

Evaluación del potencial de dos peróxidas para su aplicación en biorremediación de compuestos orgánicos recalcitrantes

Assessing two different peroxidases' potential for application in recalcitrant organic compound bioremediation

Nelson Caicedo, Edgar Gutiérrez, Rodrigo Torres*.

RESUMEN

El presente trabajo demuestra el promisorio futuro que presentan las enzimas cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* (CPO) y la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*, PPR), dos peroxidases de diferente fuente (microbiana y vegetal), usadas como biocatalizadores para aplicación en biorremediación de compuestos orgánicos recalcitrantes. Para este estudio, se evaluó la actividad catalítica tipo peroxidasa, en sistemas de fase orgánica, de cada una de las enzimas empleando diferentes compuestos modelos tales como: PAH's (pireno y antraceno), órgano nitrogenados (difenilamina), moléculas monoaromáticas tipo fenólicas (guayacol), y colorantes [(naranja de metilo y ABTS (2,2'-Azinabis (6- ácido surfonic-3- etilbenzotinzolina))]. Los sistemas de reacción estuvieron compuestos por mezclas monofásicas de agua: solvente orgánico miscible (metanol, etanol, isopropanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dimetil sulfóxido, etc.), sobre los cuales se evaluó la actividad catalítica de ambas peroxidases.

En la mayoría de los ensayos se observó actividad catalítica de las dos enzimas sobre los sustratos evaluados. Sin embargo, para el caso del naranja de metilo y algunos PAH's, la PPR no mostró capacidad de oxidación biocatalítica. A su vez, fue la enzima que mostró mayor tolerancia a los solventes evaluados, bajo los cuales vio mejorada apreciablemente su actividad cuando se emplearon sustratos de baja hidrofobicidad. Con los datos experimentales se calculó el *k_{cat}*, como parámetro cinético, el cual sirvió para comparar el desempeño biocatalítico de cada enzima sobre los sustratos.

Palabras clave: biocatálisis en fase orgánica, biorremediación, peroxidases.

ABSTRACT

This work shows the promising future presented by the following enzymes: Chloroperoxidase (CPO) from *Caldariomyces fumago* and royal palm peroxidase (*Roystonea regia*, PPR). These peroxidases were obtained from different sources (microbial and vegetable) and used as biocatalysts for applying them in bioremediation of recalcitrant organic compounds. Each one of the enzymes' peroxidase catalytic activity was evaluated in organic phase systems, using different model compounds such as: PAHs (pyrene and anthracene), organic-nitrogenated compounds (diphenylamine), monoaromatic phenolic molecules (guayacol) and dyes (methyl orange and ABTS). The reaction systems were composed of mono-phase water mixtures and organic miscible solvent (methanol, ethanol, isopropanol, acetonitrile, tetrahydrofuran, dimethyl sulfoxide and dimethyl formamide), on which both peroxidases' catalytic activity was evaluated.

The two enzymes' catalytic activity was observed on the evaluated substrates in most of these assays. However, PPR did not show biocatalytic oxidation for methyl orange dye and some PAHs. This enzyme did show the best tolerance to the evaluated solvents. Its catalytic activity was appreciably enhanced when low hydrophobic solvents were used. The *k_{cat}* was calculated from this experimental data (as kinetic parameter) leading to each enzyme's biocatalytic performance on substrates being compared.

Key words: organic phase biocatalysis, bioremediation, peroxidase.

* Laboratorio de Bioquímica, Grupo de Biocatálisis y Biotecnología Ambiental. Universidad Industrial de Santander. E-mail: rtorres@uis.edu.co, rtorres@icp.csic.es

INTRODUCCIÓN

El uso de combustibles fósiles para la generación de energía y como materia prima para la industria química ha producido, durante el último siglo, un amplio espectro de compuestos orgánicos naturales y sintéticos (xenobióticos), muchos de los cuales han generado diversas formas de contaminación ambiental (Aitken, 1993). Durante los últimos años, y como forma de mitigar los efectos generados por estos compuestos, se ha investigado la capacidad que tienen algunas bacterias y ciertos tipos de hongos ligninolíticos de degradar algunos contaminantes orgánicos y compuestos xenobióticos, y su empleo en la biotransformación y biodegradación de compuestos mono y poliaromáticos (Guha *et al.*, 1999). Entre los compuestos estudiados se encuentran moléculas de tipo monoaromático como fenol (Buchanan *et al.*, 1999), hidrocarburos poliaromáticos como antraceno (Torres *et al.*, 1997), benzo(a)pireno, bifenilo (Vázquez *et al.*, 1994), metilantracenos, fenantreno (Field, 1996), pireno (Hammel *et al.*, 1986), compuestos azufrados como dibenzotiofeno (Vázquez *et al.*, 1994), colorantes (Shin, 1998), pesticidas y compuestos organoclorados (Pickard, 1991).

En los procesos de biotransformación, la lipofilia de los compuestos aromáticos es un factor crítico que impide su biodisponibilidad al ataque microbiano y, por ende, su asimilación y degradación. Es por ello que las investigaciones recientes se han enfocado al uso de surfactantes químicos y biológicos para mejorar las velocidades de remoción, que junto a la utilización de procesos de preoxidación faciliten una mejor remoción de estas moléculas orgánicas. En este sentido, el empleo de la catálisis enzimática se constituye en una alternativa como proceso de preoxidación.

El uso de enzimas en aplicaciones para tratamientos de residuos se propuso inicialmente a mediados de la década de 1930. Sin embargo, el concepto del uso de enzimas para el ataque individual de contaminantes en mezclas de desechos sólo fue presentado hasta la década de 1970, lo que indica un reciente incursionamiento de éstas en el campo ambiental (Karam *et al.*, 1997). Las enzimas son moléculas de origen biológico que catalizan ciertas reacciones químicas que de otra manera sucederían en forma muy lenta a temperatura ambiente; además, logran algunas transformaciones químicas, difíciles de

obtener mediante el empleo de procesos de tratamientos químicos convencionales. Pero tal vez la característica más importante de las enzimas es que son catalizadores altamente específicos, lo que les podría permitir remover en forma selectiva contaminantes de interés sobre una matriz dada (suelo o agua) y por tanto evitar reacciones innecesarias o indeseables que pudieran complicar o aumentar el costo del tratamiento.

