. Yagi. 1979. Hydrogenase activity in the dry state Isotope exchange and reversible oxidoreduction of cytochrome c<sub>3</sub>. *Biochimica et biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. 567:96-105.
- Kobayashi, S., M. Nakano, T. Kimura, and A.P. Schaap. 1987. On the mechanism of the peroxidase-catalyzed oxygen-transfer reaction. *Biochemistry*. 26:5019-5022.
- Kornblatt, J. & Kornblatt, J. 1997. The role of water recognition and catalysis by enzymes. *Biochemistry*. 19:14-17.
- Lamare, S., and M.-D. Legoy. 1993. Biocatalysis in the gas phase. *Trends in biotechnology*. 11:413-418.
- Lind, P.A., R.M. Daniel, C. Monk, and R.V. Dunn. 2004. Esterase catalysis of substrate vapour: enzyme activity occurs at very low hydration. *Biochimica et biophysica acta (BBA) - Proteins & Proteomics*. 1702:103-110.

- Liu, J.Z., and M. Wang. 2007. Improvement of activity and stability of chloroperoxidase by chemical modification. *BMC biotechnology*. 7:23.
- Longoria, A., R. Tinoco, and R. Vázquez-Duhalt. 2008. Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds. *Chemosphere*. 72:485-490.
- Manoj, K.M., and L.P. Hager. 2008. Chloroperoxidase, a janus enzyme. *Biochemistry*. 47:2997-3003.
- Nagata, Y. 1988. Measurement of odor threshold value of odor substances by triangle odor bag method. *Proceedings of the 29th annual meeting of the japan society of air pollution*. 29:528
- Noble, R.W., and Q.H. Gibson. 1970. The reaction of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide. *The journal of biological chemistry*. 245:2409-2413.
- Otsuki, S., T. Nonaka, N. Takashima, W. Qian, A. Ishihara, T. Imai, and T. Kabe. 2000. Oxidative desulfurization of light gas oil and vacuum gas oil by oxidation and solvent extraction. *Energy & fuels*. 14:1232-1239.
- Petri, A., T. Gambicorti, and P. Salvadori. 2004. Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. 27:103-106.
- Pickard, M.A., T.A. Kadima, and R.D. Carmichael. 1991. Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 7:235-241.
- Radzicka, A., and R. Wolfenden. 1995. A proficient enzyme. *Science*. 267:90-93.

- Rantwijk, F.V., and R.A. Sheldon. 2000. Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects. *Current opinion in biotechnology*. 11:554-564
- Ru, M.T., J.S. Dordick, J.A. Reimer, and D.S. Clark. 1999. Optimizing the salt-induced activation of enzymes in organic solvents: Effects of lyophilization time and water content. *Biotechnology and Bioengineering*. 63:233-241.
- Schiffman, S.S., and C.M. Williams. 2005. Science of odor as a potential health issue. *Journal of environmental quality*. 34:129-138.
- Serdakowski, A.L., and J.S. Dordick. 2008. Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends in Biotechnology*. 26:48-54.
- Silverstein, R.M., and L.P. Hager. 1974. Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of thiols and disulfides to sulfenyl chlorides. *Biochemistry*. 13:5069-5073.
- Skujins, J.J., and A.D. McLaren. 1967. Enzyme reaction rates at limited water activities. *Science*. 158:1569-1570.
- Smet, E., and H.V. Langenhove. 1998. Abatement of volatile organic sulfur compounds in odorous emissions from the bio-industry. *Biodegradation*. 9:273-284.
- Smet, E., P. Lens, and H. Van Langenhove. 1998. Treatment of waste gases contaminated with odorous sulfur compounds. *Critical reviews in environmental science and technology*. 28:89 - 117.
- Sundaramoorthy, M., J. Turner, and T.L. Poulos. 1995. The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure*. 3:1367-1378.

- Sylvain, L., L. Marie-Dominique, and G. Marianne. 2005. Solid/gas bioreactors: powerful tools for fundamental research and efficient technology for industrial applications. *ChemInform*. 6: 445-458.
- Sylvain, L., L. Robert, and L. Marie Dominique. 1997. Kinetic studies of fusarium solani pisi cutinase used in a gas/solid system: Transesterification and hydrolysis reactions. *Biotechnology and bioengineering*. 56:1-8.
- Terrés, E., M. Montiel, S. Le Borgne, and E. Torres. 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.
- Tuynman, A., K.S.V. Mandy, L.D. Henk, E.S. Hans, and W. Ron. 1998. The sulfoxidation of thioanisole catalysed by lactoperoxidase and *Coprinus cinereus* peroxidase: Evidence for an oxygen-rebound mechanism. *European Journal of Biochemistry*. 258:906-913.
- Valderrama, B., M. Ayala, and R. Vazquez-Duhalt. 2002. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry & biology*. 9:555-565.
- Van de Velde, F., M. Bakker, F. van Rantwijk, G.P. Rai, L.P. Hager, and R.A. Sheldon. 2001. Engineering chloroperoxidase for activity and stability. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. 11:765-769.
- Van de Velde, F., M. Bakker, F. Van Rantwijk, R.A. Sheldon. 2001. Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidations in hydrophobic organic media. *Biotechnology and bioengineering*. 72:523-529.

