

INMOVILIZACIÓN DE UNA PEROXIDASA DE CHAYOTE [*Sechium edule* (Jacq.) Sw] Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA REMOCIÓN DE SUSTANCIAS FENÓLICAS EN AGUAS CONTAMINADAS

María Lioba Osnelda VILLEGAS-ROSAS¹, Gunther GEISSLER¹,
Anabella HANDAL-SILVA³ y Enrique GONZÁLEZ-VERGARA^{2,3}

¹ Posgrado en Ciencias Ambientales, ² Centro de Química, ³ Laboratorio de Investigaciones Biológicas. Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 14 sur 6301, C.U., Jardines de San Manuel, Puebla 72570 Pue., México. Correo electrónico: ovillega@siu.buap.mx

(Recibido marzo 2002, aceptado mayo 2003)

Palabras clave: remoción, derivados fenólicos, aguas contaminadas, peroxidasa, inmovilización.

RESUMEN

Se presenta la inmovilización de una peroxidasa obtenida a partir de chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw] en un soporte funcionalizado adecuadamente y con activación previa, lo que impide que la enzima pierda sus propiedades catalíticas. También se realizaron estudios para demostrar su potencial aplicación en la descontaminación de aguas artificialmente contaminadas con sustancias fenólicas. Los resultados obtenidos muestran que una de las peroxidasa de chayote es inmovilizada con éxito en el soporte orgánico poliestireno-divinilbenceno funcionalizado con triglicina y activado con 1,1' carbonildiimidazol hasta valores alrededor de 100 %, sin perder su actividad de peroxidasa. El tratamiento de aguas artificialmente contaminadas con fenol, 2-metoxifenol ó 3-clorofenol, sujetas a la formación de sus polímeros mediada por peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno, muestra que los porcentajes de remoción de estos contaminantes se encuentran entre 75 y 100 %, mientras que la eliminación de los polímeros, provenientes de fenol y 2-metoxifenol están entre 65 y el 80 % en el mismo ensayo mediante filtración. Con 3-clorofenol no se observó la formación de los polímeros y por lo tanto su efectividad no pudo ser determinada y requiere de una investigación subsecuente. La peroxidasa de chayote puede tener gran utilidad para la descontaminación de aguas con compuestos fenólicos en su forma inmovilizada como aquí se describe.

Key words: removal, phenolic compounds, waste water, peroxidase, immobilization

ABSTRACT

Immobilization of a peroxidase from chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw] using an adequately functionalized and previously activated support which allows to preserve enzymatic activity is here presented. Studies were also carried out to show its potential for decontamination of artificial waste waters containing phenolic compounds. The peroxidase was successfully immobilized onto the organic support polystyrene-divinylbenzene copolymer functionalized with triglycine and activated with 1-1' carbonyldiimidazol with almost a 100% yield and with not apparent loss of enzymatic activity. Artificially contaminated waters containing phenol, 2-methoxyphenol or 3-chlorophenol, were subjected to peroxidase mediated polymer formation in the presence of hydrogen peroxide. The removal of the contaminants are in the range from 75 to 100 %, while the removal percentages of polymers using filtration are in the range from 65 to 80 % in the case of phenol and 2-methoxyphenol, however, for 3-chlorophenol this was not possible to evaluate and needs further investigation. Thus, peroxidase from chayote could have a great potential for decontamination of waste waters containing phenolics while immobilized onto an insoluble organic support as here described.

INTRODUCCIÓN

El deterioro ambiental causado por el crecimiento industrial y urbano ha creado la necesidad de tratar el agua para disminuir la concentración de contaminantes arrojados en ella. Para eliminar a los contaminantes es necesario utilizar métodos que dependen en gran medida de la calidad del agua que quiera tratarse y deseé obtenerse.

Por otro lado, crear una conciencia del reuso del agua, sería de gran beneficio a todas las personas. No es difícil deducir, que si se logra reusar toda el agua que se utiliza, sólo se requeriría un volumen mínimo de entrada de agua: *recircular una y otra vez el agua que empleamos, sería suficiente*, de aquí la importancia de buscar métodos alternativos para el tratamiento de aguas residuales, tanto de tipo municipal como industrial. Todos los esfuerzos encaminados a la prevención del deterioro de la calidad del agua en los cuerpos receptores y al empleo racional de la misma, merecen ser impulsados y promovidos desde los aspectos económico, social, político y cultural.

Compuestos aromáticos como los fenoles están presentes en aguas residuales provenientes de un gran número de industrias tales como: blanqueo de papel, refinamiento del petróleo, resinas y plásticos, farmacéutica, textil, etc. (Maloney *et al.* 1984). Tales compuestos hidroxiaromáticos pueden ser tóxicos cuando se encuentran en altos niveles y se sabe o se sospecha que son carcinogénicos (Kilbanov *et al.* 1983, Milánd *et al.* 1996). Además algunos derivados fenólicos tienen sabor y olor desagradables en el agua para beber cuando están presentes a niveles de partes por billón (Wolkoff y Larose 1974, Buikerma *et al.* 1979). En la actualidad se están desarrollando métodos enzimáticos muy prometedores para la remoción de estos contaminantes, cuando no pueden ser eliminados por tratamientos biológicos o físicos, mediante el uso de peroxidases y peróxido de hidrógeno (Klibanov *et al.* 1983, Al/Kassim *et al.* 1994, Bodzek *et al.* 1994, Wada *et al.* 1995, Kinsley y Nicell 2000, Masuda *et al.* 2001, Singh y Singh 2002, Villalobos y Buchanan 2002, Villegas-Rosas *et al.* 2002).