Se destaca, en especial, el exitoso papel desempeñado -durante evaluaciones preliminares- por muchas enzimas en la remoción de contaminantes fenólicos y similares. Estos compuestos constituyen uno de los principales contaminantes regulados fuertemente por las entidades de control en muchos países. Se encuentran en las aguas residuales de muchas industrias tales como: conversión del carbón, refinerías, plásticos, resinas, preservación de la madera, recubrimientos metálicos, colorantes y textiles. Con base en lo anterior, algunos investigadores han propuesto la aplicación de la biorremediación enzimática como procedimiento alternativo y eficaz para el tratamiento de estos contaminantes (Aitken *et al.*, 1993).

Adicionalmente, se ha establecido y demostrado que uno de los principales problemas para la biotransformación lo constituye la solubilización de compuestos hidrofóbicos como mecanismo para aumentar la biodisponibilidad de las sustancias orgánicas. Sin embargo, las limitaciones hidrofóbicas o de transferencia de masa pueden reducirse, por ejemplo, si se usan solventes orgánicos solubles en agua (Dordick, 1989). En este ámbito, la oxidación catalítica vía enzimática de dichos compuestos recalcitrantes empleando solventes orgánicos podría constituirse en el pilar para el desarrollo de tecnologías alternativas que permitan facilitar la posterior transformación o degradación mediante tratamientos biológicos y químicos convencionales.

En este aspecto, el campo de aplicación de la biotecnología de proteínas ha sufrido una rápida expansión en los últimos años gracias a la introducción de solventes orgánicos en la biocatálisis. Hecho debido a que algunas enzimas han mostrado capacidad para catalizar en solventes orgánicos, reacciones que en sistemas acuosos serían termodinámicamente imposibles. La biocatálisis en solventes no acuosos ofrece nuevas posibilidades para la síntesis bio-

orgánica de muchos compuestos químicos útiles para el hombre, el procesamiento de combustibles fósiles y el tratamiento de aguas y suelos contaminados (Illanes, 1994; Brink *et al.*, 1985).

Las enzimas con actividad peroxidasa son clasificadas, de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica, como oxidorreductasas (Dawson, 1988). Estos tipos de enzimas catalizan reacciones redox en las cuales átomos de oxígeno o electrones se transfieren entre moléculas. Para las peroxidasas los electrones son transferidos a un peróxido, como por ejemplo el peróxido de hidrógeno. El esquema general de reacción es el siguiente:



Las peroxidasas son enzimas abundantes en la naturaleza que pueden ser aisladas de diferentes fuentes: microbiana y vegetal, y presentan diferentes características catalíticas y de estabilidad según sea su origen.

Las peroxidasas han mostrado buen potencial y desempeño como enzimas oxidativas en procesos de bioconversión de sustratos en fase orgánica. En investigación se ha trabajado ampliamente con peroxidasas tales como peroxidasa de rábano (HrP) (Ryu *et al.*, 1992) y cloroperoxidasa (CPO) (Pickard, 1991), debido principalmente a la naturaleza asimétrica de las reacciones catalizadas por estas enzimas, lo cual permite la formación de epóxidos enantioméricamente puros.

Entre las muchas aplicaciones que han demostrado tener las peroxidasas hay que resaltar su

buen desempeño para la biorremediación de corrientes acuosas industriales, así como su capacidad oxidativa sobre varios compuestos recalcitrantes. También se ha descrito la oxidación de fenoles por peroxidasas (Dunford *et al.*, 1987) y haloperoxidasas (Fransen, 1994) a dímeros y polímeros de fenol, con los cuales pueden obtenerse resinas fenólicas.

En el presente trabajo se quiso evaluar la oxidación biocatalítica de un grupo de compuestos aromáticos modelos solubilizados en medios no acuosos utilizando dos diferentes tipos de peroxidasas: peroxidasa de palma real y cloroperoxidasa. Ambas enzimas son consideradas hemoproteínas por presentar como grupo prostético un grupo hemo unido en forma no covalente a la estructura proteica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los biocatalizadores empleados en los ensayos fueron las enzimas Cloroperoxidasa (CPO), obtenida a partir del cultivo del hongo *Caldariomyces fumago*, y la Peroxidasa de palma real (PPR), obtenida de las hojas de la palma real (*Roystonea regia*) mediante un proceso de extracción.

Las sales de los bufferes y el peróxido de hidrógeno, todos reactivos de grado analítico, J. T Baker (Phillipsburg, NJ). Los solventes empleados, metanol, etanol, isopropanol, dimetil sulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMFA), acetonitrilo y tetrahidrofurano (THF) fueron todos de grado HPLC Merk (Darmstadt, Germany).

Tabla 1. Listado de sustratos evaluados. Sus valores de máxima absorbancia, concentración y coeficiente de extinción molar.

Sustrato	Máx. absorbancia (nm)	Concentración (µM)	Coefficiente de extinción molar (M ⁻¹ cm ⁻¹)
Guayacol	471	20000	5200
ABTS	416	500	36000
MCD	279	1000	12200
Naranja de metilo	504	40	16900
Pireno	334	20	32600
Difenilamina	279	20	13600

Los sustratos sobre los cuales se evaluó la capacidad oxidativa de las enzimas fueron: monocloro dimedona (MCD), ABTS, guayacol, pireno, antraceno, naranja de metilo, y difenilamina, todos de grado analítico. En la tabla 1 se muestran los valores de máxima absorbancia (nm), concentración (μM) y coeficientes de extinción molar para cada uno de los sustratos evaluados.

