



## MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA PEROXIDASA DE NABO Y SU EMPLEO EN EFLUENTES CONTENIENDO COMPUESTOS FENÓLICOS

J. Francisco Quintanilla Guerrero y Carlos Regalado González. DIPA, PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, CU, Cerro de las Campanas S/N, Querétaro, 76010 Qro. México, Fax: (442)1921304, [franciscoqg\\_7@hotmail.com](mailto:franciscoqg_7@hotmail.com); carlosr@uaq.mx

*Palabras clave: peroxidasa, modificación química, remoción de fenoles*

**Introducción.** El agua es probablemente el componente más importante para la industria alimentaria. La mayoría de los compuestos fenólicos son contaminantes persistentes en los efluentes de diversas industrias, pudiendo causar un grave daño ecológico y problemas de salud pública (1); en particular los clorofenoles se han clasificado como altamente tóxicos. La peroxidasa se ha empleado con éxito en sistemas acuosos modelo con baja concentración de compuestos fenólicos (CF) y su eficiencia disminuye o es nula en medios con alto contenido de éstos y de otros solventes orgánicos (2). La modificación química puede incrementar la hidrofobicidad superficial de la peroxidasa (3), permitiendo emplearla en las condiciones en que se presentan la mayoría de los efluentes 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.

**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 Rz 2.56 ( $Rz=A_{403}/A_{280}$ ), 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. Con la intención de emplearla en las condiciones de un efluente de la industria petrolera, la enzima purificada se sometió a modificación química en el grupo carboxilo con dimetil formamida, así como empleando metoxipolietilén glicol (mPEG) como agente modificador, en los grupos amino, el mPEG es un polímero hidrofóbico con un peso de 5000 daltons. La enzima modificada se inmoviliza covalentemente y por atrapamiento.

**Resultados y discusión.** La modificación del grupo carboxílico provocó una pérdida total de la actividad, por lo que el procedimiento fue desechado. Se determinaron las condiciones de modificación y se encontró que a 25° C por un tiempo de 70 min se modificó el 75% de los grupos amino susceptibles, con un incremento en actividad del 53%. La modificación no cambió la conformación activa de la enzima aunque si la hizo soluble en un medio con alto contenido de CF. La enzima modificada (EM) inmovilizada en alginato, conservó 70 % de actividad, y produjo una remoción efectiva (RE) de los CF>65% en cinco ciclos sucesivos en muestras de agua residual de una refinera. La EM inmovilizada en Affi-Gel conservó toda su actividad,

logrando una RE en tres ciclos. Al reducir el tiempo de tratamiento a 10 min se alcanzaron 15 ciclos de RE, mostrando los 10 primeros remociones de CF>90 %. En estas condiciones la enzima nativa libre no mostró actividad.

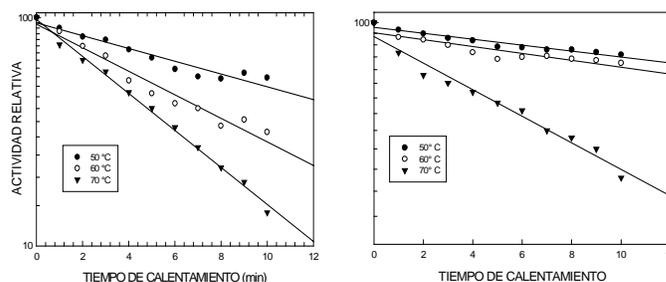


Fig. 1. Las figuras muestran las diferencias en la actividad remanente al tratamiento térmico entre la enzima nativa y la modificada, respectivamente.

**Conclusiones.** El aumento en la hidrofobicidad superficial debida a la modificación con PEG, no afectó la conformación activa de la peroxidasa ni los aminoácidos vitales del sitio activo, con lo que permitió su solubilización y el incremento en la actividad. La modificación del grupo carboxílico no mostró los resultados tan alentadores 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 CONACY T con clave: 31696-B.

### Bibliografía.

1. Tomasini-Campocoso 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. 1 2 -1 7 Julio. 99A-8 : 2 50 .
3. Vázquez-Duhalt, R. Fedorak , P .M. Westlake, D.W.S . 1992 . Role of the enzyme hydrophobicity in biocatalysis inorganic solvents. *Enzyme Microb . Technol.* 1 4 : 8 3 7 - 841 .
- 4 . Childs, R.E., Bardsley, W.J. 1975. The steady state kinetics of peroxidase with ABTS as chromogen . *Biochem J.* 1 4 5:93-103 .