

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



**DISEÑO DE UN BIORREACTOR MULTIENZIMÁTICO PARA LA  
OXIDACIÓN DE COLORANTES TIPO AZO  
TESIS**

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

**DARÍO JACZAEI CRUZ RÍOS**

DIRECTORES:

Dr. SERGIO ANDRÉS ÁGUILA PUENTES

Dr. JORGE OCTAVIO MATA RAMÍREZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. MAYO DE 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

DISEÑO DE UN BIORREACTOR MULTIENZIMÁTICO PARA LA OXIDACIÓN DE  
COLORANTES TIPO AZO

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**DARIO JACZAEI CRUZ RIOS**

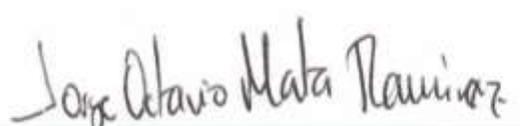
Aprobada por:



---

Dr. Sergio A. Aguila Puentes

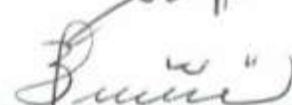
Director



---

Dr. Jorge O. Mata Ramirez

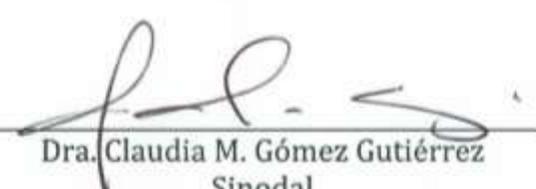
Codirector



---

Dra. Eunice Vargas Viveros

Sinodal



---

Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez

Sinodal



---

Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez

Sinodal

## RESUMEN

Los colorantes azo representan un grave problema medioambiental debido a que sus colores intensos afectan los procesos de oxigenación de sistemas acuáticos y aunque no son potencialmente tóxicos, al ser degradados anaerobiamente por microorganismos, se forman aminas aromáticas que son potencialmente carcinogénicas.

En esta tesis se ha explorado el uso de sistemas multienzimáticos conformados por las enzimas oxidorreductasas (i) lacasa de *Coriolopsis gallica* y (ii) cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* y los respectivos parámetros en el diseño de un biorreactor multienzimático conformado por estas enzimas.

El efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad catalítica de la enzima lacasa fue estudiado mediante cinéticas enzimáticas con siringaldazina, obteniendo que el peróxido de hidrógeno inhibe de forma competitiva a la enzima y produce un periodo de retardo en la actividad catalítica de la enzima lacasa.

El efecto del pH sobre el sistema multienzimático fue estudiado a diferentes valores comprendidos entre 3 y 10 utilizando el colorante multiazo negro directo 22 como modelo de estudio. Los resultados mostraron que los sistemas multienzimáticos ordenados de manera secuencial lacasa-cpo presentan mayor grado de degradación alcanzando porcentajes superiores a 50% a pH 5.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo, desarrollado en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) ha sido financiado por el proyecto PAPIIT IB200613.

Han sido muchas personas que, directa o indirectamente, han participado en este trabajo, y a las cuales me gustaría agradecer:

A mis padres Luvia y Rolando por su cariño y apoyo incondicional.

A Jhair por su ayuda y paciencia durante todos estos años.

A Gemma por elegir ser mi compañera en la vida.

Al Dr. Sergio Águila, director de este trabajo, por depositar su confianza en mi formación como futuro ingeniero.

Al grupo de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN, UNAM).

