

MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE PEROXIDASA DE NABO Y SU APLICACIÓN EN LA DESTOXIFICACIÓN DE SOLUCIONES FENÓLICAS

González Rodríguez, C.; Quintanilla-Guerrero, F.; García Almendárez, B.; Regalado C. DIPA, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro

RESUMEN

Los compuestos aromáticos tales como el fenol y sus derivados son la mayor clase de agentes contaminantes en aguas residuales de varias industrias químicas y de alimentos. Se mejoró el rendimiento catalítico de la peroxidasa de nabo (PN), constituyendo una alternativa viable para el proceso de destoxificación de agua conteniendo compuestos fenólicos. Se evaluaron las metodologías de inmovilización por atrapamiento físico y químico. Para el método físico se mezcló un extracto crudo liofilizado de PN con alginato de sodio, polietilenglicol (protector de sitio activo de la enzima) y amortiguador de fosfato 20 mM, pH 6. Se obtuvieron esferas perfectamente definidas de alginato de calcio atrapando en su interior a la PN, evaluándose la actividad antes y después de la inmovilización, para así obtener la actividad enzimática promedio por esfera. Se efectuó otra inmovilización, esta vez por enlace covalente al hacer reaccionar la resina Affi-Gel 10 con la PN de un extracto crudo liofilizado y amortiguador de fosfato 20 mM, pH 6. Posteriormente, se comparó la capacidad destoxificante de la PN inmovilizada por ambos métodos usando soluciones de fenol en diferentes concentraciones (0.2-1.4 mg/L). La PN inmovilizada por ambas metodologías resultó tener una eficiencia >98% en la remoción de fenol en agua (0.8 mg/L fenol). La PN inmovilizada por atrapamiento permitió remociones del 98% de fenol a concentraciones de hasta 1.2 mg/L.

INTRODUCCIÓN

La actividad industrial desarrollada por el hombre ha provocado que se desechen grandes cantidades de compuestos tóxicos afectando a la flora y fauna de las regiones involucradas, razón por la cual es importante eliminar contaminantes de los desechos industriales. Los compuestos aromáticos tales como el fenol y sus derivados son la mayor clase de agentes contaminantes en aguas residuales de varias industrias químicas y de alimentos (Nicell y col., 1993).

Los fenoles son considerados por el Instituto Nacional de Ecología así como por la agencia de protección al medio ambiente de los Estados Unidos de Norteamérica como contaminantes altamente tóxicos. La presencia de estos compuestos en aguas de riego se manifiesta a través del daño a tejidos vegetales provocando pigmentaciones anormales, así como también se puede llegar a observar coloraciones inusuales en carne de ganado y pescado.

El ingreso de estos compuestos en mantos acuíferos se traduce en la alteración de la cadena alimenticia por el crecimiento anormal de algas y flora acuática que a su vez requiere de una mayor demanda bioquímica de oxígeno provocando la muerte de la fauna acuática. Para el hombre significa un potencial de riesgo importante debido a la exposición continua de estos compuestos provocando la muerte del individuo. Uno de los métodos para su remoción incluye la polimerización usando enzimas redox. El tratamiento enzimático ofrece un alto grado de especificidad, operaciones bajo condiciones suaves y alta velocidad de reacción (Ortega, 2001).

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producidas por los organismos vivos. Las principales características que destacan a las enzimas sobre otros catalizadores son: disminución de la energía de activación para llevar a cabo una reacción, el poder catalítico, su especificidad y la capacidad de regular la catálisis por varios compuestos naturales (Whitaker, 1994).

Una de las óxido-reductasas más utilizadas en la industria de los alimentos es la peroxidasa, una glicoproteína que contiene un grupo hemo en el sitio activo, la cual descompone el peróxido de

hidrógeno en presencia de un donador de hidrógeno (Regalado y col., 2004). Las peroxidases están ampliamente distribuidas en el reino animal y vegetal, y han sido encontradas en todas las plantas superiores que han sido investigadas. Estas enzimas contienen un grupo prostético hemo y utilizan el peróxido de hidrógeno como sustrato oxidante, aunque se han encontrado otros tipos de peroxidases que contienen iones metálicos, como selenio, manganeso y vanadio, o flavina como grupo prostético (Duarte y col., 2001). La peroxidasa tiene la habilidad de catalizar la polimerización, seguido de una precipitación de compuestos aromáticos provenientes de soluciones acuosas.