- Van Deurzen, M.P.J., I.J. Remkes, F. Van Rantwijk, and R.A. Sheldon. 1997. Chloroperoxidase catalyzed oxidations in t-butyl alcohol/water mixtures. *Journal of molecular catalysis: Chemical*.117:329-337.
- Welinder, K.G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases *Current opinion in structural biology*. 2:377-390.
- Yagi, T., K. Kimura, H. Daidoji, F. Sakai, S. Tamura, and H. Inokuchi. 1976. Properties of purified hydrogenase from the particulate fraction of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki. *The journal of biochemistry*. 79:661-671.
- Yagi, T., M. Tsuda, Y. Mori, and H. Inokuchi. 1969. Hydrogenase activity in the dry state. *Journal of the american chemical society*. 91:2801-2801.
- Yang, Z., D. Zacherl, and A.J. Russell. 1993. pH Dependence of subtilisin dispersed in organic solvents. *Journal of the american chemical society*. 115:12251-12257.
- Zhang, L.H., C.H. Bai, Y.S. Wang, Y.C. Jiang, M.C. Hu, S.N. Li, and Q.G. Zhai. 2009. Improvement of chloroperoxidase stability by covalent immobilization on chitosan membranes. *Biotechnology letters*. 31:1269-1272.

## REFERENCIAS WEB

Chem blink, online database of chemicals from around the world. (2010). Propyl disulfide. <http://www.chemblink.com/products/629-19-6.htm>. Último acceso 01/08/2010.

Chemspider, building community for chemist. (2009). Ethyl sulfóxido. <http://www.chemspider.com/RecordView.aspx?rid=30fe361e-5f5f-4946-9c3f-1e54988d15fc>. Último acceso 01/08/2010.

Chemspider, building community for chemist. (2009). Methyl methanethiosulfinate. <http://www.chemspider.com/RecordView.aspx?rid=aa4f13f2-d86d-4be3-b902-e54f430181b7>. Último acceso 01/08/2010.

Lookchem, look for chemicals. (2008). Diethyl sulfoxide. <http://www.lookchem.com/Diethyl-sulfoxide/>. Último acceso 01/08/2010.

Matheson tri-gas. (2010). Material safety data sheet substance: ethyl sulfide. <http://www.mathesongas.com/pdfs/msds/MAT09240.pdf>. Último acceso 01/08/2010.

Matheson tri-gas. (2010). Material safety data sheet substance: methyl disulfide. <https://www.mathesongas.com/pdfs/msds/MAT14450.pdf>. Último acceso 01/08/2010.

Matheson tri-gas. (2010). Material safety data sheet substance: ethyl mercaptan. <https://www.mathesongas.com/pdfs/msds/MAT09070.pdf>. Último acceso 01/08/2010.

NIST chemistry webBook. (2008). Libro del web de química del NIST <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Último acceso 01/08/2010.

Safety officer in physical chemistry at oxford university. (2004). Safety data for phenyl disulfide. [http://msds.chem.ox.ac.uk/PH/phenyl\\_disulfide.html](http://msds.chem.ox.ac.uk/PH/phenyl_disulfide.html). Último acceso 01/08/2010.

Science lab. (1997). Material safety data Sheet 1-Propanethiol MSDS. [http://www.sciencelab.com/xMSDS-1\\_Propanethiol-9924725](http://www.sciencelab.com/xMSDS-1_Propanethiol-9924725). Último acceso 01/08/2010.

Science lab. (2008). Material safety data sheet 1-butanethiol MSDS. [http://www.sciencelab.com/xMSDS-1\\_Butanethiol-9927113](http://www.sciencelab.com/xMSDS-1_Butanethiol-9927113). Último acceso 01/08/2010.

Science lab. (2008). Material safety data sheet thiophenol MSDS. <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9925246>. Último acceso 01/08/2010.

Scribd. (2007). Antoine coefficient table. <http://www.scribd.com/doc/22857803/Antoine-Coefficient-Table-Scribd-4787907-MT03>. Último acceso 01/08/2010.

The dow chemical company. (1995). Dow polyurethane systems products. <http://www.dow.com/pusystems/product/hypol.htm?folderName=>. Último acceso 01/08/2010.

The Good Scents Company. (2010). Propyl disulfide. <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1035611.html>. Último acceso 01/08/2010.

The Good Scents Company. (2010). Dihexyl disulfide.  
<http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1600681.html>. Último acceso  
01/08/2010.

The Good Scents Company. (2010). Butyl disulfide.  
<http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1056681.html>. Último acceso  
01/08/2010.

Tokyo Chemical Industry europe n.v. (2010). Safety data sheet hexyl mercaptan.  
<http://www.wku.edu/msds/docs/3345.pdf>. Último acceso 01/08/2010.

