

# MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA CLOROPEROXIDASA Y BIOCATALISIS EN SOLVENTES ORGÁNICOS

Adriana Longoria\*, Raunel Tinoco y Rafael Vazquez-Duhalt  
Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa C. P. 62210.  
Cuernavaca, Morelos. México. Fax: 01-(777)-317-23-88. \*e-mail: yanni@ibt.unam.mx

*Palabras clave: Cloroperoxidasa, modificación química, solventes orgánicos*

**Introducción.** El uso de combustibles fósiles crea muchos problemas de contaminación, entre ellos, la emisión de óxidos de azufre, que provocan las lluvias ácidas. En nuestro grupo de investigación se ha trabajado con diferentes hemoenzimas y hemoproteínas que oxidan compuestos azufrados en mezclas de combustibles derivados del petróleo. Esta oxidación enzimática, seguida de la destilación remueve gran cantidad del azufre presente en el diesel (1, 2). En este proceso de "Biodesulfuración", la cloroperoxidasa (CPO) del hongo *Caldariomyces fumago* ha mostrado ser la más activa. En el laboratorio se ha trabajado con la modificación química de hemoenzimas y hemoproteínas con moléculas anfifílicas como el PEG para aumentar la solubilidad en solventes orgánicos así como modificar sus propiedades catalíticas y aumentar el rango de sustratos (3). Por otro lado, se ha reportado el desarrollo de un copolímero CPO-poliuretano (4) que presenta actividad catalítica en solventes orgánicos. En el presente trabajo, la CPO se modificó químicamente con PEG-NH<sub>2</sub> y poliuretano con el fin de obtener biocatálisis en solventes orgánicos. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la modificación química de la cloroperoxidasa sobre su actividad en solventes orgánicos.

**Metodología.** La modificación química se hizo sobre los grupos carboxilo de la cloroperoxidasa empleando carbodiimida (ECD) en excesos molares de 100, 500 y 1000 sobre la CPO como mediador de la reacción y PEG-NH<sub>2</sub> en exceso molar de 100. El grado de modificación se determinó pasando las diferentes modificaciones a través de una columna de intercambio aniónico. La modificación de la CPO obtenida con ECD en exceso molar de 1000, se eligió para ser caracterizada y se nombró CPO-PEGNH<sub>2</sub>. El copolímero cloroperoxidasa-poliuretano (CPO-PU) se obtuvo como se describe por Bakker et. al. (4). Las preparaciones de la CPO se caracterizaron por medio de ensayos de termoestabilidad, actividad en solvente orgánico y perfiles de pH.

**Resultados y discusión.** El grado de modificación de la CPO con PEG-NH<sub>2</sub> aumenta con el exceso de carbodiimida en la reacción pero a su vez, disminuye la actividad específica (Cuadro 1). Esto se debe a que la modificación química es inespecífica y muy probablemente se modifican también los grupos carboxilo en el sitio activo de la CPO. Con respecto a los ensayos de actividad en solvente orgánico, termoestabilidad y perfil de pH de las diferentes preparaciones, los resultados muestran que tienen

propiedades muy similares a la enzima nativa, sólo el copolímero CPO-PU es ligeramente más termoestable a 50°C.

*Cuadro 1. Resultados de la modificación química sobre los grupos carboxilo de la CPO.*

Exceso molar sobre CPO	Actividad específica (s <sup>-1</sup> )	% Actividad específica	Modificación
CPO (sin modificar)	1089.43	100	No modificada
PEGNH <sub>2</sub> 100	944.33	90.9	Baja
PEGNH <sub>2</sub> 500	823.50	79.2	Media
PEGNH <sub>2</sub> 1000	658.57	63.4	Notable

**Conclusiones.** Con la modificación química sobre los grupos carboxilo de la CPO (con PEGNH<sub>2</sub>), no se lograron resultados comparables a los que se han obtenido con otras hemoproteínas y hemoenzimas modificadas anteriormente en el laboratorio. Esto puede atribuirse a las características propias de la enzima, tal como su estabilidad a diferentes condiciones de pH. Aunque no se ensayaron las preparaciones CPO-PU y CPO-PEGNH<sub>2</sub> contra sustratos hidrofóbicos y solventes orgánicos distintos al tiantreno y tert-butanol, los resultados permiten concluir que ninguna de estas preparaciones tiene mejores propiedades catalíticas que la CPO sin modificación. Un resultado interesante es el caso del copolímero CPO-PU, que es ligeramente más termoestable que la CPO a 50°C y después de 11 meses de almacenamiento a 4°C sigue conservando el 100 % de su actividad, con lo que se puede decir que se obtuvo un catalizador estable al almacenamiento y fácil de recuperar del medio de reacción.

## Bibliografía.

1. Ayala, M. Robledo, N. López-Munguía, A. y Vazquez-Duhalt, R. (2000). Substrate Specificity and Ionization Potential in Chloroperoxidase-Catalyzed Oxidation of Diesel Fuel. *Environ Sci Technol.* 34:2804-2809.
2. Ayala, M. Tinoco, R. Hernandez, V. Bermauntz, P. y Vazquez-Duhalt, R. (1998). Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel Processing Tech.* 57:101-111.
3. Tinoco, R. y Vazquez-Duhalt, R. (1998). Chemical modification of cytochrome c improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme Microb Technol.* 22:8-12.
4. Bakker, M. van de Velde, F. van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A. (2000). Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams. *Biotech Bioeng.* 70(3):342-348.