A mis compañeros de laboratorio por sus consejos y enseñanzas.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes.....	5
1. Colorantes.....	5
1.1 Colorantes tipo Azo.....	6
1.2 Degradación de colorantes tipo azo.....	7
1.2.1 Tratamientos fisicoquímicos.....	7
1.2.1.1 <i>Coagulación-Precipitación</i> .....	7
1.2.1.2 <i>Métodos químicos</i> .....	8
1.2.1.3 <i>Métodos físicos</i> .....	8
1.2.2 Tratamientos biológicos.....	9
2. Nanobiotecnología.....	10
3. Enzimas.....	14
3.1 Lacasa.....	14
3.2 Cloroperoxidasa.....	18
4. Sistemas multienzimáticos.....	21
5. Reactores.....	23
5.1 Reactor de lecho empaquetado.....	23
5.1.1 Ecuaciones de diseño.....	24
Hipótesis.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos particulares.....	27
METODOLOGÍA.....	28
1. Materiales.....	28
1.1 Enzimas.....	28
1.2 Soportes nanoestructurados.....	28
1.3 Reactivos.....	29
2. Métodos.....	30
2.1 Ensayos generales.....	30
2.1.1 Ensayos de actividad enzimática.....	30
A. Lacasa.....	30
B. Cloroperoxidasa.....	30
2.1.2 Cuantificación de proteína.....	31
2.2. Inmovilización enzimática en soportes nanoestructurados.....	31
2.2.1 Inmovilización en MSU-F y AL-MSUF.....	32
2.2.2 Inmovilización covalente en nanotubos de carbono (MWCNT).....	32
2.2.3 Inmovilización en Mordenita mesoporosa.....	33
2.3. Caracterización operacional de la enzimas libres e inmovilizadas.....	34
2.3.1 Efecto del pH.....	34
2.3.2 Efecto del peróxido de hidrógeno.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	36
CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	47

1. CONCLUSIONES..... 47  
2. PROYECCIONES. .... 48  
REFERENCIAS. .... 49

## Lista de Figuras.

<b>Figura 1:</b> Representación esquemática de la inmovilización enzimática en soportes mesoporosos.....	3
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo del sitio activo de la enzima lacasa.....	14
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo de la actividad oxidasa de la lacasa.....	15
<b>Figura 4:</b> Representación esquemática del grupo hemo de la enzima CPO.....	19
<b>Figura 5:</b> Diagrama de reactor de lecho empacado. ....	24
<b>Figura 6:</b> Cambio de la actividad catalítica de la enzima lacasa ante concentraciones de peróxido de hidrógeno de 0 a 10mmol/L. ....	37
<b>Figura 7:</b> A) variación de la velocidad catalítica de la enzima lacasa a 0.028 nmol/ml ante diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno que van de 0 a 10 mmol/L. B) Estabilidad catalítica de lacasa frente a tiempos de incubación con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
<b>Figura 8:</b> Degradación del colorante multiazo negro directo 22 bajo diferentes acomodos del sistema multienzimático lacasa-cloroperoxidasa en valores de pH que varían de 3 a 10. ....	42
<b>Figura 9:</b> Degradación del colorante multiazo negro directo 22 catalizada bajo diferentes valores de pH por las enzimas lacasa y cloroperoxidasa (cpo) inmovilizadas sobre nanotubos de carbono de pared multiple (MWCNT's). ....	46

## Lista de Tablas.

<b>Tabla 1.</b> Características generales de las enzimas Lacasa y Cloroperoxidasa.....	28
<b>Tabla 2.</b> Características generales de los soportes nanoestructurados mesoporosos. ....	29

## INTRODUCCIÓN

Los colorantes azo son la clase más grande y versátil de tintes sintéticos utilizados en la industria textil, farmacéutica, alimentaria y cosmética. Alrededor de medio millón de toneladas de colorantes azo se producen cada año en todo el mundo y representan casi el 50% de todos los colorantes comerciales, y sus efluentes deben ser controlados debido a los problemas ambientales que generan (Rodríguez Couto et al., 2006; Zhang et al., 2012).

Estos tintes se caracterizan por la presencia de uno o más enlaces azo ( $-N=N-$ ) acoplados entre compuestos diazonio, anilina, fenol u otros compuestos aromáticos (Zhang et al., 2012). El principal problema que dificulta la degradación de estos colorantes es que son compuestos altamente estables y por ello son llamados recalcitrantes (Zhang et al., 2012).