ANEXOS



**XIII Congreso Nacional  
de Biotecnología y Bioingeniería**



**VII Simposio Internacional de  
Producción de Alcoholes y Levaduras**

**OXIDACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS VOLÁTILES UTILIZANDO UNA CLOROPEROXIDASA.**

Julio César Cruz de la Cruz, Rafael Vázquez Duhalt, Marcela Ayala Aceves. Instituto de Biotecnología UNAM. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, C.P. 62210. Cuernavaca, Morelos. Fax: 777-3172388. jcruz@ibt.unam.mx.

*Palabras clave: cloroperoxidasa, oxidación, compuestos azufrados volátiles.*

**Introducción.** La cloroperoxidasa (CPO; EC 1.11.1.10) de *Caldariomyces fumago* es la más versátil de las hemoenzimas conocidas, debido a su capacidad de catalizar diversas reacciones; como halogenasa, peroxidasa, catalasa y peroxigenasa (1). La actividad peroxigenasa le permite catalizar la oxidación de compuestos azufrados a sus respectivos sulfóxidos (2) confiriéndole potencial para convertirse en un importante catalizador industrial. Particularmente en el campo de la biorremediación, con aplicación a la detoxificación de efluentes contaminados con compuestos azufrados. El propósito de este trabajo es estudiar la capacidad de la CPO para catalizar la oxidación de compuestos azufrados volátiles (CAVs) en presencia de peróxido de hidrógeno.

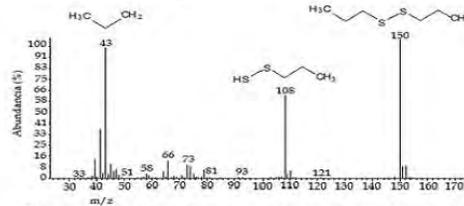
**Metodología.** Se utilizó como modelo de estudio CAVs disponibles comercialmente; propanetiol, etil sulfuro y metil disulfuro. Se determinó por HPLC la actividad específica en solución llevando a cabo la reacción en 1 ml, 20 % ACN, 5 mM de CAVs y 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en una solución amortiguadora de fosfatos 60 mM pH 6 y a temperatura ambiente por 10 min. Los productos de reacción fueron extraídos con diclorometano para su análisis e identificación por espectrometría de masas (GC-MS)

**Resultados y discusión.** De los 3 compuestos azufrados volátiles ensayados como sustrato para la CPO todos resultaron oxidados y los productos de reacción fueron claramente identificados para dos de ellos (figuras 1 y 2). Por otro lado, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede oxidar por sí mismo los CAVs, sin embargo, en presencia de la enzima el porcentaje de conversión alcanza para algunos

(Tabla 1) comparables con las actividades reportadas en estudios previos para compuestos azufrados aromáticos y alifáticos no volátiles (3).

*Cuadro 1. Actividad específica de la CPO para la oxidación de compuestos azufrados volátiles.*

CAVs	Actividad Específica (min <sup>-1</sup> )	Conversión enzimática %	Conversión Química %	Total % (10 min)
Metil disulfuro	1,456.30	30	19	49
Etil sulfuro	1,747.57	14	13	27
Propanetiol	679.25	36	32	68



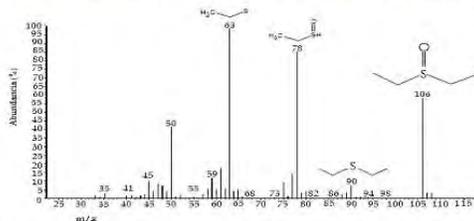
*Figura 2. Espectro de masas del producto de reacción del propanetiol*

**Conclusiones.** La cloroperoxidasa es capaz de catalizar la oxidación de CAVs por medio de la transferencia de oxígeno (peroxigenación) como se observó para el etil sulfuro. No obstante, el producto de la oxidación del propanetiol no fue un compuesto oxigenado como se esperaba, si no que el grupo tiol se oxidó formando un enlace disulfuro entre dos moléculas de propanetiol. Este tipo de catálisis no había sido reportada antes para la CPO.

**Agradecimiento.** CONACyT 56718 y a la Biol. Rosa Román por su asistencia técnica

**Bibliografía.**

- Sundaramoorthy M., Terner J., and Poulos T.L. (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Curr. Biol.* 3:1367-1377.
- Van Rantwijk F. and Sheldon R. A. (2000). Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:554-564.
- Ayala M., Robledo N., Lopez-Munguia A., Vazquez-Duhalt R. (2000). Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase-catalyzed oxidation of diesel fuel. *Environ. Sci. Technol.* 34:2804-2809.



*Figura 1. Espectro de masas del producto de reacción del etil sulfuro*

sustratos hasta el doble que el obtenido por oxidación química. Se obtuvieron valores de actividad específica



# Oxidación de compuestos azufrados utilizando la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*.

Julio César Cruz de la Cruz, Rafael Vázquez Duhalt, Marcela Ayala Aceves. Instituto de Biotecnología UNAM. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, C.P. 62210. Cuernavaca, Morelos. Fax: 777-3172388. jcruz@ibt.unam.mx.



Palabras clave: cloroperoxidasa, oxidación, compuestos azufrados volátiles.