Determinación de proteínas

Las concentraciones de proteína fueron estimadas mediante el método calorimétrico de Bradford (Stoscheck, 1980).

Condiciones de reacción

Para las dos hemoproteínas se desarrollaron sistemas de reacción compuestos fundamentalmente por mezclas de agua: solvente orgánico miscible. Para la cuantificación de actividad biocatalítica se determinó la velocidad de reacción por espectrofotometría UV-visible utilizando diferentes concentraciones de los sustratos orgánicos (véase tabla 1) disueltos en los medios acuosos y no acuosos, y a condiciones óptimas de pH para cada hemoproteína. Todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22°C). Las reacciones se iniciaron por adición de una cantidad de peróxido de hidrógeno H_2O_2 previamente establecida (1 mM) en volúmenes totales de reacción de 2,5 mL, 20 mM de buffer fosfato y con diferentes concentraciones (%v/v) de solventes orgánicos miscibles en agua.

Se definieron unidades de actividad biocatalítica de acuerdo con parámetros estándar (1 U = 1 μmol de sustrato transformada por minuto en condiciones de ensayo). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los blancos constaron de las mismas mezclas agua-solvente-sustrato y agente oxidante, pero sin la presencia del catalizador biológico (enzima). Con los datos obtenidos se determinaron los respectivos valores de actividad enzimática y k_{cat} . Esta última es una constante cinética empleada comúnmente como parámetro de comparación en biocatálisis orgánica.

Técnicas analíticas

Con el objetivo de verificar analíticamente las diferencias en el grado de hidrofobicidad de los sustratos

empleados, se estimó dicha propiedad mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sobre un sistema acuoso con detector UV. La hidrofobicidad del sustrato fue determinada como el tiempo de elución sobre una columna de fase reversa Lichosorb RP C-18 (250x4 mm). El solvente de elución fue una mezcla acetonitrilo/agua (60:40 v/v) a un flujo de 1 ml/min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la tabla 2 se encuentran los tiempos de elución obtenidos de la evaluación analítica de la hidrofobicidad de los sustratos mediante uso de HPLC con detector UV empleando una columna de fase reversa. Cada compuesto fue separado en forma individual y no en una mezcla.

Tabla 2. Tiempo de elución de los diferentes sustratos sobre una columna de fase reversa.

Sustratos	Tiempo de elución (min)
Pireno	4,58
Antraceno	3,816
Difenilamina	3,516
ABTS	3,366
Guayacol	3,283
Naranja de Metilo	3,216
MCD	3,133

El intervalo de variación de los valores de tiempos de elución es bastante pequeño; sin embargo, permite establecer un orden en el grado de hidrofobicidad de los compuestos empleados como sustratos. Así, el mayor tiempo de elución corresponde a la sustancia de mayor hidrofobicidad (pireno), dado que es la molécula con mayor tiempo de retención en la columna cromatográfica. Entre los sustratos de completa solubilidad en agua, el que mayor hidrofobicidad tuvo fue el ABTS, mientras que el de menor valor correspondió a la MCD.

Evaluación biocatalítica de las dos enzimas

En todos los casos se estimó el valor de C_{50} , correspondiente a la concentración de solvente en la cual se produce el 50% de pérdida de la máxima

actividad enzimática. El valor de 100% de actividad fue tomado como aquel correspondiente al de máxima actividad, indistintamente de la concentración de solvente.

Actividad biocatalítica sobre guayacol

En la figura 1 (a) se muestran los resultados en forma de porcentaje de actividad obtenidos durante la evaluación de la peroxidasa de palma real sobre sistemas orgánicos que contienen guayacol como sustrato.

Para la mayoría de solventes, la adición de cantidades pequeñas de estos (10 - 30%) produjo un aumento en la actividad enzimática. La familia de alcoholes evaluada (metanol, isopropanol) mostró una tendencia similar entre todos ellos, presentándose un pico de máxima actividad a concentraciones cercanas al 30%. El aumento de actividad con respecto a la actividad en el sistema acuoso fue aproximadamente del 20%.

Las mezclas reactivas que contuvieron DMFA mostraron un pico de máxima actividad a una concentración de solvente cercana al 10%. Pero luego de este valor, el descenso en la actividad catalítica se da rápidamente comparado frente a los valores de las otras mezclas. Después del 20% de solvente los

porcentajes de actividad coinciden con los porcentajes obtenidos en las mezclas de DMSO.

El THF mostró (véase figura 1 (a)) afectar drásticamente la actividad catalítica de la PPR, ya que en todos los casos, a cualquier porcentaje de solvente, la actividad enzimática fue menor que la obtenida en el sistema acuoso. Esto podría deberse a la capacidad de denaturación de estos tipos de solventes que retiran el agua unida a la proteína (Ryu *et al.*, 1992). Algo similar sucedió con el DMSO y acetonitrilo, para los cuales el descenso en los valores de actividad se hizo más suavemente. Sin embargo, a un mismo valor de porcentaje de solvente las mezclas con acetonitrilo presentaron mayores valores de actividad. El comportamiento observado de la PPR es similar al comportamiento reportado por Batra *et al.* (1994) para la peroxidasa de rábano picante empleando mezclas orgánicas con solventes miscibles en agua.

Estos resultados estarían indicando una buena tolerancia de la PPR frente a los solventes orgánicos miscibles en agua. Por ello se podría esperar un buen desempeño de dicha hemoproteína en procesos de biorremediación de matrices acuosas contaminadas con compuestos fenólicos y que a su vez presenten residuos de solventes orgánicos (Aitken *et al.*, 1993; Karma *et al.*, 1997).