Las enzimas inmovilizadas también han presentado elevada eficiencia en la degradación de fenoles (Shewale y Naik 1991, Ruckenstein y Wang 1994, Peralta-Zamora *et al.* 1997). Una de las grandes ventajas de inmovilizar enzimas para el tratamiento de aguas residuales y en otros procesos es que pueden recuperarse y reutilizarse, situación que no se logra cuando la enzima es usada directamente en solución. De aquí la importancia de buscar soportes adecuados para inmovilizar las enzimas sin que éstas pierdan sus propiedades catalíticas.

Aquí se presentan los estudios realizados para la inmovilización de una peroxidasa obtenida a partir de chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw] en los soportes Bakerbond Glutaraldehído-P (J.T. Baker) y el soporte orgánico poliestireno-divinilbenceno funcionalizado con triglicina

(PS/DVB-3G) (Gómez-Cárdenas *et al.* 2001), así como los estudios de remoción en este último, de los contaminantes fenol, 2-metoxifenol y 3-clorofenol en aguas residuales artificialmente preparadas.

Fueron determinadas las condiciones para obtener porcentajes de inmovilización de alrededor del 100 % de una de las peroxidases de chayote en el soporte poliestireno-divinilbenceno funcionalizado con triglicina, mediante el uso de meta-mioglobina. Los estudios demostraron que con la peroxidasa inmovilizada se logra remover entre 75 y 100 % de los contaminantes analizados, abriendo la posibilidad de aplicar esta metodología a otros derivados y contaminantes similares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del soporte para la inmovilización

Debido a que no existe un soporte universal para la inmovilización de una enzima, éste tiene que ser seleccionado con base en algunas de sus características, como tipo de enzima a inmovilizar y proceso en que se desea usar. Aquí se describe la utilización de Bakerbond Glutaraldehído-P (J. T. Baker) como ejemplo de soporte inorgánico y del poliestireno-divinilbenceno (PS/DVB) (al 2.0 % de divinilbenceno, con una malla de 200 a 400, Polisciences, Inc.) como ejemplo de matriz orgánica insoluble en agua. Éste último fue modificado por incorporación del péptido glicilglicilglicina o triglicina (PS/DVB-3G) (González-Vergara *et al.* 1996, Gómez-Cárdenas *et al.* 2001, González-Vergara 2001), funcionalizando así la matriz original con grupos carboxilo.

El soporte funcionalizado se activó con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI, SIGMA). Para esto se agregaron 4 meq (0.646 g) del activador CDI disueltos en 5 mL de acetona por cada gramo de resina funcionalizada a activar. La reacción se llevó a cabo durante 2:30 h a 40 °C en un rotavapor (marca Heidolph WB 2000), concluido el tiempo de reacción, el soporte activado se lavó con acetona.

Selección de una proteína reportera

Para estimar algunos parámetros que permitieran establecer las condiciones iniciales para la inmovilización de la peroxidasa de chayote (POCh), se utilizó como proteína reportera a la meta-mioglobina (m-Mb), con propiedades espectroscópicas y catalíticas conocidas y de bajo costo, capaz de iniciar con ésta la factibilidad de la inmovilización de enzimas peroxidases en ambos soportes. Para la obtención de la m-Mb, se partió de mioglobina, extraída a partir de carne de res y posteriormente, mediante la adición de ferricianuro de potasio fue llevada a su forma meta (Bylka y Andersson 1997).

Estimación de los parámetros para la inmovilización de m-Mb

Para estimar algunos parámetros iniciales como velocidad de agitación (V , rpm), tiempo de reacción de inmovilización (t , h), temperatura (T , °C), cantidad de soporte (mg), volumen del reactor (V_r) y volumen de la solución de la proteína reportera, para la inmovilización de la POCh, se llevaron a cabo diferentes experimentos por triplicado utilizando m-Mb, inicialmente en el soporte comercial Bakerbond Glutaraldehído-P (BBG-P) en reactores de teflón colocados en un matraz de bola de 100 ml y en un rotavapor.

Para determinar la concentración adecuada de m-Mb se registraron los espectros de absorción ultravioleta-visible (UV-VIS) (espectrofotómetro UV-VIS-NIR, Shimadzu UV-31000S) a diferentes diluciones de ésta con amortiguador de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0. También, fueron probados diferentes reactores en forma y volumen considerando que iban a ser sometidos a agitación y calentamiento a distintas temperaturas, además, que las cantidades de soporte y de proteína reportera no fueran muy grandes. La cantidad del soporte BBG-P fue variada desde 50 a 100 mg.

Para estimar los valores de los parámetros de V , T y t , se fijaron dos de ellos y se varió el tercero. Concluido cada experimento (3 reactores), el sobrenadante se separó cuidadosamente del soporte y cada uno se trató de manera independiente. Al sobrenadante se le realizó su espectro UV-VIS, mientras que el soporte se lavó con una solución de NaCl 2M para eliminar la m-Mb que no fue inmovilizada. Al sobrenadante y al soporte con la m-Mb inmovilizada se les realizó el ensayo de actividad tipo peroxidasas diseñado para hemoglobinas (Everse *et al.* 1994). Posteriormente, se graficó el parámetro determinado contra la concentración de la m-Mb en el sobrenadante después de la reacción de inmovilización. El valor elegido para el parámetro en estudio fue aquel donde la concentración de m-Mb en el sobrenadante fue menor (Villegas-Rosas *et al.* 1999).

El experimento de inmovilización de la m-Mb en BBG-P fue realizado con los mejores parámetros seleccionados en su conjunto. Se estimó el porcentaje de inmovilización a partir de la absorbancia a 409 nm de m-Mb antes y después del proceso de inmovilización. A la m-Mb inmovilizada se le aplicó la prueba de actividad tipo peroxidasa como se mencionó anteriormente.