## INTRODUCCIÓN

La cloroperoxidasa (CPO; EC 1.11.1.10) de *Caldariomyces fumago* es la más versátil de las hemo enzimas conocidas, debido a su capacidad de catalizar diversas reacciones; como halogenasa, peroxidasa, catalasa y peroxigenasa (1). La actividad peroxigenasa le permite catalizar la oxidación de compuestos azufrados a sus respectivos sulfóxidos (2) confiriéndole potencial para convertirse en un importante catalizador industrial. Particularmente en el campo de la biorremediación, con aplicación a la detoxificación de efluentes contaminados con compuestos azufrados. El propósito de este trabajo es estudiar la capacidad de la CPO para catalizar la oxidación de compuestos azufrados volátiles (CAVs) en presencia de peróxido de hidrógeno.

## RESULTADOS

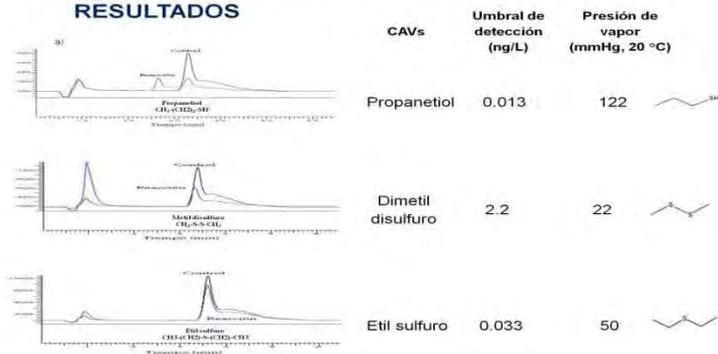


Figura 1. Cromatogramas de HPLC que muestra n la desaparición de sustrato mediado por la actividad enzimática de CPO.(a) y estructura de la CPO (b)

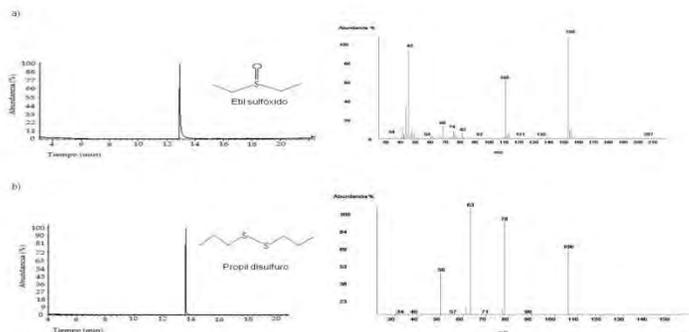


Figura 2. Cromatogramas y espectros de masas para los productos de reacción del etil sulfuro (a) y propanetiol (b)

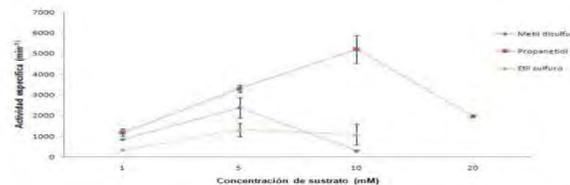


Figura 3. Concentración de sustrato contra actividad específica de la CPO con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10 min de reacción.

Cuadro 1. Actividad específica de la CPO para la oxidación de compuestos azufrados volátiles.

CAVs	Actividad específica (min <sup>-1</sup> )	Conversión enzimática % (10 min)	Conversión química % (10 min)	Conversión Q + E (10 min)
Metil disulfuro	1,456.30	30	19	49
Etil sulfuro	1,747.57	14	13	27
Propanetiol	679.25	36	32	68

## CONCLUSIONES

La cloroperoxidasa es capaz de catalizar la oxidación de CAVs por medio de la transferencia de oxígeno (peroxigenación) como se observó para el etil sulfuro. No obstante, el producto de la oxidación del propanetiol no fue un compuesto oxigenado como se esperaba, sino que el grupo tiol se oxidó formando un enlace disulfuro entre dos moléculas de propanetiol. Este tipo de catálisis no había sido reportada antes para la CPO. También se observó que las características cinéticas de la CPO en solución tienen un comportamiento atípico que no se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten y que sugiere una posible inhibición por sustrato.

## BIBLIOGRAFIA

- Sundaramoorthy M., Turner J., and Poulos T.L. (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Curr. Biol.* 3:1367-1377.
- Van Rantwijk F. and Sheldon R. A. (2000). Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:554-564.

1 Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of volatile organo sulfur compounds:

2 Enzymatic oxidation to reduce volatility of nauseous compounds

3

4 Julio C. Cruz, Rafael Vazquez-Duhalt, Marcela Ayala\*

5

6 Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos, México

7

8 \*Marcela Ayala. Departamento de Biocatálisis e Ingeniería Celular. Instituto de

9 Biotecnología, UNAM. Avenida Universidad 2001. Col. Chamilpa 62210

10 Cuernavaca, Morelos, México. E-mail: maa@ibt.unam.mx Tel. (52-777) 3291619

11 Fax (52-777) 3172388

12

13 ABSTRACT

14

15 In this work we report the oxidation of volatile organosulfur compounds and

16 mercaptans, catalyzed by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. Ethyl

17 sulfide, dimethyl disulfide, propanethiol, butanethiol and hexanethiol were treated

18 under peroxidasic conditions at pH 6. Sulfides were oxidized to their respective

19 sulfoxides whereas thiols were oxidized to the corresponding disulfides, a reaction

20 not previously reported for this enzyme. The identified products showed lower

21 vapor pressure than the parental compound, thus reducing its ability to pollute the

22 atmosphere. Kinetic characterization showed that the enzyme catalytic proficiency

23 for the oxidation of these compounds is in the order of  $10^6 \text{ M}^{-1}$ .

