



MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA PEROXIDASA DE NABO PARA SU EMPLEO EN EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES CONTENIENDO COMPUESTOS FENÓLICOS

J. Francisco Quintanilla Guerrero y Carlos Regalado González. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U. Cerro de las Campanas S/N, Santiago de Querétaro, Qro. 76010, México, fax: 1921304 y 1921307, franciscoqg_7@hotmail.com.

Palabras clave: modificación química, peroxidasa, remoción de fenoles

Introducción. El agua es probablemente el componente más importante para la industria alimentaria, sin embargo se puede encontrar contaminada. La mayoría de los compuestos fenólicos son contaminantes persistentes en los efluentes de muy diversas industrias, causando un grave daño a la ecología y pueden generar un problema de salud pública (1); en particular los clorofenoles se han clasificado como altamente tóxicos. La peroxidasa de distintas fuentes ha sido empleada con éxito en tratamientos de sistemas acuosos modelo con baja concentración de fenoles y su eficiencia disminuye o es nula en medios con alto contenido de éstos y de otros solventes orgánicos (2). La modificación química de las cadenas laterales de los aminoácidos polares puede incrementar la hidrofobicidad superficial de la enzima peroxidasa, y otras hemoproteínas (3), permitiendo emplearla en las condiciones en que se presentan la mayoría de los efluentes agrícolas e industriales.

El objetivo del trabajo fue realizar la modificación química de la peroxidasa de nabo, para emplearla, en el tratamiento de efluentes con alto contenido de fenoles y de otros solventes orgánicos.

Metodología. La enzima peroxidasa se extrajo del nabo (*Brassica napus* L. var *esculenta*), con amortiguador de fosfatos a pH=6. Se midió la actividad por oxidación del ABTS (4). En la purificación parcial se separaron las fracciones con un valor $R_z \geq 2$ ($R_z = A_{403}/A_{280}$), obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-celulosa), que luego se pasaron por cromatografía de exclusión por tamaño (Sephacryl S-100) y se seleccionó la fracción con mayor pureza y actividad. Una primera modificación química se realizó por el método de modificación con polímeros (3), empleando el metoxipoliétilenglicol 5000, así como una segunda con dimetil formamida. Se determinó la hidrofobicidad superficial de la enzima antes y después de cada una de las modificaciones, su actividad específica, y su efectividad en el tratamiento de soluciones fenólicas sintéticas, en las que se usaron concentraciones crecientes de fenoles y hasta el 20% en peso de otros solventes orgánicos. El procedimiento más eficiente, así seleccionado, se aplica también a muestras de efluentes reales de diferentes industrias.

Resultados y Discusión. Se obtuvo un extracto semi purificado. La fracción de peroxidasa no retenida en la cromatografía de intercambio aniónico mostró un valor $R_z = 2.36$, con un 62% de proteína y una actividad enzimática específica = 329.53 U/mg de proteína, después de la filtración en gel la $R_z = 3.01$. La primera modificación incrementó la actividad específica en 12% con respecto a la nativa, mientras que la segunda modificación provocó una pérdida completa de la actividad, lo cual correspondió con la pérdida de la banda Soret de absorción característica del grupo hemo (A_{403}), al hacer un barrido con las distintas muestras de la enzima así modificada. Esto indica que hubo una pérdida del grupo hemo debido a que los propionatos que forman parte de su estructura

fueron modificados de la misma manera que los grupos carboxilo de los residuos de ácido aspártico y glutámico. Esto aumentó su hidrofobicidad, lo que le permitió solubilizarse en la dimetil formamida, separándose de la proteína también modificada.

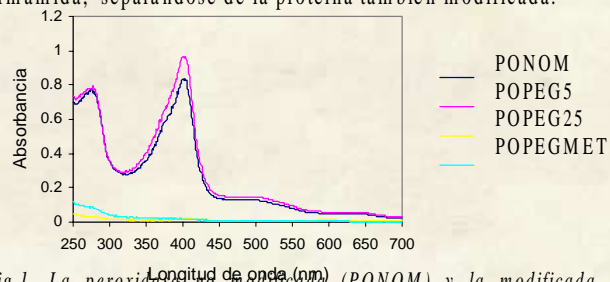


Fig.1. La peroxidasa no modificada (PONOM) y la modificada con polietilén glicol 5:1(POPEG5) muestran la banda Soret característica, mientras que la de 25:1(POPEG25) y la doblemente modificada (POPEGMET) prácticamente no muestran absorbencia a 403 nm.

Conclusiones. El aumento en la hidrofobicidad superficial debida a la primera modificación, no afectó la conformación enzimática ni los aminoácidos vitales del sitio activo, con lo que permitió la solubilización de la enzima y el incremento en la actividad. La segunda modificación no mostró los resultados prometedores que se observan en otras hemoproteínas, debido a que en este caso, el grupo hemo no se encuentra covalentemente unido, por lo que al aumentar su hidrofobicidad aumentó su coeficiente de partición con el solvente y resultó en su separación de la proteína, aún cuando el medio tenía un pH= 9, perdiéndose la actividad de peroxidasa.

Agradecimiento. Agradecemos el financiamiento otorgado por CONACYT con clave: 31696-B.

Bibliografía.

1. Tomasini-Campocósio A. 1999. Enzimas fúngicas involucradas en procesos de biodegradación y biorremediación. En: *Avances en purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología*. UAM-Iztapalapa. México 5: 315-329.
2. Quintanilla, J.F. García-Almendárez, B. Regalado, C. 2004. Immobilization of turnip peroxidase for phenolic compounds removal from a model aqueous system by oxidative polymerization. *2004 IFT annual Meeting*. IFT Biotechnology Division. Las Vegas USA. 12-17 Julio. 99A-8: 250.
3. Vázquez-Duhalt, R. Fedorak, P.M. Westlake, D.W.S. 1992. Role of the enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 837- 841.
4. Childs, R.E., Bardsley, W.J. 1975. The steady state kinetics of peroxidase with ABTS as chromogen. *Biochem J.* 145:93-103.