Inmovilización de una peroxidasa patrón y la peroxidasa de chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw]

Bajo las condiciones utilizadas para la inmovilización de m-Mb en el soporte BBG-P, se procedió a inmovilizar a la peroxidasa de rábano blanco o rábano picante (Horseradish, HRP) (ya que esta peroxidasa se usa a nivel industrial y se ha estudiado con más detalle, tomándose como referencia o patrón para el estudio de

peroxidasas obtenidas de nuevas fuentes) y la peroxidasa de chayote (POCh). Sin embargo, debido a los bajos rendimientos y a la liberación de sustancias coloridas en el proceso de inmovilización se decidió descartar este soporte y concentrar el estudio en el soporte PS/DVB-3G activado. La metodología implementada se transfirió al nuevo soporte y se obtuvieron mejores resultados bajo las condiciones ya determinadas.

Se realizaron pruebas de actividad enzimática para peroxidasas al soporte PS/DVB-3G sin activar y activado (Pütter 1974). A continuación se procedió a inmovilizar en éste a la peroxidasa patrón y la POCh, las cuales presentaron un índice de pureza o R.Z. ($A_{403\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) de 1.0 (SIGMA) y 0.77 (Villegas-Rosas 1993), respectivamente. Se utilizó una masa de 100 mg del soporte al cual se les añadieron 800 μL de solución de enzima ($A_{403\text{nm}} \sim 0.8$). La HRP y POCh inmovilizadas (HRP-PS/DVB-3G y POCh-PS/DVB-3G, respectivamente), se lavaron con NaCl 2M hasta que la solución de lavado no presentó actividad de peroxidasa y a las enzimas inmovilizadas se les realizó el ensayo de actividad para peroxidasas (Pütter 1974).

Pruebas de remoción de los contaminantes fenólicos mediante la POCh inmovilizada en PS/DVB-3G

Se utilizaron fenol, 2-metoxifenol y 3-clorofenol como contaminantes de prueba para poder comparar este estudio con los reportados en la literatura.

Para determinar la cantidad de H_2O_2 (12.3 mM) necesario para la reacción de polimerización del contaminante a estudiar, se preparó un agua residual artificial con 3 ml del amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7.0 (usando agua destilada y desionizada), 50 μl de 2-metoxifenol (20.1 mM) como contaminante, como se muestra en la **tabla 1**. Se adicionaron 5 μl de POCh (RZ:0.77) en solución con una actividad volumétrica de 7233 unidades por litro (U/L) y 30 μl de H_2O_2 (12.3 mM) como iniciador de la reacción. Se registraron cada cuatro minutos los espectros de absorción UV-VIS en el intervalo de 700 a 230 nm, hasta que en el espectro no se observaron más cambios en la absorbancia de las bandas presentes. Posteriormente, se adicionó una alícuota de 120 μl de H_2O_2 y se procedió a registrar nuevamente los espectros de absorción UV-VIS como se indicó anteriormente. Este procedimiento se repitió hasta que ya no se notaron más modificaciones en el espectro de absorción de la reacción de polimerización.

La formación de los polímeros del derivado fenólico fue observada mediante el registro de las bandas de absorción en el intervalo de 360 a 520 nm. Posteriormente, los polímeros formados en la solución fueron removidos mediante filtración usando un microfiltro de 0.22 mm de diámetro de poro (Gelman). Se calculó el porcentaje de eliminación del contaminante mediante los valores de absorbancia (λ : 274.5 nm) antes y después de la reac-

TABLA I. COMPOSICIÓN DEL AGUA RESIDUAL ARTIFICIALMENTE PREPARADA

Reactivo	Volumen
Amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0	3mL
Contaminante fenólico (20.1 mM)	25 μ L
H ₂ O ₂ (12.3 mM) (como iniciador de la reacción)	300 μ L

ción de polimerización. De manera similar se procedió a calcular el porcentaje de remoción de los polímeros formados a la longitud de onda de 416.5 nm, en que se absorben estos.

Algunas de las condiciones de prueba de la POCh en solución con el sustrato 2-metoxifenol, se adecuaron cuando se usó la POCh-PS/DVB-3G para el estudio de remoción de los contaminantes fenol, 2-metoxifenol y 3-clorofenol. Se utilizaron 10 mg del soporte con la enzima inmovilizada, 25 μ L del contaminante a estudiar y 300 μ L de H₂O₂, para el caso del 3-clorofenol, también se realizaron experimentos empleando 150 μ L de este contaminante y 610 μ L de H₂O₂. Los espectros de absorción UV-VIS se registraron a diferentes intervalos de tiempo hasta que ya no hubo variación en la absorbancia de las bandas presentes. A continuación la enzima inmovilizada se separó del sobrenadante que contiene a los polímeros formados. La POCh-PS/DVB-3G fue lavada con solución de NaCl 2M y amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0, para posteriormente hacerle pruebas de su reutilización. La remoción de los polímeros formados se realizó mediante filtros de 0.22 y 0.40 μ m.

El porcentaje de remoción de los contaminantes se determinó a partir de su espectro de absorción UV-VIS antes y después del proceso de polimerización a longitud de onda de 270, 274.5 y 273.5 nm para fenol, 2-metoxifenol y 3-clorofenol, respectivamente. De manera similar los porcentajes de remoción para los polímeros de los contaminantes analizados se determinaron a las longitudes de onda de 397.5, 416.5 y 273.5 nm para fenol, 2-metoxifenol y 3-clorofenol, respectivamente, antes y después de haber filtrado el sobrenadante.