24

25 INTRODUCTION

26

27 Chloroperoxidase (CPO, EC 1.11.1.10) from *Caldariomyces fumago* is an  
28 attractive enzyme for application in several and diverse fields such as the fine  
29 chemical and pharmaceutical industry (23), diagnosis (18) as well as the oil-related  
30 industry (5) and environment remediation (11, 15, 30). CPO's versatility is  
31 determined by its ability to catalyze different reactions under controlled conditions,  
32 including halogenation (chlorination, bromination and iodination), dehydrogenation,  
33 oxygen insertion and peroxide dismutation. In addition, low substrate specificity  
34 allows CPO to catalyze the transformation of a wide range of compounds of  
35 different nature (12, 17). One of the most interesting catalytic modality of CPO is  
36 the peroxygenation activity to catalyze the oxidation of olefins and sulfur  
37 compounds and generate epoxides and sulfoxides, respectively. The latter reaction  
38 has been studied from different perspectives, namely the production of optically  
39 active sulfoxides and the oxidation of sulfur compounds present in fossil fuels.

40 The broad specificity displayed by CPO towards organosulfur compounds is  
41 well established. The enantioselective generation of (*R*)-sulfoxides catalyzed by  
42 CPO has been thoroughly studied. The enzyme is able to catalyze the oxidation of  
43  $\beta$ -carbonyl sulfides, cycloalkyl methyl sulfides, alkyl aryl sulfides, dialkyl sulfides  
44 and cyclic sulfides to their respective sulfoxides (1, 8, 32, 33). The enzyme also  
45 catalyzes the oxidation of methionine and derivatives to (*R*)-sulfoxides (13). The  
46 enantioselectivity is generally favored in the absence of halogens ions and pH near  
47 neutrality (pH 6). Under acidic conditions (pH 3) and in the presence of chloride,  
48 the enzyme catalyzes the oxidation of sulfides to the racemic mixture of sulfoxides.

49 Under these conditions, the sulfoxidation of aromatic and heterocyclic compounds  
50 has been reported (3). Furthermore, significant enzymatic transformation of the  
51 sulfur-containing fraction in straight diesel fuel has been reported, thus highlighting  
52 the ability of CPO to catalyze the oxidation of chemically diverse organosulfur  
53 compounds (4).

54       Regarding short-chain organosulfur compounds, these compounds display  
55 low odor threshold and very low hedonic character, characteristic of the putrid odor  
56 of rotten egg and vegetables (26). Exposure to even low concentrations of these  
57 compounds lead to dizziness, vomiting, headaches and eye irritation (2). Thus,  
58 these compounds are classified as atmospheric pollutants particularly affecting the  
59 area surrounding sources of emission, such as waste water treatment plants,  
60 composting sites, paper pulping process and thermal-sludge treatment plants (29).

61       Considering the low specificity of CPO for sulfur compounds and the  
62 environmental problem that volatile organosulfur compounds represent, it was  
63 interesting to study the ability of the enzyme to catalyze the oxidation of short-  
64 chain, volatile sulfides and thiols. The results are focused on the kinetic behavior of  
65 the enzyme and the identification of products.

66

67

68

69

70

71

72

73 RESULTS AND DISCUSSION

74

75 CPO from *Caldariomyces fumago* was produced and purified as reported  
76 elsewhere (21) with a Rz ( $A_{398\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ) of 1.2. Biocatalytic oxidation of  
77 organosulfur compounds was performed at room temperature in 1-mL reaction  
78 mixture containing 10% acetonitrile and 60 mM phosphate buffer pH 6, in the  
79 presence of 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction was started by addition of the enzyme (0.05-  
80 0.1 nmol) and substrate conversion was monitored through HPLC.

81 All compounds tested were transformed in the presence of CPO at pH 6.  
82 Under these conditions, non-enzymatic oxidation of the substrates also occurred.  
83 The rate of the catalyzed reaction was thus calculated as the difference between  
84 total rate in the presence of the enzyme and control rate in the absence of enzyme.  
85 The pseudo-first order rate constants of the catalyzed ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) and uncatalyzed  
86 ( $k_{\text{non}}$ ) reaction were calculated from the linear phase of rate vs substrate  
87 concentration plot and are shown in Table 1. The catalytic proficiency, also shown  
88 in Table 1, is the ratio of these rate constants and has been interpreted as the  
89 enzyme ability to lower the activation barrier of the reaction (22). In units of  
90 concentration, the catalytic proficiency relates to the affinity between the enzyme  
91 and the chemically distorted substrate in the transition state. For CPO in this  
92 system, the dissociation constant is in the range of 100 nM or less, suggesting a  
93 strong interaction within the active center.