El principal problema de la utilización de la peroxidasa en la eliminación de fenoles son los requerimientos de grandes cantidades de esta enzima ya que la peroxidasa pierde gran parte de su actividad durante la reacción de la polimerización de los compuestos fenólicos, lo cual eleva el costo de tratamiento. Nakamoto y Machida (1992), atribuyen la pérdida de actividad de la peroxidasa durante la remoción de compuestos fenólicos a una adsorción de la enzima por parte de los polímeros fenólicos, lo cual dificulta el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima. Una solución a este problema fue propuesta por Nakamoto y Machida (1992), la cual se basa en la adición de proteínas o polímeros hidrofílicos (aditivos) los cuales inhiben la adsorción de la enzima. Los aditivos que se han propuesto son la gelatina, caseína, seroalbumina bovina, alcohol polivinílico, borato de sodio y polietilenglicol.

MATERIALES Y MÉTODOS

El compuesto aromático utilizado fue fenol (C_6H_4OH , Aldrich), con pureza del 99%, ABTS [2,2' azino-bis(3-etilbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] (Sigma), peróxido de hidrógeno (3% w/v, J.T. Baker) y para preparar soluciones se usó agua grado HPLC.

Se utilizó alginato de sodio, cloruro de calcio ($CaCl_2$) y polietilenglicol-2000 de Sigma. La resina Affi-Gel 10 (resina activa de éster de agarosa), de la marca Bio Rad. Se utilizó extracto crudo liofilizado de enzima peroxidasa obtenido en el Lab. De Biotecnología de alimentos de la facultad de Química.

Ensayo de actividad de peroxidasa

La actividad de la peroxidasa se determinó usando ABTS como un donador de hidrógeno, a través del cambio en absorbancia a 414 nm, por un lapso de 3 min (Duarte y col., 2002). La mezcla de reacción contenía 0.03 mL de ABTS, 0.05 ml de extracto crudo liofilizado de peroxidasa de nabo (PN), 0.08 mL de H_2O_2 y 1.34 mL de amortiguador de fosfato pH 6, con un volumen final de 1.5 cm^3 . Una unidad de actividad es definida como los μmol de ABTS consumidos por minuto a pH 6 y 25°C.

Inmovilización de PN (Método de atrapamiento físico)

La mezcla de reacción para diferentes inmovilizaciones hasta obtener la menor pérdida de actividad en el proceso, se muestra en la Tabla 1. La mezcla se realizó en agitación continua durante 3 h. Se hizo gotear la mezcla en una solución de $CaCl_2$ al 4% hasta obtener las esferas de alginato de calcio. Posteriormente se realizó un ensayo de actividad a la solución de $CaCl_2$ y a las esferas formadas para calcular la cantidad de enzima inmovilizada.

Inmovilización de PN (Método de atrapamiento por enlace covalente)

La mezcla contenía $2 \times 10^{-3} g$ de extracto crudo liofilizado, 2 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 6, 0.3 g de Affi-Gel. Se agitó por 5 min, seguido de una centrifugación durante 5 min a 2 000 rpm. Se determinó la actividad en el sobrenadante para evaluar la pérdida de actividad durante la inmovilización.

Reacción de precipitación de fenoles

El vaso reactor contenía 30 cm³ de una solución de concentración conocida de fenol, peróxido de hidrógeno y la enzima inmovilizada. La concentración de la solución acuosa de fenol se varió en el rango de 0.2 a 1.4 mg/L. La actividad de la PN inmovilizada fue en promedio de 39.07 U y la reacción se inició por la adición de una cantidad conocida de peróxido de hidrógeno al reactor. El tiempo de reacción fue de 3 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo una actividad inicial de la enzima de 39,070 U/L o 39.07 U/mg. Para la PN inmovilizada por atrapamiento físico se obtuvieron las cifras mostradas en la Tabla 2. De acuerdo con estos resultados, las actividades promedio para cada esfera en las diferentes inmovilizaciones fueron: 0.17 U, 0.18 U y 0.19 U, respectivamente, mientras que la pérdida de actividad para cada esfera en las distintas condiciones fueron 0.14 U, 0.05 U y 0.04 U, respectivamente.

Se observó que a mayor concentración de ácido algínico se obtuvo mayor retención de enzima activa. Sin embargo, debido al empaquetamiento de la enzima en el alginato se redujo la probabilidad del contacto enzima-sustrato de tal forma que esto condujo a una disminución en la remoción de compuestos fenólicos durante la reacción. Dado lo anterior, se concluye que la mejor concentración de ácido algínico durante la inmovilización por atrapamiento físico se obtuvo mediante la condición 2 (Tabla 1).