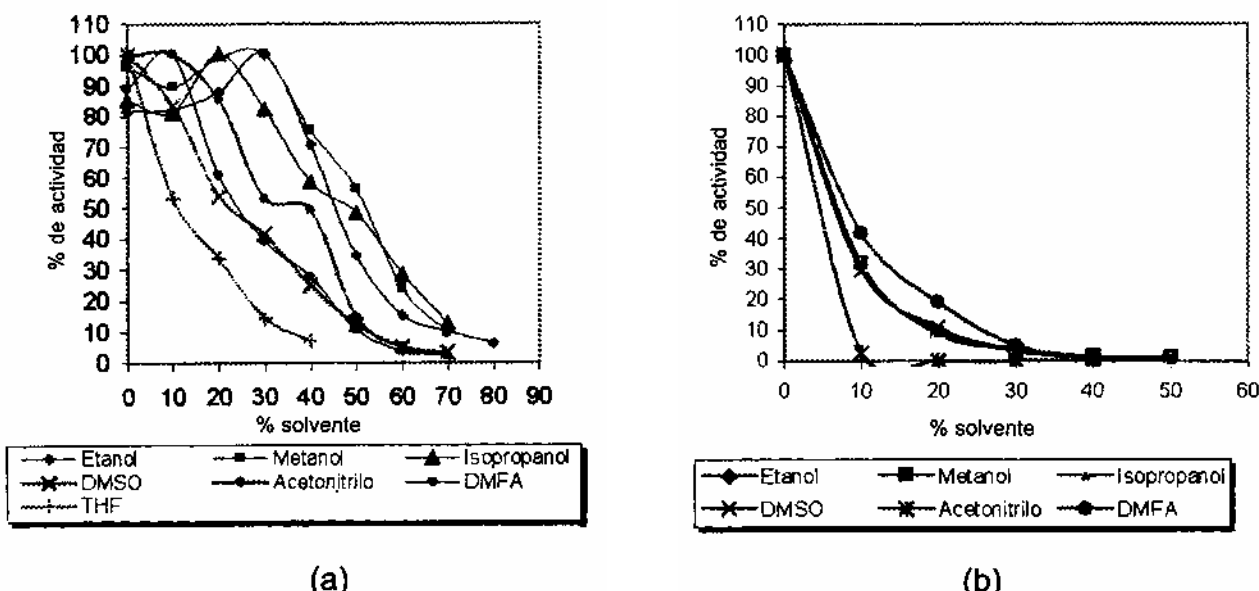


Figura 1. Porcentajes de actividad biocatalítica tipo peroxidasa sobre guayacol empleando sistemas orgánicos, (a) enzima PPR, (b) enzima CPO.

Las diferencias encontradas en cuanto al efecto de los solventes pueden deberse al tipo de interacciones intermoleculares establecidas entre el solvente, el sustrato y el agua. Así, para los que produjeron aumento en el valor de actividad enzimática, es posible que las interacciones dadas hayan permitido un mejor transporte del sustrato hacia el sitio activo de la enzima, y por tanto facilitar la formación del complejo enzima-sustrato. Sin embargo, luego de adicionar mayores cantidades de solvente, el carácter polar de dichos compuestos junto con su alta capacidad para formar puentes de hidrógeno pudo establecer una alta competencia por las moléculas de agua, y por consiguiente, desestabilizar la capa de hidratación que rodea a la enzima.

De otro lado, los resultados para la enzima CPO mostraron un comportamiento biocatalítico diferente, en el cual estuvo drásticamente afectada la actividad catalítica. En este sentido, Field (1996) ha manifestado que la baja tolerancia -observada experimentalmente- de muchas peroxidasas fúngicas puede explicarse en términos de las diferencias entre ellas con respecto a su contenido de carbohidratos hidrofílicos y residuos fosfatados. Ya es conocido que todas estas enzimas son O o N-glicosiladas y en algunos casos fosforiladas (LiP), con lo cual las interacciones moleculares con solventes polares se ven favorecidas.

En la figura 1 (b) pueden observarse los respectivos valores de actividad enzimática para la CPO a diferentes porcentajes (v/v) de solvente. Para todos los casos, la actividad enzimática tipo peroxidasa, en mezclas solvente orgánico/agua, fue significativamente menor que el obtenido en la mezcla acuosa.

Las interacciones intermoleculares establecidas en el sistema de reacción orgánico desfavorecieron la actividad biocatalítica de la CPO. Estas interacciones pueden estar ejerciendo una fuerte desnaturalización de la enzima en la medida en que ellas sean capaces de desestabilizar los enlaces e interacciones dadas en la molécula proteica. También podría pensarse en un efecto inhibitorio dado por la unión de moléculas de solvente al sitio activo de la enzima.

La tabla 3 presenta los valores de Kcat, para ambas enzimas, obtenidos a la concentración C_{50} . Este parámetro da cuenta del número de moléculas de sustrato transformadas por unidad de enzima y por tiempo, calculada a la concentración de solvente en la cual se logra el 50% de la actividad enzimática máxima. Mientras que los respectivos valores de Kcat para las mezclas reactivas de CPO son bajos, los correspondientes valores para la PPR logran valores hasta diez veces mayores.

Los mayores valores de Kcat y C_{50} se obtuvieron con las mezclas preparadas con isopropanol y DMFA para el caso de la PPR y CPO, respectivamente.

Estos resultados ponen de manifiesto el gran potencial de la PPR para la remoción de compuestos fenólicos vertidos en matrices acuosas con contenido de solventes miscibles de hasta 50% (v/v). El comportamiento de la presente hemoproteína, de origen vegetal, corrobora los buenos resultados presentados por otras enzimas, sobre este mismo sustrato, obtenidas de fuentes vegetales tales como la peroxidasa de rábano picante y de soya (Karam *et al.*, 1997; Nicell *et al.*, 1997; Ryu *et al.*, 1992).

Tabla 3. Valores de C_{50} y Kcat calculados para las enzimas PPR y CPO con actividad peroxidasa evaluada sobre guayacol.

