



## Estabilidad y propiedades catalíticas de la cloroperoxidasa inmovilizada en materiales mesoporosos

Eduardo Torres, Marcela Ayala, Eduardo Terres, Jorge Aburto. Instituto Mexicano del Petróleo, fax 9175 8429, etorres@imp.mx

*Palabras clave: inmovilización, estabilidad, SBA-15.*

**Introducción.** El potencial de aplicación de la cloroperoxidasa (CPO) en la desulfurización oxidativa del diesel y la desmetalización de porfirinas las muestra como una enzima interesante para la industria petrolera (1). Con el propósito de mejorar la funcionalidad de la CPO, se procedió a inmovilizarla en materiales inorgánicos normalmente utilizados en la industria del petróleo como soportes de catalizadores.

**Metodología.** Con base en el tamaño molecular de la CPO ( $53 \times 46 \times 60 \text{ \AA}$ ) se produjeron materiales tipo SBA16 con tamaño de poro de 40 y 90  $\text{\AA}$ , para adsorberla en la superficie y en el interior del poro, respectivamente. Adicionalmente se inmovilizó covalentemente y de manera dirigida a las lisinas 112, 145 y 211, para evitar bloquear el sitio activo, utilizando el soporte de 90  $\text{\AA}$ .

### Resultados y discusión.

La CPO es retenida en el interior del poro del material tipo SBA16 de 90  $\text{\AA}$ , mientras que en la superficie no es retenido (material de 40  $\text{\AA}$ ), mostrando actividad catalítica contra monoclorodimedona. La adición de cesio, que provee interacciones electrostáticas adicionales a las del material, mejora la carga de enzima inmovilizada (aun a pesar de reducir el tamaño de poro y el área superficial). Adicionalmente, el cesio mejora la actividad específica de las preparaciones por dos razones: una, el aumento en la carga de la enzima, y dos, probablemente debido a una mejor orientación del sitio activo hacia el sustrato (tabla 1).

Tabla 1. Propiedades catalíticas de la CPO inmovilizada y de los materiales sintetizados

Enzima	Poro ( $\text{\AA}$ )	Area ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Carga (nmol/g)	$K_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Actividad sp. ( $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )
SBA 40 $\text{\AA}$	41.2	926.9	0	0	0
SBA 90 $\text{\AA}$	91.0	545.2	23	1 195	27.5
SBA 40 Cs	30.1	412	59	5 300	312.7
SBA 90 Cs	65.8	369	50	2 500	125
SBA 90 covalente	32.3	604	147	1 522	223.7

Con este resultado se procedió a preparar un material que mejorará tanto la carga como la orientación del sitio activo. Para esto, se derivatizó el SBA 16 90  $\text{\AA}$  con un espaciador terminado en carboxilo para unirlo a la proteína con carbodiimida. Como se muestra en la tabla, la actividad específica se incrementó 8 veces como resultado del incremento en la carga (6.4 veces) y por una probable mejor

orientación (aproximadamente 1.3 veces, reflejada por la  $k_{\text{cat}}$ ).

Finalmente se determinó la estabilidad de las diferentes preparaciones a la urea. En la figura se muestra las actividades residuales después de una hora de incubación en urea. Como puede apreciarse, la inmovilización covalente muestra la mejor estabilidad a concentraciones de hasta 5 M de urea, donde la CPO nativa se desnaturaliza.

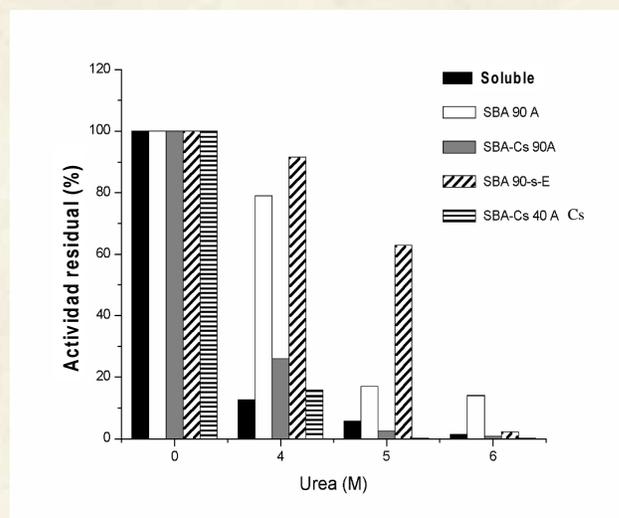


Fig. 1. Estabilidad de las diferentes preparaciones de CPO a la urea

**Conclusiones.** Las preparaciones de CPO en materiales mesoporosos propiedades catalíticas que pueden ser manipuladas con el tamaño de poro y la orientación de la enzima en el soporte.

### Agradecimientos

IMP D.00293

### Bibliografía.

- Vazquez-Duhalt, R.; Torres, E.; Valderrama, B.; Le Borgne, S. (2002). Will biochemical catalysis impact the petroleum refining industry? *Energy and Fuels* 16:1239-1250
- Aburto, J.; Ayala, m.; Bustos, I.; Terres, E.; Domínguez, J.M.; Torres, E. (2005). Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on mesoporous materials. *Micropor. Mesopor. Mat.* En prensa.