94

95

96

97 Table 1. Kinetic characterization of CPO-catalyzed and uncatalyzed oxidation of  
98 organosulfur compounds

Substrate	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ )*	$k_{\text{non}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )*	Catalytic proficiency ( $k_{\text{cat}}/K_m$ )/ $k_{\text{non}}$ ( $\text{M}^{-1}$ )
Dimethyl disulfide	0.7826 (0.8116)	0.0183 (0.9881)	$42.76 \times 10^6$
Ethyl sulfide	0.2576 (0.9022)	0.0149 (0.9220)	$17.28 \times 10^6$
n-Propanethiol	1.3998 (0.7592)	0.027 (0.9900)	$51.84 \times 10^6$
n-Butanethiol	1.0906 (0.7027)	0.0414 (0.9054)	$26.34 \times 10^6$
n-Hexanethiol	0.158 (0.9430)	0.0358 (0.7845)	$4.41 \times 10^6$

99 \*In parenthesis, the  $R^2$  of the linear correlation is shown

100

101 The mass spectra parameters of the reaction products are shown in Table 2.

102 The oxidation of sulfides generated the corresponding sulfoxides. The CPO

103 catalytic mechanism for the oxidation of sulfides may involve a direct oxygen

104 transfer within the active site of the enzyme, as suggested by evidence showing

105 almost quantitative incorporation of labeled oxygen from  $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$  into the sulfoxide

106 (6, 10, 32). The formation of a short-lived sulfur-based free radical has also been

107 invoked, but has not been demonstrated yet (14, 31).

108

109

110

111

112

113 Table 2. Mass spectra parameters of the products from CPO-catalyzed oxidation of  
114 volatile sulfides and thiols

Substrate	Product	Spectral ions (m/z)
Dimethyl disulfide	S-oxide dimethyldisulfide	110(78)[M <sup>+</sup> ], 95(41), 79(6), 64(100), 45(98)
Ethyl sulfide	Ethyl sulfoxide	106(14)[M <sup>+</sup> ], 90(2), 78(100), 63(69), 50(51)
n-Propanethiol	Propyl disulfide	150(33)[M <sup>+</sup> ], 108(23), 43(100), 27(13)
n-Butanethiol	Butyl disulfide	178(39)[M <sup>+</sup> ], 122(36), 57(100), 41(52), 29(38)
n-Hexanethiol	Hexyl disulfide	234(184)[M <sup>+</sup> ], 150(27), 117(19), 85(33), 55(18), 43(100)
Benzenethiol	Phenyl disulfide	218(62)[M <sup>+</sup> ], 185(16), 154(18), 109(100), 77(11) 65(44)

115

116 Values in parentheses are relative abundances. [M<sup>+</sup>], molecular ion.

117

118 On the other hand, we observed that thiols were oxidized to the  
119 corresponding disulfides. To the best of our knowledge, no previous report of this  
120 reaction is available. The non-enzymatic formation of a disulfide has been reported  
121 as a consequence of enzymatic thiol halogenation at acidic pH (28), thus ruling out  
122 a similar mechanism under the peroxidasic conditions used in the present study. In  
123 order to further confirm this type of reaction being catalyzed by CPO, we identified  
124 phenyl disulfide (see Table 2) as the product of the oxidation of an aromatic thiol,  
125 benzenethiol. These results demonstrate that the enzyme is able to catalyze  
126 disulfide formation; from an electronic point of view, Compound I may be able to  
127 subtract an electron from the thiol group; the free radical, after losing a proton,  
128 combines with a second free thyl radical to form the disulfide. CPO activity has  
129 been related to the ionization potential of the substrates (3), thus the low catalytic

130 efficiency of CPO in thiol oxidation could be explained in terms of the high  
131 ionization energy displayed by the substrates (around 9.2 eV). However, more  
132 detailed experiments should be performed to establish the actual catalytic  
133 mechanism.

134 Physical properties of substrates and products are shown in Table 3. The  
135 oxidation generates compounds with higher boiling point and reduced vapor  
136 pressure, and thus decreased volatility; although the toxicity is not significantly  
137 affected, the oxidation decreases the gaseous pollutant character of the studied  
138 sulfur compounds.

139 Table 3. Physical properties of the studied compounds and the generated  
140 products.

Substrate/ Product	Vapor pressure <sup>a</sup> (mmHg@ 20 °C)	Boiling point <sup>b</sup> (°C)	Toxicity Oral-rat LD <sub>50</sub> (g/kg)
Dimethyl disulfide / S-oxide dimethyldisulfide	22 0.40	109 202*	0.19 <sup>c</sup> ND
Ethyl sulfide/ Ethyl sulfoxide	50 0.25	90 212	5.90 <sup>c</sup> 5.60 <sup>d</sup>
n-Propanethiol/ Propyl disulfide	122 0.35	67 196	1.79 <sup>e</sup> 2.00 <sup>f</sup>
n-Butanethiol/ Butyl disulfide	45 0.03	98 226	1.50 <sup>e</sup> ND
n-Hexanethiol/ Hexyl disulfide	4.5 0.00027	152* 305*	1.2 <sup>g</sup> ND

141 ND, not determined. a, evaluated as in reference (27) Scribd. b, reference (20)  
142 NIST, except \*(7) chemspider. c, reference (19) methsongas. d, reference (16)  
143 lookchem. e, reference (24) sciencelab. f, reference (9) goodcents. g, reference  
144 (34) wku.