Solventes	C_{50} (%v/v)		Kcat (s^{-1})	
	CPO	PPR	CPO	PPR (s^{-1})
THF	4.41	10.97	1.4×10^2	2.7×10^2
DMSO	6.3	21.92	1.3×10^2	2.5×10^2
DMFA	7.56	24.23	1.35×10^2	2.94×10^2
Acetonitrilo	5.35	40.0	1.25×10^2	2.53×10^2
Etanol	5.04	45.77	1.35×10^2	3.0×10^2
Isopropanol	5.48	50.0	1.3×10^2	2.96×10^2
Metanol	5.5	52.31	1.3×10^2	2.80×10^2

Actividad biocatalítica sobre ABTS

En la figura 2 se indican los datos de actividad enzimática obtenidos en las evaluaciones experimentales hechas con PPR y CPO en sistemas orgánicos que contienen ABTS como sustrato.

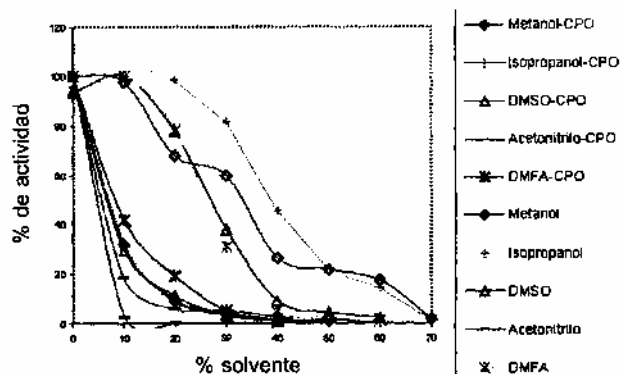


Figura 2. Porcentajes de actividad biocatalítica tipo peroxidasa de las enzimas PPR y CPO sobre ABTS en sistemas orgánicos.

En general, para todos los solventes ensayados se observó un descenso en los valores de actividad enzimática (para la PPR) comparado con el correspondiente valor dado en el sistema acuoso. Hasta con un contenido del 10% de solvente en las mezclas reactivas se notó una conservación del valor de actividad enzimática para la mayoría de los solventes empleados (a excepción del acetonitrilo y del etanol). Para el DMSO se alcanza a evidenciar un ligero pico de máxima actividad a un valor del 10% de solvente.

Con respecto al acetonitrilo, éste produce un fuerte efecto desestabilizante en la actividad peroxidasa de la proteína, el cual puede observarse de la gráfica

en donde la tendencia del cambio de actividad es de tipo hiperbólico, como sucedió en el caso anterior para la CPO. Es posible que las interacciones solvente-sustrato produjeran un efecto inhibitorio irreversible. Evidentemente, las diferencias encontradas en el comportamiento catalítico de la PPR frente a este sustrato en mezclas de solventes orgánicos tiene que ver con las interacciones entre el ABTS y la hemoproteína, las cuales pueden estar impidiendo la formación del complejo enzima-sustrato.

En cuanto a la CPO, el comportamiento frente a las mezclas de solventes (figura 2) es similar al observado en el caso anterior, presentándose un alto efecto negativo para cuando se empleó acetonitrilo. Después del 10% de solvente, el porcentaje de actividad observado fue cercano a cero.

Para ambas enzimas, las mezclas preparadas con THF (a cualquier %v/v) no presentaron actividad enzimática, resultado que señala un efecto negativo (denaturante) producto de las interacciones entre este solvente (de mayor hidrofobicidad), las moléculas de ABTS y las enzimas.

Los respectivos valores de C_{50} y K_{cat} para la CPO se muestran en la tabla 4. En cuanto a los valores de la constante catalítica, K_{cat} , en todos los casos el orden de magnitud fue el mismo para ambas enzimas. Esto indica que las dos peroxidases son capaces de transformar entre 100 y 300 moléculas de ABTS por segundo en sistemas orgánicos y sólo haber perdido el 50% de su máxima actividad enzimática.

Como ya había podido observarse en la figura anterior, los mayores valores de C_{50} para la enzima

Tabla 4. Valores de C_{50} y K_{cat} calculados para las enzimas PPR y CPO con actividad peroxidasa evaluada sobre ABTS.

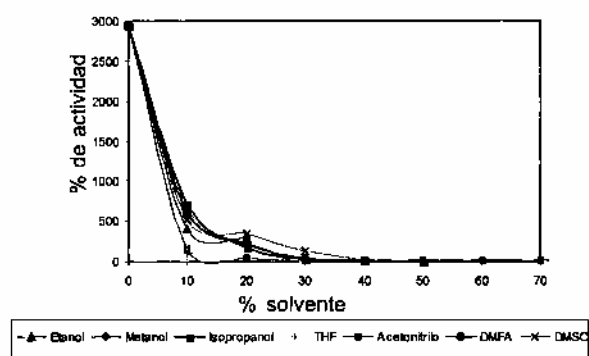
Solventes	C_{50} (%v/v)		K_{cat} (s ⁻¹)	
	CPO	PPR	CPO	PPR
DMSO	6.32	27.25	2.6×10^2	2.0×10^2
DMFA	8.33	26.05	2.3×10^2	1.8×10^2
Acetonitrilo	4.4	5.5	2.5×10^2	1.75×10^2
Etanol	4.4	35.2	2.7×10^2	1.55×10^2
Isopropanol	6.87	33.57	2.4×10^2	3.0×10^2
Metanol	6.52	39.7	2.6×10^2	1.0×10^2

PPR sugieren una buena tolerancia frente a los solventes orgánicos miscibles en agua por parte de esta hemoproteína.

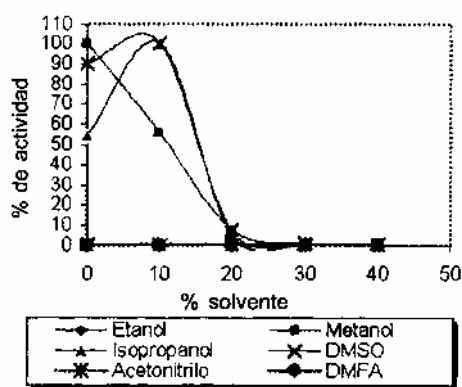
Actividad biocatalítica sobre MCD

En la figura 3 (b) se presentan los resultados obtenidos en los ensayos con la enzima PPR evaluada sobre sistemas orgánicos que contienen MCD como sustrato.