RESULTADOS

Estimación de los parámetros para la inmovilización de m-Mb

Mediante el uso de la proteína reportera m-Mb y el soporte BBG-P se seleccionó la velocidad de agitación de 210 rpm, 3 h de tiempo de reacción, 30 °C de temperatura, 100 mg de soporte, 800 μ L de la solución de m-Mb con una absorbancia de \sim 1.0 y un reactor de 1mL de volumen, como parámetros iniciales para el proceso de inmovilización de esta proteína en dicho soporte. Con estos y a partir de los espectros de absorción UV-VIS se determinó el 86 % de m-Mb inmovilizada en el soporte

BBG-P (**Fig. 1**), mientras que a partir de la actividad enzimática se determinó el 46 %. La m-Mb inmovilizada después de haber sido lavada con NaCl 2M, presentó actividad peroxidasa en el ensayo de hemoglobinas (**Fig. 2**).

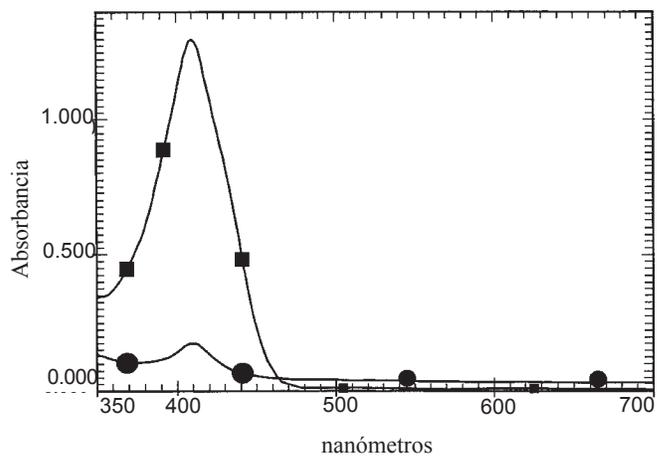


Fig. 1. Espectros UV-VIS de m-Mb para la determinación del porcentaje de inmovilización en el soporte BBG-P. (■) Solución de partida ($A_{409\text{nm}}$: 1.35) y (●) Sobrenadante después del proceso de inmovilización ($A_{409\text{nm}}$: 0.18). El porcentaje de inmovilización calculado mediante este método fue de 86 %.

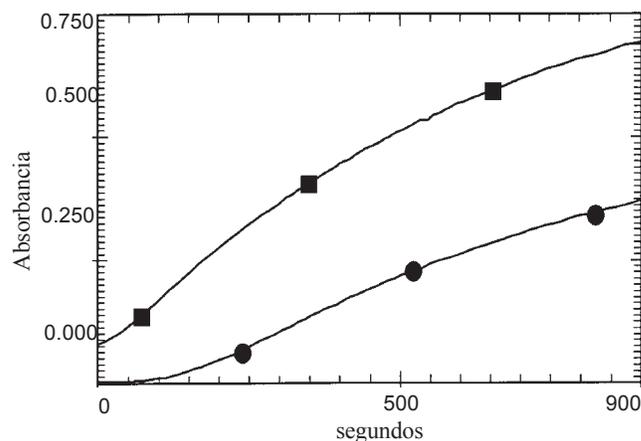


Fig. 2. Cinética de m-Mb inmovilizada para determinar su actividad enzimática en el soporte BBG-P. (■) Solución de partida (actividad volumétrica: 2259.54 U/L) y (●) Sobrenadante después del proceso de inmovilización (actividad volumétrica: 99.97 U/L). La longitud de onda utilizada fue 470 nm. El porcentaje de inmovilización calculado mediante este método fue de 46 %.

Inmovilización de una peroxidasa patrón y la peroxidasa de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw)

Se determinaron porcentajes de inmovilización del 12.60 % y 2.73 % para HRP y POCh en el soporte BBG-P, respectivamente.

El soporte PS/DVB-3G sin activar y activado resultó negativo a las pruebas de actividad para peroxidasas. En este soporte se obtuvo 64.16 % de inmovilización para HRP y ~100 % para POCh (Fig. 3), sin perder su actividad enzimática. La figura 4, muestra la actividad

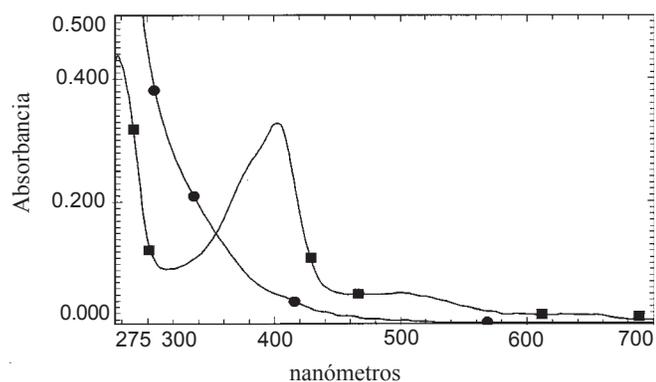


Fig. 3. Espectros de absorción UV-VIS de la peroxidasa de chayote para determinar el porcentaje de inmovilización en PS/DVB-3G a 30 °C, 210 rpm y 3 h de reacción. (■) Solución de partida ($A_{403\text{nm}}$: 0.330, diluida de 1:1) y (●) Sobrenadante después del proceso de inmovilización ($A_{403\text{nm}}$: ya no se observa la banda de absorción).