Actualmente existen muchos procesos inorgánicos que tratan de degradar en su totalidad este tipo de compuestos a través de técnicas de oxidación avanzada, las cuales emplean catalizadores inorgánicos o reactivos químicos. La oxidación se define como la transferencia de uno o más electrones desde un donador (reductor) hacia un aceptor (oxidante), el cual tiene una alta afinidad electrónica. Los procesos de oxidación avanzada envuelven dos etapas de oxidación, en la primera se forman oxidantes fuertes (por ejemplo radicales hidroxilo) y en la segunda etapa estos oxidantes reaccionan con los contaminantes orgánicos presentes en el agua (Kommineni & Zoeckler, 2000).

Otro enfoque de degradación de estos contaminantes es a través de elementos biológicos o partes de ellos, como las enzimas. Las enzimas son macromoléculas de carácter proteico y su función es catalizar ciertas reacciones químicas dentro o fuera de un organismo vivo. Esta especificidad hacia un sustrato o grupo de sustratos particulares, su versatilidad, fácil obtención, y el hecho de que sus productos no son dañinos han hecho que las enzimas sean una opción considerable en el tratamiento de compuestos contaminantes (Peralta-Zamora et al., 2003).

A pesar de todo de lo anterior en ocasiones un solo tipo de enzima no es capaz de oxidar en su totalidad el contaminante o tiene un estrecho grupo de contaminantes a los cuales logra oxidar. Como una solución a esto se han planteado sistemas bienzimáticos o multienzimáticos, en donde dos o más enzimas realizan ya sea en forma serial o simultánea la oxidación de un mismo compuesto contaminante (Rao et al., 2014).

A pesar que las enzimas son excelentes catalizadores, son sensibles ante ciertos factores como la temperatura, el pH, solvente; o condiciones extremas que pueden provocar la pérdida de la estructura funcional de la enzima (Lei et al., 2004). Esto limita mucho el uso de las enzimas a condiciones diferentes a las que regularmente se encontrarían en la célula. Una de las soluciones a este problema es el confinamiento de las enzimas a una región espacial de un cierto material, conocido como inmovilización, tal como se muestra en la Figura 1. Dicha inmovilización mejora la respuesta de las enzimas a condiciones extremas de pH, temperatura y solvente.

Entre los materiales más novedosos para ser utilizados en el proceso de inmovilización enzimática destacan los materiales mesoporosos, debido al tamaño y forma ajustable de sus poros, gran área superficial, volumen del poro y propiedades intrínsecas del material (Takahashi et al., 2001).

La Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) recomienda definir las muestras con un tamaño de poro principal menor a 2 nm como microporoso, entre 2 y 50 nm como mesoporoso y mayor a 50 nm como macroporoso (A. D. McNaught & A. Wilkinson, 1997).



**Figura 1:** Representación esquemática de la inmovilización enzimática en soportes mesoporosos. Las enzimas se encuentran restringidas espacialmente dentro de los poros del material.

Entre los factores importantes que influyen en la inmovilización enzimática destacan la relación entre el tamaño del poro y de la enzima. El tamaño del poro debe ser lo suficientemente grande para albergar cómodamente a la enzima (Lei et al., 2004). Otro factor importante que influye en la inmovilización depende de las características de la superficie de los materiales mesoporosos y las enzimas

(Lei et al., 2004). Las cargas superficiales de los materiales mesoporosos y las enzimas deben ser complementarias, ya que regularmente la interacción electrostática entre la enzima y el material mesoporoso es un factor que influencia en el proceso de adsorción y desorción (Lei et al., 2004). Algunos autores han concluido que ciertos factores como el pH y la fuerza iónica de la solución de la enzima pueden influir en las propiedades de su superficie (Águila et al., 2011). Algunos de los materiales más empleados como soportes en la inmovilización enzimática son los silicatos mesoporosos, debido a que grupos silanoles han sido reconocidos ya anteriormente como fuertes fijadores de enzimas (Takahashi et al., 2001).