Estos datos fueron generados en mezclas hechas con buffer fosfato a pH = 3.0, puesto que a su valor óptimo de actividad (5.1) no pudo vencerse el potencial redox del ion cloruro, por lo que no presentó actividad catalítica. Este resultado experimental se convierte en un aporte novedoso, puesto que no existía, hasta el



(a)



(b)

Figura 3. Porcentajes de actividad biocatalítica tipo haloperoxidasa sobre MCD y sistemas orgánicos, (a) enzima PPR, (b) enzima CPO.

momento, reporte alguno de actividad cloroperoxidasa para hemoproteínas de origen vegetal.

En cuanto al comportamiento de la PPR en sistemas orgánicos, se observó actividad catalítica para las soluciones con metanol, isopropanol y DMSO. Para el primero se redujo la actividad enzimática a medida que aumentaba el porcentaje de solvente, mientras que para los otros dos se presentó un incremento de actividad hasta un valor máximo cercano al 10% de solvente. Sin embargo, luego de este pico el descenso en la actividad se dio rápidamente.

Para los otros tres solventes evaluados no hubo señal de actividad enzimática a ninguno de los porcentajes de solvente adicionado a la mezcla.

De otra parte, para la enzima CPO, los resultados obtenidos se muestran en la figura 3 (a) donde, al igual que en los casos anteriores, se presenta una tendencia hiperbólica de disminución en los valores de actividad enzimática siendo más drástica para las mezclas con THF.

En la tabla 5 se indican los respectivos valores de C_{50} y K_{cat} para las dos enzimas. En este caso los correspondientes valores de K_{cat} para la CPO fueron hasta 100 veces mayores, mientras que los C_{50} fueron un orden de magnitud menor comparados con la PPR. Nuevamente se observa el efecto desestabilizante de los solventes polares sobre la enzima de origen fúngico.

El valor de K_{cat} para CPO en sistema acuoso es del orden de 10^3 , mientras que en sistemas orgánicos se disminuye hasta en 50% (8.0×10^2 para la mezcla con THF) el número de moléculas transformadas enzimáticamente por segundo. Estos resultados señalan la alta capacidad de cloroperoxidación de la enzima CPO aun bajo presencia de solventes orgánicos miscibles en agua.

Actividad biocatalítica sobre naranja de metilo

En las evaluaciones hechas con la enzima peroxidasa de palma real no se observó capacidad de oxidar biocatalíticamente el colorante naranja de metilo. Los ensayos se efectuaron en soluciones acuosas a pH 3.0, 4.1 y 5.0, y en sistemas orgánicos (10% de solvente v/v). Para ninguno de los casos se evidenció, por medio de la técnica empleada (espectrofotometría),

Tabla 5. Valores de C_{50} y Kcat calculados para las enzimas PPR y CPO con actividad peroxidasa evaluada sobre MCD.

Solventes	C_{50} (%v/v)		Kcat (s^{-1})	
	CPO	PPR	CPO	PPR
THF	4.5	0.0	8.0×10^2	0.0
DMSO	5.3	18.1	9.4×10^2	4.2
DMFA	5.6	0.0	9.8×10^2	0.0
Acetonitrilo	4.5	0.0	8.2×10^2	0.0
Etanol	5.0	0.0	8.8×10^2	0.0
Isopropanol	6.2	18.1	8.6×10^2	7.0
Metanol	6.0	11.5	9.0×10^2	3.8

actividad peroxidasa de la PPR. Lo anterior muestra una imposibilidad por parte de esta hemoproteína, de origen vegetal, para decolorar las soluciones de naranja de metilo. Según lo anterior, la PPR no tendría un potencial de aplicación para la biodegradación de compuestos colorantes de este tipo presentes en matrices acuosas.

De otro lado, la enzima cloroperoxidasa mostró una alta capacidad de decolorar el compuesto modelo seleccionado. En los sistemas acuosos se obtuvo una actividad enzimática de 380 UI/ml, mientras que en los orgánicos se evidenció un comportamiento hiperbólico tendiente a la disminución del valor de actividad a medida que aumentaba el porcentaje de solvente en forma similar a lo observado con los anteriores sustratos.

En general, el comportamiento catalítico de la CPO, en sistemas orgánicos con solventes miscibles en agua y sustratos de baja hidrofobicidad ($t_e < 3.36$), fue en todos los casos similar. Tal hecho señala un fuerte efecto negativo de dichos solventes sobre la actividad biocatalítica de esta hemoproteína. Es decir, para el caso de estos sustratos de alta solubilidad en agua, el acceso de ellos al sitio activo de la enzima CPO no presenta limitaciones difusionales (Dunford et al., 1987), y por tanto, la adición de solventes de apreciable polaridad y capacidad de formar puentes de hidrogeno (solventes miscibles en agua) puede ayudar a la desestabilización estructural de la enzima, ya sea por competencia del agua de hidratación ligada a la proteína o por cambios en los enlaces y fuerzas de unión presentes en la estructura molecular de la enzima (Griebenow et al., 1996).

Tabla 6. Valores de C_{50} calculados para la enzima CPO con actividad peroxidasa evaluada sobre naranja de metilo.

Solventes	C_{50}	Kcat (s^{-1})
THF	4.35	1.5×10^2
DMFA	4.98	1.5×10^2
Acetonitrilo	5.51	1.35×10^2
Isopropanol	7.54	1.4×10^2
DMSO	4.2	1.5×10^2
Metanol	16.67	2.0×10^2

En la tabla 6 se muestran los valores de Kcat a los correspondientes valores de C_{50} , para la oxidación del naranja de metilo por parte de la CPO.