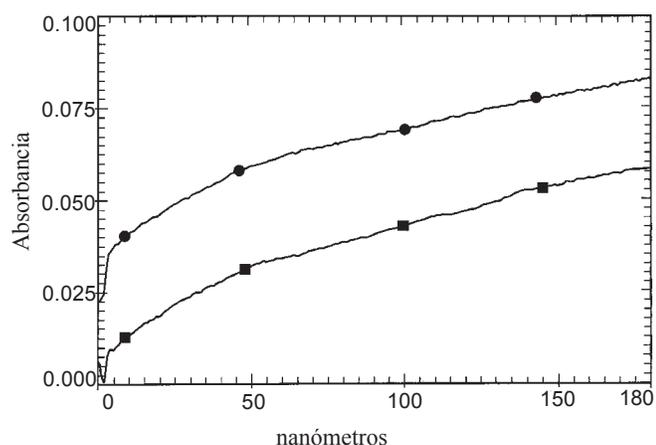


Fig. 4. Cinética de la POCh inmovilizada para determinar su actividad enzimática en el soporte PS/DVB-3G. (■) de 0 a 180 s y (●) de 181 a 360 s. La longitud de onda utilizada fue 436 nm.

enzimática de la POCh después de su inmovilización. La cantidad de POCh-PS/DVB-3G utilizada para realizar el ensayo de actividad peroxidasa fue de 10 mg y como sustrato se usaron 30 μl del contaminante 2-metoxifenol.

Pruebas de remoción de los contaminante fenólicos mediante la POCh-PS/DVB-3G

La composición del agua residual artificialmente preparada para los estudios de remoción de los contaminantes fenólicos se muestra en la tabla I. Las figuras 5, 6 y 7, indican los espectros de absorción UV-VIS de la formación de polímeros de los contaminantes fenol, 2-metoxifenol y 3-clorofenol, respectivamente, a diferentes tiempos de reacción usando a la POCh-PS/DVB-3G. La figura 8, muestra los espectros de absorción UV-VIS de la remoción del contaminante fenol antes y después de haber sido tratada con la POCh-PS/DVB-3G. La tabla II, presenta los datos de los porcentajes de re-

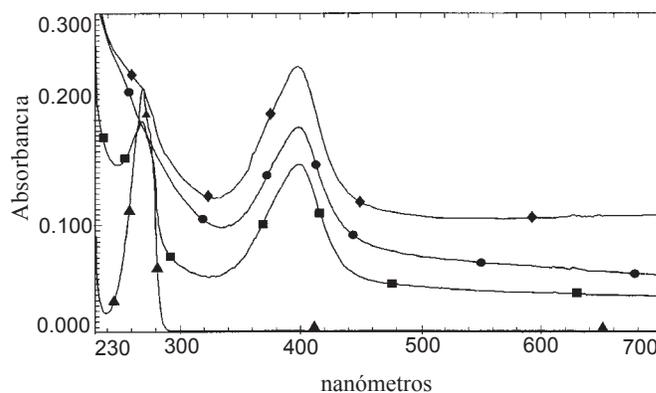


Fig. 5. Espectros de absorción UV-VIS de la formación de polímeros del contaminante fenol con respecto al tiempo, mediante el uso de la POCh-PS/DVB-3G. (▲) 0 min, (■) 5 min, (◻) 10 min y (●) 25 min.

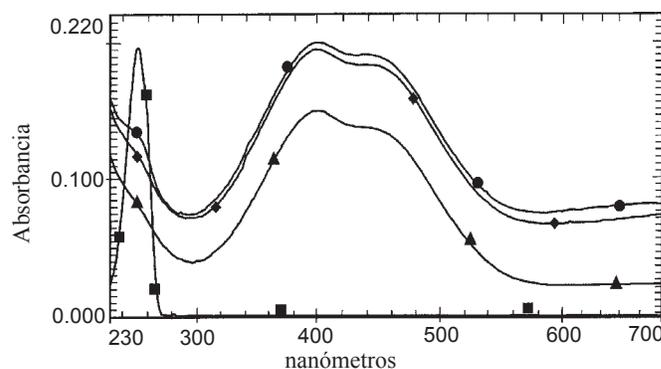


Fig. 6. Espectros de absorción UV-VIS de la formación de los polímeros del contaminante 2-metoxifenol con respecto al tiempo, mediante el uso de la POCh-PS/DVB-3G. (■) 0 min, (●) 5 min, (◻) 10 min y (▲) 25 min.

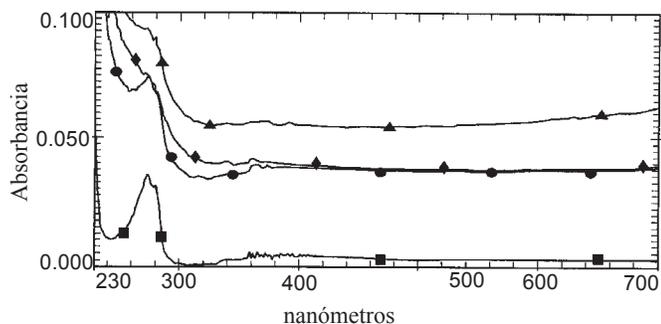


Fig. 7. Espectros de absorción UV-VIS de la formación de los polímeros del contaminante 3-clorofenol con respecto al tiempo, mediante el uso de la POCh-PS/DVB-3G (■) 0 min, (●) 5 min, (▲) 15 min y (✚) 25 min. No se observó la aparición de nuevas nuevas bandas en la región visible, pero sí un cambio con respecto al espectro inicial.