Para la enzima inmovilizada a través de Affi-Gel se obtuvieron resultados de actividad en la solución sobrenadante (Tabla 3). Por lo tanto, la cantidad de enzima retenida a través de Affi-Gel presentó una actividad de 3.69 U. La remoción de fenol (en concentración inicial hasta de 0.8 mg/L) fue >98% con ambos sistemas, mientras que la inmovilización por atrapamiento permitió remociones del 98% incluso a concentraciones de 1.2 mg/L de fenol (Figura 1).

CONCLUSIONES

Las enzimas inmovilizadas tanto por atrapamiento físico como químico resultaron ser muy eficientes en la remoción de fenol en agua (remoción >98% a 0.8 mg/L de fenol).

Para el atrapamiento físico se obtuvo que las condiciones óptimas se aprecian en la condición dos (Tabla 1). Para el segundo método se determinó que la cantidad de enzima inmovilizada en Affi-Gel, presenta una actividad de 3.68 U. La inmovilización por atrapamiento permitió remociones del 98% de fenol a concentraciones de hasta 1.2 mg/L, por lo que se concluye que este tipo de inmovilización puede ser utilizada como una buena alternativa para la remoción de concentraciones elevadas de fenol.

BIBLIOGRAFÍA

- Duarte M.; Ortega M., García B., Regalado C. "Renoval of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L var purple top white globe) peroxidase. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 78, (1), 43-45, **2002**.
- Nakamoto S and Machida N, "Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives". Water Research 26 (1), 49-54, **1992**.
- Nicell J A, Bewtra J K, Biswas N., Taylor E. "Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater". Water Research 27 (5), 1627-1639, **1993**.
- Regalado C., García B., Duarte M. "Biotechnological applications of peroxidases" Phytochemistry Reviews 3 (1), 243-256, **2004**.

Ortega Tovar M. A. “Eliminación de compuestos fenólicos mediante su polimerización catalizada por peroxidasa de nabo (*Brassica napus* L. var. Purple top white globe). Tesis de Licenciatura Químico en Alimentos., UAQ-Querétaro México, 2001.

Whitaker, J. R. “Principles of Enzymology for the Food Sciences” 2a Ed. Marcel Dekker. New York. Cap. 26. pp.565-577, 1994.

Tabla 1. Condiciones de inmovilización utilizadas para atrapamiento físico

Condiciones de inmovilización	g de extracto crudo liofilizado	g de polietilenglicol	g de ácido algínico	mL de amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 6
1	2×10^{-3}	2×10^{-3}	0.440	22
2	2×10^{-3}	2×10^{-3}	0.500	25
3	2×10^{-3}	2×10^{-3}	0.600	30

Tabla 2. Actividad obtenida de peroxidasa inmovilizada por atrapamiento físico

Condiciones de inmovilización	Actividad (U) de peroxidasa de nabo en esferas de alginato de calcio	Unidades de Actividad (U) de la peroxidasa de nabo inmovilizada
1	26.359	2.9307
2	20.924	0.9650
3	3.127	0.075

Tabla 3. Actividad del sobrenadante durante la inmovilización por enlace covalente en Affi-Gel 10

Unidades de Actividad (U)			
21.44	1.34	0.25×10^{-3}	8.93×10^{-4}
9.83	0.18	4.02×10^{-3}	
2.55	0.03	1.34×10^{-3}	$\Sigma = 35.38$

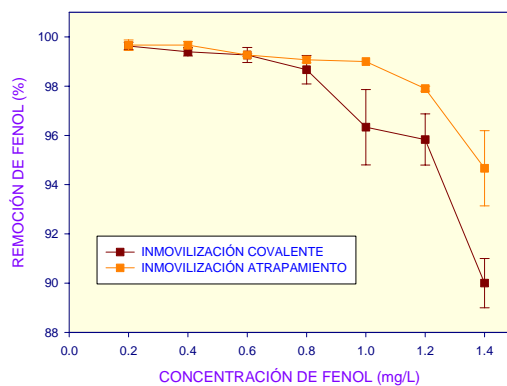


Figura 1. Comparación de la remoción de fenol por peroxidasa de nabo inmovilizada a diferentes concentraciones de fenol (PEG=100 mg/L, relación $[H_2O_2]/[fenol] = 1.6$).