Los resultados obtenidos con este sustrato muestran un nuevo campo de potencial aplicación de la enzima CPO. Ya existía (Shin et al., 1998) un reporte sobre la capacidad de decolorización de colorantes artificiales por parte de peroxidases obtenidas de cultivos del hongo *Pleurotus ostreatus*. Sin embargo, el reporte se hace en términos de porcentaje de decolorización y no se brinda información cuantitativa sobre el desempeño de la enzima. En el presente trabajo se muestran los respectivos valores de Kcat calculados para sistemas orgánicos, los cuales están del orden de 10^4 moléculas de colorante transformadas en un minuto por 1 umol de enzima.

Actividad biocatalítica sobre pireno

Durante los ensayos de actividad catalítica se observó actividad química del DMSO sobre el pireno, por lo cual se desistió de su uso como solvente para las mezclas por ensayar.

Las evaluaciones experimentales de actividad biocatalítica de la PPR sobre sistemas orgánicos que contienen pireno, mostraron resultados negativos puesto que no hubo evidencia de transformación alguna de dicho compuesto cuando se emplearon mezclas orgánicas con los solventes etanol, THF, DMFA y metanol. Sólo se presentó una ligera actividad enzimática en los sistemas reactivos preparados con acetonitrilo e isopropanol (datos no mostrados).

Con respecto a la enzima CPO, la figura 5 (b) ilustra los resultados obtenidos en las evaluaciones con sistemas orgánicos. Como se observa, la tendencia de las curvas es hacia la formación de una cumbre que corresponde en todos los casos al máximo de actividad enzimática.

Los solventes que produjeron un significativo aumento de la actividad enzimática fueron el acetonitrilo e isopropanol, mientras que los de menor efecto fueron el metanol y el etanol. En este sentido, se presentó una curiosa coincidencia en cuanto a los solventes isopropanol y acetonitrilo, la cual vino dada por la alta solubilidad del pireno en dichos solventes. Este hecho pudo haber facilitado la expresión de la actividad catalítica, sobre este sustrato, por parte de la PPR y así mismo la alta relativa actividad de la CPO.

Esta característica en el comportamiento catalítico de la CPO ya había sido señalada por Torres *et al.*, (1996) y puede ser atribuida a factores relacionados con la alta hidrofobicidad del pireno y la dificultad del sitio activo para interactuar con el sustrato. Posiblemente, la adición de mayores cantidades de solvente tenga un efecto desnaturalizante sobre la enzima, y por tal motivo se observa la disminución en el pico de máxima actividad.

En la tabla 7 se muestran los respectivos valores de Kcat y C_{50} obtenidos con la CPO sobre el sistemas orgánicos que contienen el pireno como sustrato. El valor de C_{50} obtenido con las mezclas de THF fue aproximadamente 19% v/v, el cual coincide con lo mostrado en los reportes de Torres *et al.*, (1997). Sin

Tabla 7. Valores de Kcat y C_{50} calculados para la enzima CPO con actividad peroxidasa evaluada sobre pireno.

Solventes	C_{50} (%v/v)	Kcat (min ⁻¹)
DMFA	15.61	5.0×10^2
Etanol	15.70	5.0
THF	18.99	10.0
Acetonitrilo	22.66	7.0×10^2
Metanol	23.66	23.0
Isopropanol	24.66	45.0

embargo, el valor de Kcat obtenido en este trabajo resultó ser un orden de magnitud mayor que el presentado por el autor en mención.

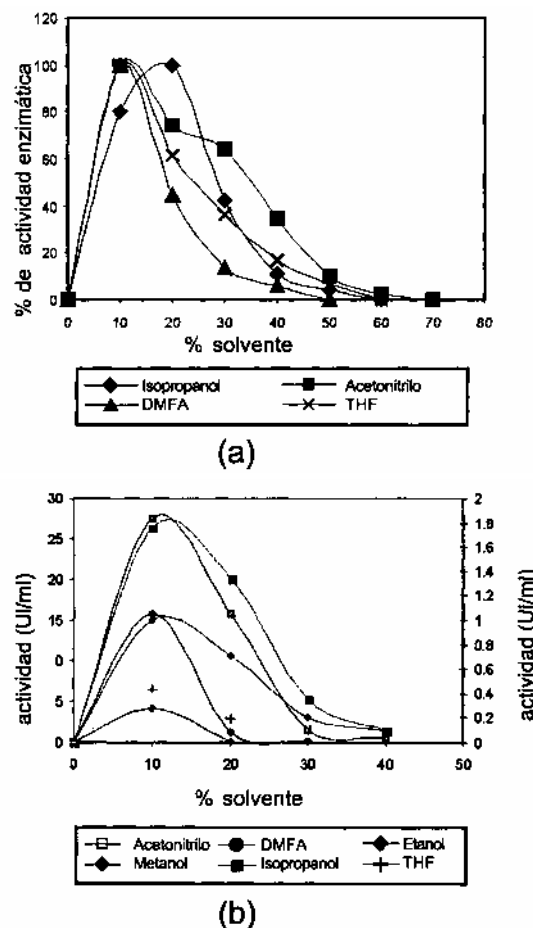


Figura 5. Efecto de solventes orgánicos miscibles sobre la actividad peroxidasa de CPO evaluada sobre PAH's. (a) difenilamina, (b) pireno.

El mayor valor de K_{cat} fue obtenido para la mezcla (a la concentración C_{50}) de acetonitrilo, a la vez que el menor valor correspondió a la solución que contuvo etanol. Estos resultados muestran, igualmente, que los mejores solventes para desarrollar mezclas con el pireno fueron acetonitrilo, isopropanol y DMFA.

Estas diferencias en el comportamiento catalítico de la enzima CPO sobre sustratos de diferentes hidrofobicidad ponen de manifiesto la complejidad de los fenómenos dados en cada uno de los sistemas reactivos a los cuales fue expuesta dicha hemoproteína.

Actividad biocatalítica sobre difenilamina

La enzima PPR no mostró actividad catalítica sobre este sustrato orgánico nitrogenado solubilizado en todas las mezclas agua/solvente orgánico miscible evaluadas.