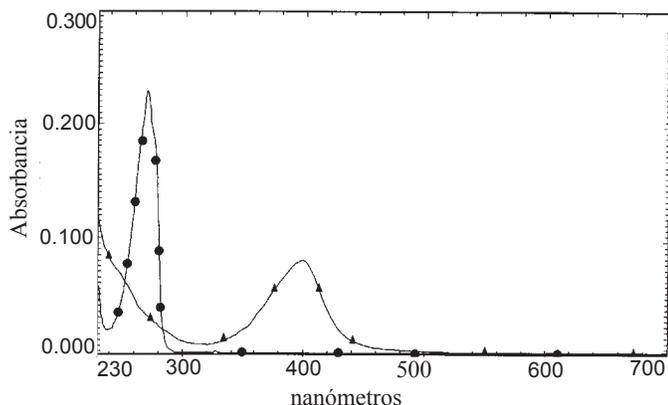


Fig. 8. Espectros de absorción UV-VIS del agua artificialmente contaminada con fenol. Antes (●) y después (✚) de haber sido tratada con la POCh-1PS/DVB-3G y filtrada (después de 15 min de concluido el experimento de polimerización).

moción de los contaminantes estudiados y la **tabla III** muestra los porcentajes de remoción mediante filtración de los polímeros obtenidos, además, en esta tabla se indican los tiempos en que fueron registrados los espectros de la formación máxima de dichos polímeros.

DISCUSIÓN

El soporte comercial BBG-P utilizado fue elegido debido a que contiene grupos funcionales aldehído que pueden unirse directamente a la enzima que se desea inmovilizar. Los parámetros determinados con este soporte y la proteína reportera, permitieron obtener un porcentaje alto de inmovilización de la misma. Sin embargo, debido a los bajos porcentajes de inmovilización encontrados para la HRP y la POCh, se decidió descartar dicho soporte y se continuó con el soporte desarrollado en nuestro laboratorio (PS/DVB-3G).

La metodología implementada para la inmovilización de m-Mb fue transferida al nuevo soporte con la finalidad de probar si ésta permitía obtener buenos resultados en la inmovilización de HRP y POCh, además de ahorrar tiempo y disminuir los costos de la investigación.

El soporte PS/DVB utilizado como matriz orgánica se funcionalizó con el péptido glicilglicilglicina con la finalidad de tener un “espaciador” o “brazo” que le permita a la enzima unirse al soporte (ya que sin éste, el soporte sería inerte a la unión con cualquier enzima o proteína), además, de no estar tan cerca de la superficie del mismo y tratar de impedir que el espacio a su alrededor después de su inmovilización afecte sus propiedades catalíticas. Así, el PS/DVB-3G posee un grupo carboxilo terminal, que después de haber sido tratado con CDI queda activado debido a la formación de un grupo carbamato-imidazolil que puede reaccionar con los grupos amino de la enzima y permitir su inmovilización a través de la formación de un enlace peptídico.

TABLA II. PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE CONTAMINANTES FENÓLICOS MEDIANTE EL USO DE LA POCh-PS/DVB-3G

Contaminante	Absorbancia		Porcentaje
Fenol (λ : 270 nm)	Inicial : 0.229 (absorbancia al tiempo 0 min ó antes de iniciar la reacción)	Final: 0.06 (se filtró después de 15 min de concluida la reacción)	70.0
2-metoxifenol (λ : 274.5 nm)	Inicial: 0.204 (absorbancia al tiempo 0 min ó antes de iniciar la reacción)	Final: 0.043 (se filtró después de 15 min de concluida la reacción)	78.92
3-clorofenol* (λ : 273.5 nm)	Inicial: 1.140 (absorbancia al tiempo 0 min ó antes de iniciar la reacción)	Final: 0.222 (se filtró después de 15 min de concluida la reacción)	80.52

* se usaron 150 μ L del sustrato y 610 μ L de H_2O_2 (como iniciador de la reacción)

TABLA III. PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE LOS POLÍMEROS DE LOS CONTAMINANTES FENÓLICOS MEDIANTE FILTRACIÓN.

Contaminante	Absorbancia		Porcentaje
Fenol (λ : 397.5 nm)	Inicial : 0.250 (tiempo de reacción para la formación máxima de los polímeros: 10.0 in)	Final: 0.081 (se filtró después de 15 min de concluida la reacción)	67.60
2-metoxifenol (λ : 416.5 nm)	Inicial: 0.204 (tiempo de reacción para la formación máxima de los polímeros: 5.0 min)	Final: 0.043 (se filtró después de 15 min de concluida la reacción)	68.92
3-clorofenol (λ : N.D.)	Inicial: N.D. (tiempo de reacción: 20 min)	Final: N.D.	N.D.

N.D.: no determinada

La proteína reportera seleccionada fue de fácil obtención y purificación, además, el costo de obtención fue relativamente bajo. La selección de esta proteína reportera de masa molecular pequeña (16,980 daltones) se hizo con la finalidad de que este parámetro no influyera significativamente en su inmovilización, ya que una proteína de mayor masa pudiera tener problemas para interactuar con el espaciador triglicina añadido al soporte. Por otro lado, el espectro electrónico de absorción UV-VIS similar al de una peroxidasa permitió monitorear los diferentes experimentos realizados mediante esta herramienta espectroscópica tan útil y accesible para muchos laboratorios industriales.

Mediante el uso de la proteína reportera (m-Mb) se realizaron experimentos por triplicado suficientes para la estimación de los parámetros de inicio de la inmovilización de la POCh en el soporte PS/DVB-3G, además, el costo de estos fue más bajo que si se hubiera tenido que emplear la enzima patrón o la POCh en la búsqueda de las condiciones adecuadas para su inmovilización.

La cantidad de PS/DVB-3G utilizada para la inmovilización así como el volumen de la solución de la proteína reportera fueron pequeños pero suficientes para realizar posteriormente las pruebas de actividad peroxidante. La inmovilización de la m-Mb en el soporte no afectó sustancialmente dicha actividad.

Las pruebas de actividad peroxidasa realizadas al PS/DVB-3G sin activar y activado resultaron negativas, lo que garantizó que no interfiriera éste en el ensayo de actividad de la enzima inmovilizada.

