

## CRISTALES CATALITICOS DE CLOROPEROXIDASA

Marcela Ayala Aceves, Eduardo Horjales Rebolledo y Rafael Vázquez Duhalt.  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.  
Ave. Universidad No. 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos C.P. 62271, México.  
FAX (7) 317 23 88 e-mail: maa@ibt.unam.mx

Palabras clave: *cloroperoxidasa, cristales, estabilización*

**Introducción.** Una de las principales razones que impide que las enzimas compitan industrialmente con un catalizador químico es su inestabilidad. El entrecruzamiento de cristales de proteínas es una estrategia novedosa para la estabilización e inmovilización de enzimas (1). Con este procedimiento se obtienen biocatalizadores reciclables que son estables a altas temperaturas, solventes orgánicos y agitación mecánica.

El objetivo de este trabajo es obtener y caracterizar cristales catalíticos de cloroperoxidasa (CPO), una enzima fungal con aplicación potencial en procesos tan variados como la biodesulfurización de combustibles fósiles (2) y la síntesis de compuestos ópticamente activos (3).

**Metodología.** La reacción de entrecruzamiento se ensayó a diferentes condiciones de pH, temperatura, tiempo de reacción, relación enzima/glutaraldehído. La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente con pinacianol en dimetilformamida (DMF), buffer pH 5.5 e hidropéroxido de tert-butilo.

**Resultados y Discusión.** El entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído involucra principalmente a los grupos aminos primarios de las lisinas por ser los nucleófilos más potentes a pH 7-9 (4). Inicialmente se observó que los cristales de CPO se entrecruzan sólo al reaccionar con altas concentraciones de glutaraldehído; bajo estas condiciones se pierde la actividad en los cristales. Probablemente esto se debe a que la CPO cuenta con sólo 3 lisinas expuestas en la superficie. Además, la reacción con glutaraldehído es inespecífica y podrían modificarse residuos importantes para la actividad. Para solucionar este

Fig. 1. Cinética de inactivación a 60 °C de CPO soluble (\*) y de cristales entrecruzados de CPO (■).

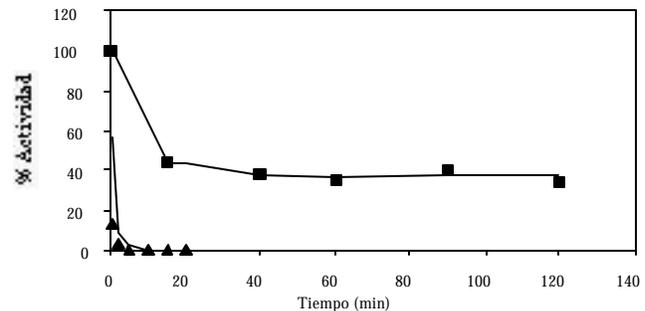
problema, se modificó químicamente a la proteína con el fin de aumentar el número de grupos aminos primarios. Esta estrategia permitió obtener cristales entrecruzados usando concentraciones menores de glutaraldehído. Los cristales entrecruzados son activos, termoestables (Fig. 1) e insolubles en buffer, además de ser activos a bajas concentraciones de agua (Cuadro 1).

Cuadro 1. Actividad específica ( $\text{min}^{-1}$ ) en DMF

% Buffer	CPO soluble	CPO cristal
1	11	0.18
2	96	1.16
5	123	13
10	157	26

**Conclusiones.** El entrecruzamiento con glutaraldehído estabiliza a los cristales de CPO, haciéndolos insolubles en solventes acuosos u orgánicos y aumentando su termoestabilidad (Fig.1). Los cristales deben ser previamente modificados para aumentar los grupos aminos primarios superficiales y favorecer el entrecruzamiento. A pesar de que el entrecruzamiento estabiliza la matriz tridimensional cristalina, también disminuye la actividad enzimática. Como consecuencia, los cristales entrecruzados tienen una menor actividad específica que la enzima en solución (Cuadro 1). Estos cristales también fueron usados en la reacción de oxidación de compuestos azufrados presentes en diesel primario. Es posible que una optimización de las condiciones para la reacción de entrecruzamiento permita aumentar la actividad específica de estos biocatalizadores. Esto permitirá su aplicación en reacciones que requieran un medio orgánico y/o altas temperaturas.

**Agradecimientos.** Este proyecto es financiado por el Instituto Mexicano del Petróleo (FIES 98-110-VI).



### Bibliografía.

- Govardhan, C. (1999). Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:331-335.
- Ayala, M., Tinoco, R., Hernández, V., Bremauntz, P., Vazquez-Duhalt, R. Biocatalytic oxidation of diesel fuel as an alternative to biodesulfurization. (1998). *Fuel Process. Technol.* 57:101-111.
- Colonna, S., Gaggero, N., Richelmi, C., Pasta, P. (1999). Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *Trends Biotechnol.* 17:163-168.
- Walt, D.R., Agayn, V.I. (1994). The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends Anal. Chem.* 13:425-430.