En cuanto a la enzima CPO, en la figura 5 (a) se ilustran los porcentajes de actividad obtenidos en mezclas reactivas con solventes orgánicos miscibles en agua. Con este sustrato, la CPO tuvo un comportamiento similar al obtenido con el pireno; es decir, se presentaron umbrales de máxima actividad a diferentes porcentajes de solventes (cercaos al 10%).

Para el caso de las mezclas preparadas con isopropanol, el pico de máxima biotransformación se obtuvo a un 20% de solvente, con lo cual se confirma la tolerancia y uso favorables de este solvente para la biorremediación de matrices contaminadas con DFA.

El mayor valor de K_{cat} (29 min^{-1}) se obtuvo para las soluciones que contenían acetonitrilo, mientras que el menor fue para las mezclas con DMFA. En general, los valores obtenidos son ligeramente mayores que los reportados para citocromo C en los mismos sistemas reactivos, y del mismo orden que los obtenidos para la enzima LiP (Vázquez *et al.*, 1994).

CONCLUSIONES

Los solventes orgánicos miscibles en agua mostraron un drástico efecto desnaturizante sobre la enzima CPO, cuando ésta fue expuesta a sistemas reactivos que contenían sustratos de baja hidrofobicidad. De otro

lado, la enzima PPR presentó un comportamiento catalítico bastante interesante puesto que mostró una relativa alta tolerancia a los solventes orgánicos miscibles. Esto se observó en el bajo efecto de disminución de la actividad enzimática y en los mayores valores de C_{50} .

La enzima peroxidasa de palma real mostró actividad haloperoxidasa (sobre MCD) tanto en sistemas acuosos como en mezclas de solventes orgánicos miscibles en agua. En todos los casos dicha actividad sólo se presentó a pH de 3.0. Este resultado aumenta el potencial de aplicación de esta hemoproteína de origen vegetal hacia la producción de compuestos halogenados de interés farmacéutico.

De todos los solventes evaluados, el THF, de mayor hidrofobicidad, fue el que ejerció un mayor efecto negativo sobre la actividad enzimática de las dos hemoproteínas cuando fueron evaluadas sobre sustratos de baja hidrofobicidad. Sin embargo, frente a los sustratos más hidrofóbicos se observó una aceptable capacidad de solubilización y un relativo bajo efecto sobre la actividad enzimática.

De otro lado, el isopropanol fue el mejor solvente orgánico en todas las evaluaciones y para ambas enzimas, dado que los efectos sobre la actividad enzimática fueron mucho menores. Por tanto, se recomienda como un solvente adecuado para aplicaciones en biocatálisis orgánica que empleen estas enzimas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a Alejandro Torres y Nelson López por su colaboración en la parte analítica. Igualmente al laboratorio de enzimología de la UIS por facilitar la enzima PPR.

BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, M. 1993. Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. *The Chemical Engineering Journal*. 52, B49-B58.
- Batra, R., and Gupta, M. 1994. Enhancement of enzyme activity in aqueous - organic solvent mixtures. *Biotechnology Letters*. 16,1059-1064.

- Brink, L. E. S., and Tramper, J. 1985. Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 27,1258-1269.
- Buchanan, I., and Nicell, J. 1999. A simplified model of peroxidase - catalyzed phenol removal from aqueous solution. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 74, 669-674.
- Dawson, J. 1988. Probing structure-function relations in heme - containing oxygenases and peroxidases. *Science*. 240,433-439.
- Dordick, J. 1989. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. 11,194-211.
- Dunford, H., Lambeir, A., Kashem, M., and Pickard, M. 1987. On the mechanism of chlorination by chloroperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 252, 292-302.
- Field, J., Vledder, R., Van Zeist, J., and Ruijken, W. 1996. The tolerance of lignin peroxidase and manganese - dependent peroxidase to miscible solvents and the in vitro oxidation of anthracene in solvent: water mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*. 18,300-308.
- Fransen, M. 1994. Haloperoxidases : useful catalysts for halogenation and oxidation reactions. *Catalysis Today*. 22,441-457.
- Griebenow, K., and Klivanov, A. 1996. On protein denaturation in aqueous - organic mixtures but not in pure organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*. 118,11695-11700.
- Guha, S., Peters, C., and Jaffe, P. 1999. Multisubstrate biodegradation kinetics of Naphthalene, Phenanthrene, and Pyrene mixtures. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol 65 491 - 499.
- Hammel, K., Kalyanaraman, B., and Kent, T. 198. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo [p] - dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *The Journal of Biological Chemistry*. 261,16948-16952.
- Illanes, A. 1994. *Biología de enzimas*. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso.
- Karam, J., and Nicell, J. 1997. Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 141-153 Review.
- Nicell, J., and Wright, H. 1997. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology*. 21,302-310.
- Pickard, M., Kadima, T., and Carmichael R. 1991. Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. *Journal of Industrial Microbiology*. 7,235-241.
- Ryu, K., and Dordick, J. 1992. How do organic solvents affect peroxidase structure and function? *Biochemistry*. 31, 2588-2598.
- Shin, K. Kim, C. 1998. Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters*. Vol 20(6). 569-572.
- Stoscheck, C. 1980. Increased uniformity in the response of the coomassie blue G protein assay to different proteins. *Analytical Biochemistry*. 18, 11-116.
- Torres, E., Siminovich, B., Barzana, E., Vázquez, R. 1997. Thermodynamic hydrophobicity of aqueous mixtures of water - miscible organic solvents predicts peroxidase activity. *Journal of Molecular Catalysis* 115.
- Torres, E., Tinoco, R., Vázquez R. 1996. Solvent hydrophobicity predicts biocatalytic behavior of lignin peroxidase and cytochrome c in aqueous solution of water - miscible organic solvents. *Journal of Biotechnology*. 49, 59 - 67.
- Vázquez R., Westlake, W., and Fedorak, P. 1994. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Applied and Environmental Microbiology*. 459-466.