145

146 In conclusion, CPO from *C. fumago* is able to catalyze the oxidation of short-  
147 chain sulfides and mercaptans to generate the corresponding sulfoxides and  
148 disulfides. The products are less volatile compounds, and its ability to pollute the  
149 atmosphere is thus reduced by oxidation.

150

151 **Acknowledgments.** This work was supported by grant IN212510 from PAPIIT  
152 UNAM. We thank Rosa Roman and Lucía Perezgasga for technical support.

153

#### 154 REFERENCES

155

- 156 1. **Allenmark G.A., and M.A. Andersson.** 1998. Chloroperoxidase-induced  
157 asymmetric sulfoxidation of some conformationally restricted sulfides.  
158 *Chirality*. **10**:246-252.
- 159 2. **Andersson, F., T.S. Annika, A. Karlsson, B.H. Svensson, and J.R.**  
160 **Ejlertsson.** 2004. Occurrence and abatement of volatile sulfur compounds  
161 during biogas production. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* **54**:855-861.
- 162 3. **Ayala, M., N.R. Robledo, A. Lopez-Munguia, and R. Vazquez-Duhalt.**  
163 2000. Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase-  
164 catalyzed oxidation of diesel fuel. *Environ. Sci. Technol.* **34**:2804-2809.

- 165 4. **Ayala, M., R. Tinoco, V. Hernandez, P. Bremauntz, and R. Vazquez-**  
166 **Duhalt.** 1998. Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to  
167 biodesulfurization. *Fuel Process. Technol.* **57**:101-111.
- 168 5. **Ayala, M., and R. Vazquez-Duhalt.** 2004. Enzymatic catalysis on petroleum  
169 products. In: **Petroleum biotechnology (Vazquez-duhalt R. and Q.R. r.**  
170 **quintero-ramirez).** Elsevier. 67-111 pp.
- 171 6. **Casella, L., M. Gullotti, R. Ghezzi, S. Poli, T. Beringhelli, S. Colonna,**  
172 **and G. Carrea.** 1992. Mechanism of enantioselective oxygenation of  
173 sulfides catalyzed by chloroperoxidase and horseradish peroxidase.  
174 Spectral studies and characterization of enzyme-substrate complexes.  
175 *Biochemistry.* **31**:9451-9459.7.
- 176 7. **Chemspider, building community for chemist.** (2009). Ethyl sulfóxido.  
177 [http://www.chemspider.com/RecordView.aspx?rid=30fe361e-5f5f-4946-9c3f-](http://www.chemspider.com/RecordView.aspx?rid=30fe361e-5f5f-4946-9c3f-1e54988d15fc)  
178 [1e54988d15fc](http://www.chemspider.com/RecordView.aspx?rid=30fe361e-5f5f-4946-9c3f-1e54988d15fc) (last accessed, 01/08/2010).
- 179 8. **Colonna, S., N. Gaggero, G. Carrea, and P. Pasta.** 1997. A new  
180 enzymatic enantioselective synthesis of dialkyl sulfoxides catalysed by  
181 monooxygenases. *Chem. Commun.* 439 - 440.
- 182 9. **Good Scents Company.** (2010). Propyl disulfide.  
183 <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1035611.html> (last  
184 accessed, 01/08/2010).
- 185 10. **Goto, Y., T. Matsui, S.I. Ozaki, Y. Watanabe and S. Fukuzumi.** 1999.  
186 Mechanisms of sulfoxidation catalyzed by high-valent intermediates of heme  
187 enzymes: electron-transfer vs oxygen-transfer mechanism. *J. Am. Chem.*  
188 *Soc.* **121**:9497-9502.

189

- 190 11. **Hernandez, J., N.R. Robledo, L. Velasco, R. Quintero, M.A. Pickard, and**  
191 **R. Vazquez-Duhalt.** 1998. Chloroperoxidase-mediated oxidation of  
192 organophosphorus pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **61**:87-94.
- 193 12. **Hofrichter, M., and R. Ullrich.** 2006. Heme-thiolate haloperoxidases:  
194 versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance.  
195 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**:276-288.
- 196 13. **Holland, H.L., F.M. Brown, D. Lozada, B. Mayne, W.R. Szerminski, and**  
197 **A.J. Van Vliet.** 2002. Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of methionine  
198 derivatives. *Can. J. Chem.* **80**:633-639.
- 199 14. **Kobayashi, S., M. Nakano, T. Kimura, and A.P. Schaap.** 1987. On the  
200 mechanism of the peroxidase-catalyzed oxygen-transfer reaction.  
201 *Biochemistry.* **26**:5019-5022.
- 202 15. **Longoria, A., R. Tinoco, and R. Vázquez-Duhalt.** 2008. Chloroperoxidase-  
203 mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds.  
204 *Chemosphere.* **72**:485-490.
- 205 16. **Lookchem, look for chemicals.** (2008). Diethyl sulfoxide.  
206 <http://www.lookchem.com/Diethyl-sulfoxide/> (last accessed, 01/08/2010).
- 207 17. **Manoj, K.M., and L.P. Hager.** 2008. Chloroperoxidase, a Janus enzyme.  
208 *Biochemistry.* **47**:2997-3003.
- 209 18. **Marquez-Rocha, F.J., Y. Pica-Granados, A.M. Sandoval-Villasana, and**  
210 **R. Vazquez-Duhalt.** 1997. Determination of genotoxicity using a  
211 chloroperoxidase-mediated model of PAH-DNA adduct formation. *Bull.*  
212 *Environ. Contam. Toxicol.* **59**:788-795.