Las condiciones utilizadas en la inmovilización de m-Mb y el grado de pureza de la POCh a inmovilizar fueron adecuadas para lograr el alto porcentaje de inmovilización de la peroxidasa de chayote. Los porcentajes de inmovilización de la POCh en el soporte seleccionado son muy similares a los reportados en la literatura para el caso de la peroxidasa patrón (Schewale y Naik 1991,

Peralta-Zamora *et al.* 1997). Es importante mencionar que la actividad de la POCh inmovilizada no fue afectada significativamente.

La composición del agua residual artificialmente preparada para demostrar la actividad de la peroxidasa inmovilizada, así como para los estudios de remoción de los contaminantes fenólicos, permitió registrar los experimentos mediante espectroscopía UV-VIS utilizando pequeñas cantidades tanto de la enzima en solución como de la POCh-PS/DVB-3G.

El monitoreo de los experimentos mediante la obtención de los espectros de absorción electrónica mostró claramente las modificaciones que sufrió el espectro inicial del contaminante analizado y la formación de los polímeros de los contaminantes fenol y 2-metoxifenol en dependencia del tiempo. Para el caso del contaminante 3-clorofenol, cuando se usaron 25 μ L de éste, los espectros no permitieron examinar la presencia de las bandas debido a la formación de los polímeros, pero sí se evidenció un cambio en la forma de su espectro original durante la reacción de polimerización. Con la finalidad de observar las bandas de los polímeros, se incrementó la cantidad del sustrato a 150 μ L, y aunque tampoco pudieron ser advertidas, se determinó la cantidad de sustrato removido.

El tiempo de polimerización para el 2-metoxifenol fue el más bajo (5 min), mientras que para el fenol fue el doble y para el 3-clorofenol fue cuatro veces mayor. Los porcentajes de eliminación de los contaminantes estudiados se encuentran en el mismo intervalo de los reportados en la literatura utilizando a la peroxidasa de rábano picante (HRP) u otras peroxidases, tanto inmovilizadas como sin inmovilizar (Maloney *et al.* 1984, Al/Kassim *et al.* 1994, Arseguel y Baboulene 1994, Bodzek *et al.* 1994, Ruckenstein y Wang 1994, Wada *et al.* 1995, Peralta-Zamora *et al.* 1997, Kinsley y Nicell 2000, Masuda *et al.* 2001, Singh y Singh 2002, Villalobos y Buchanan 2002, Villegas-Rosas *et al.* 2002, Wagner y Nicell 2002).

Los porcentajes de remoción de los polímeros formados para los contaminantes fenol y 2-metoxifenol son semejantes, pero para el caso del 3-clorofenol no pudo ser determinado a pesar de haber incrementado su concentración en la mezcla de reacción, por lo que es importante continuar el estudio de este contaminante.

Por otro lado, es de mencionarse que los métodos comunes para la remoción de este tipo de contaminantes fenólicos como degradación microbiana, adsorción sobre carbón activado, oxidación química (usando agentes tales como ozono, peróxido de hidrógeno o dióxido de cloro), métodos de incineración, extracción por disolventes e irradiación, que aunque efectivos, presentan desventajas como son costos altos, remoción incompleta, formación de subproductos peligrosos y su aplicación en intervalos limitados de concentración (Klibanov *et al.* 1983, Chang *et al.* 1995, Miland *et al.* 1996). Por otro lado, la capacidad de las peroxidasas de remover fenoles aún a concentraciones muy bajas y en amplios intervalos de pH (Klibanov *et al.* 1983, Nicell *et al.* 1993, Wagner y Nicell 2002), indica que podrían ser aplicadas en métodos secundarios y/o terciarios para el tratamiento de aguas residuales y reducir la concentración de este tipo de compuestos hasta valores no mayores a 0.001 mg/L en aguas potables (Norma Oficial Mexicana 1994).

CONCLUSIONES

La actividad enzimática de la peroxidasa de chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw] fue preservada durante su inmovilización en el soporte orgánico poliestireno-divinilbenceno funcionalizado para este fin. Los sustratos fenol y 2-metoxifenol fueron polimerizados por la enzima inmovilizada con altos porcentajes de remoción, abriendo así un amplio campo para ser probada con otros contaminantes similares y peligrosos para el ambiente.

El soporte comercial Bakerbond Glutaraldehído-P no resultó adecuado para la inmovilización de las peroxidasas y fue descartado para el estudio subsecuente de descontaminación con peroxidasas inmovilizadas. Por otro lado, el soporte PS/DVB-3G resultó adecuado para el estudio aquí reportado y se revela como un soporte de gran utilidad en procesos de inmovilización de proteínas.

El fruto de chayote es un producto de origen mesoamericano de bajo costo desafortunadamente subutilizado (Lira-Saade 1996), tiene gran potencial para la obtención de peroxidasas y éstas ya inmovilizadas son excelentes candidatas para su uso como método para la descontaminación de aguas residuales con contaminantes de tipo fenólico. El reuso de estas aguas después de su descontaminación es factible utilizando la metodología descrita, por lo que actualmente se hacen esfuerzos para optimizar y aplicar ésta a aguas residuales reales y posteriormente escalar dicho proceso.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sistema de Investigación Regional Ignacio Zaragoza del CONACyT por el financiamiento del proyecto denominado "Uso de la peroxidasa de chayote inmovilizada en el tratamiento de aguas contaminadas con fenoles" (clave: 970602002). Al Posgrado en Ciencias Ambientales y al Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el financiamiento otorgado a este proyecto. A los alumnos Delfino Méndez Hernández de la Universidad de Autónoma de Tlaxcala, Nadia Silvestry Rodríguez de la Universidad de Occidente, Campus Los Mochis y Alejandro Isaías Alonso Calderón, del Instituto Tecnológico de Puebla, por su apoyo.