- 213 19. **Matheson tri-gas.** (2010). Material safety data sheet substance: methyl  
214 disulfide. <https://www.mathesongas.com/pdfs/msds/MAT14450.pdf> (last  
215 accessed, 01/08/2010).
- 216 20. **NIST chemistry webBook.** (2008). Libro del web de química del NIST  
217 <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (last accessed, 01/08/2010).
- 218 21. **Pickard, M.A., T.A. Kadima, and R.D. Carmichael.** 1991.  
219 Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.  
220 **7:235-241.**
- 221 22. **Radzicka, A., and R. Wolfenden.** 1995. A proficient enzyme. Science.  
222 **267:90-93.**
- 223 23. **Rantwijk, F.V., and R.A. Sheldon.** 2000. Selective oxygen transfer  
224 catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects. Curr.  
225 Opin. Biotechnol.**11:554-564**
- 226 24. **Science lab, chemicals and laboratory equipment.** (2008). Material  
227 safety data sheet 1-butanethiol MSDS. [http://www.sciencelab.com/xMSDS-](http://www.sciencelab.com/xMSDS-1_Butanethiol-9927113)  
228 [1\\_Butanethiol-9927113](http://www.sciencelab.com/xMSDS-1_Butanethiol-9927113) (last accessed, 01/08/2010).
- 229 25. **Science lab, chemicals and laboratory equipment.** (1997). Material  
230 safety data Sheet 1-Propanethiol MSDS.  
231 [http://www.sciencelab.com/xMSDS-1\\_Propanethiol-9924725](http://www.sciencelab.com/xMSDS-1_Propanethiol-9924725) (last accessed,  
232 01/08/2010).
- 233 26. **Schiffman, S.S., and C.M. Williams.** 2005. Science of odor as a potential  
234 health issue. J. Environ. Qual. **34:129-138.**
- 235 27. **Scribd.** (2007). Antoine coefficient table.  
236 [http://www.scribd.com/doc/22857803/Antoine-Coefficient-Table-Scribd-](http://www.scribd.com/doc/22857803/Antoine-Coefficient-Table-Scribd-4787907-MT03)  
237 [4787907-MT03](http://www.scribd.com/doc/22857803/Antoine-Coefficient-Table-Scribd-4787907-MT03) (last accessed, 01/08/2010).

- 238 28. **Silverstein, R.M., and L.P. Hager.** 1974. Chloroperoxidase-catalyzed  
239 oxidation of thiols and disulfides to sulfenyl chlorides. *Biochemistry.*  
240 **13:5069-5073.**
- 241 29. **Smet, E., P. Lens, and H. Van Langenhove.** 1998. Treatment of waste  
242 gases contaminated with odorous sulfur compounds. *Crit. Rev. Environ. Sci.*  
243 *Technol.* **28:89 - 117.**
- 244 30. **Torres, E., I. Bustos-Jaimes, and S. Le Borgne.** 2003. Potential use of  
245 oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal.*  
246 *Environ.* **46:1-15.**
- 247 31. **Tuynman, A., K.S.V. Mandy, L.D. Henk, E.S. Hans, and W. Ron.** 1998.  
248 The sulfoxidation of thioanisole catalysed by lactoperoxidase and *Coprinus*  
249 *cinereus* peroxidase: Evidence for an oxygen-rebound mechanism. *Eur. J.*  
250 *Biochem.* **258:906-913.**
- 251 32. **Van Deurzen, M.P.J., I.J. Remkes, F. Van Rantwijk, and R.A. Sheldon.**  
252 1997. Chloroperoxidase catalyzed oxidations in t-butyl alcohol/water  
253 mixtures. *J. Mol. Catal. Chem.* **117:329-337.**
- 254 33. **Vargas, R.R., E.J.H. Bechara, L. Marzorati, and B. Wladislaw.** 1999.  
255 Asymmetric sulfoxidation of a [beta]-carbonyl sulfide series by  
256 chloroperoxidase. *Tetrahedron: Asymmetry.* **10:3219-3227.**
- 257 34. **WKU, Western Kentucky University.** (2010). Safety datas sheet hexyl  
258 mercaptan. <http://www.wku.edu/msds/docs/3345.pdf> (last accessed  
259 01/08/2010).
- 260
- 261 Submitted to applied and environmental microbiology (AEM). August 2010.