REFERENCIAS

- Al/Kassim L., Taylor K. E. J., Nicell J. A., Bewtra K. K. y Biswas N. (1994). Enzymatic removal of selected aromatic contaminants from wastewater by a fungal peroxidase from *Coprinus macrorhizus* in batch reactors. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 61, 179-182.
- Arseguel D. y Baboulene M. (1994). Removal of phenol from coupling of talc and peroxidase: application for depollution of waste water containing phenolic compounds. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 61, 331-335.
- Buikerma J. A. L., McGinniss M. J. y Cairns. (1979). Phenolics in aquatic ecosystems: a selected review of recent literature. *J. Mar. Environ. Res.* 2, 87-181.
- Bylka S. A. y Andersson L. A. (1997). Microburger biochemistry: extraction and spectral characterization of myoglobin from hamburger. *J. Chem. Ed.* 74, 426-430.
- Bodzek M., Bohdziewicz J. y Kowalska M. (1994). Preparation of membrane-immobilized enzymes for phenol decomposition. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 61, 231-239.
- Chang C. J., Li S-S y Ko C-M. (1995). Catalytic wet oxidations of phenol- and p-chlorophenol-contaminated waters. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 64, 245-252.
- Everse J., Johnson M. C. y Marini M. A. (1994). Peroxidative activities of hemoglobins and hemoglobin derivatives. *Meth. in Enzymol.* 231, 547-573.
- Gómez-Cárdenas B. M., Álvarez M. G. M., Rosas B. M. Y. y González V. E. (2001). Ligantes polidentados inmovilizados en copolímeros de poliestireno-divinilbenceno: síntesis, caracterización y captación de metales pesados. *IDEAS.* 17, 10-12.
- González-Vergara E. (2001). Síntesis y caracterización de metalobiositios enlazados a e-lisina poliestireno-divinilbenceno y su aplicación en el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados. Libro SIZA-CONACyT 2001. <http://www.conacyt.mx/dadcytr/catalogo/elisin.html>
- González-Vergara E. y Vincent J. B. (1996). Immobilization of conalbumin onto polystyrene/divinyl benzene copolymers:

- toward finding the best support for MAMC. *J. Molec. Recogn.* 9, 558-563.
- Kinsley Ch. y Nicell J. A. (2000). Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Biores. Technol.* 73, 139-146.
- Klibanov A. M., Tsu-Man T. y Scott K. P. (1983). Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. *Science* 221, 259-61.
- Lira-Saade R. (1996). Chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw]. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Masuda M., Sakura A. y Sakakibara M. (2001). Effect of reaction conditions on phenol removal by polymerization and precipitation using *Coprinus cinereus* peroxidase. *Enzyme Microbial Technol.* 28, 295-300.
- Maloney S. W., Manem J., Mallevalle J. y Fiessinger F. (1984). The potential use of enzymes for removal of aromatic compounds from water. *Wat. Sci. Tech.* 17, 273-278.
- Miland E., Smyth M. R. y Ó Fágáin C. (1996). Phenol removal by modified peroxidases. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 67, 227-236.
- Nicell J. A., Bewtra J. K., Biswas N., St. Pierre C. C. y Taylor K. E. (1993). Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from aqueous solution. *Can. J. Civ. Eng.* 20, 725-735.
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1 (1994). Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Peralta-Zamora P., Esposito E., Pelegrini R., Groto R., Reyes J. E. y Durán N. (1997). Remediação de efluentes da indústria papeleira por peroxidases imobilizadas em diversos suportes. *An. Reun. Nac. Microbiol. Apl.* 113-120.
- Pütter J. (1974). Peroxidases. En: *Methods of enzymatic analysis*. (H.U. Bergmeyer, Ed.). Academic Press, Nueva York, 2a. Ed., pp. 301-315.
- Ruckenstein E. y Wang X-B. (1994). Production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on porous poly(styrene-divinylbenzene) carrier and its application to the degrading of 2-chlorophenol. *Biotechnol. Bioengineer.* 44, 79-86.
- Shewale J. G. y Naik S. R. (1991). Immobilized enzymes-applications. *J. Sci. Industr. Res.* 50, 947-958.
- Singh N. y Singh J. (2002). An enzymatic method for removal of phenol from industrial effluent. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 32, 127-133.
- Villalobos D. A. y Buchanan I. D. (2002). Removal of aqueous phenol by *Arthromyces ramosus* peroxidase. *J. Environ. Eng. Sci.* 1, 65-73.
- Villegas-Rosas M. L. O. (1993). Aislamiento, purificación y caracterización mediante espectroscopia ultravioleta-visible de las isoenzimas de la peroxidasa de chayote (*Sechium edule* Sw). Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Villegas-Rosas M. L. O., González V. E., Silvestry R. N. y Alonso C. A. (1999). Obtención y estudio preliminar de la inmovilización de la peroxidasa de chayote y su potencial aplicación en el tratamiento de aguas contaminadas. IV Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma del Estado de México, Academia Nacional de Ciencias Ambientales, p. 37.
- Villegas-Rosas M. L. O., Geissler G., Handall-Silva A. y González-Vergara E. (2002). Isolation, partial purification and immobilization of peroxidases from chayote (*Sechium edule* Sw) and their potential application in the removal of phenolic compounds from waste waters. *Memorias del VI International Plant Peroxidases Symposium*, 3-7 July, p. 146.
- Wada S., Ichikawa H. y Tatsumi K. (1995). Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant. *Biotechnol. Bioengineer.* 45, 304-309.
- Wagner M. y Nicell J. A. (2002). Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.* 36, 4041-4052.
- Wolkoff A. W. y Larose R. H. (1974). A highly sensitive technique for the liquid chromatographic analysis of phenols and other environmental pollutants. *J. Chromatogr.* 99, 731-43.