En este trabajo se exploró la degradación del colorante multiazó negro directo 22 utilizando las enzimas lacasa del hongo *Coriolopsis gallica* y cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* inmovilizadas sobre soportes nanoestructurados dispuestas en un sistema biorreactor multienzimático como una novedosa alternativa para la biorremediación de los colorantes multiazó.

## **Antecedentes**

### **1. Colorantes**

La industria textil es uno de los principales generadores de residuos contaminantes que se vierten al agua. Este tipo de industrias utilizan una gran variedad de sustancias químicas que al añadirse a sus procesos húmedos generan efluentes muy diversos que varían dependiendo del tipo de fibra y o proceso (Piña Mondragon, 2007).

La industria de colorantes está relacionada con la industria textil de manera que un incremento en la producción de fibras requerirá mayor producción de colorantes, no necesariamente en la misma proporción. Se estima que existen alrededor de 100,000 colorantes distintos, y se producen al año unas 700,000 toneladas en todo el mundo (Couto, 2007; López et al., 2007; Piña Mondragon, 2007).

La presencia de los colorantes en los residuos textiles se debe a que principalmente en el proceso de teñido, el colorante no se fija completamente a las fibras, la cantidad de colorante que no se fija a la tela varía entre el 12 y el 30 % dependiendo del tipo de colorante. El colorante residual es difícil de tratar por métodos convencionales y algunos podrían presentar cierta toxicidad y un problema si son desechados en ecosistemas acuáticos, ya que debido a sus colores intensos, pueden interferir en procesos como la fotosíntesis (Piña Mondragon, 2007).

En México, la industria textil consume grandes volúmenes de agua en sus procesos de teñido de las fibras y telas. En 2003 los cerca de 2,500 establecimientos textiles existentes generaron 0.7 m<sup>3</sup>/s de aguas contaminadas (Piña Mondragon, 2007).

Los colorantes se clasifican de acuerdo a su aplicación y estructura química. Estos están compuestos de un grupo funcional responsable del color llamado cromóforo, así como un aceptor de electrones o sustituyentes donantes que causan o intensifican el color del cromóforo, llamados auxocromos (dos Santos et al., 2007).

### **1.1 Colorantes tipo Azo.**

Alrededor del 70% de los colorantes que se producen a nivel mundial son azo. Este grupo de colorantes se caracteriza por un grupo funcional (-N=N-) y por tener grupos reactivos que forman enlaces covalentes con OH-, NH-, SH-, presentes en las fibras (algodón, lana, seda, nylon, etc.). Este tipo de colorantes se utiliza principalmente para amarillo, naranja y rojo, y se pueden realizar mezclas de colorantes para obtener nuevas tonalidades, no necesariamente deben tener la misma estructura. En la clase de colorantes azo destacan 3 familias, los monoazo, diazo y triazo, cada una de ellas con propiedades distintas, debido a esto es posible encontrar los colorantes azo: ácidos, básicos reactivos, directos y dispersos, siendo los monoazo dispersos los de mayor aplicación debido a que pueden colorear fibras sintéticas como nylon, poliéster, acetato y acrílico (Couto, 2007; Zhang et al., 2012).

## **1.2 Degradación de colorantes tipo azo.**

### 1.2.1 Tratamientos fisicoquímicos.

Los tratamientos fisicoquímicos empleados a nivel industrial en el tratamiento de efluentes textiles incluyen principalmente la coagulación-precipitación, métodos químicos y métodos físicos. El uso de estos métodos está limitado por el costo y el daño ambiental que generan (López et al., 2007).

#### *1.2.1.1 Coagulación-Precipitación.*

Uno de los principales métodos físicos es la coagulación-precipitación y consta de celdas electroquímicas o compuestos como sales férricas y policloruro de aluminio las cuales al interactuar con los efluentes generan especies coagulantes que absorben y hacen precipitar los contaminantes. La eficiencia de este método alcanza el 90% de eliminación para colorantes azufrados y dispersos, mientras que para los colorantes ácidos, directos, reactivos y colorantes de tina o cuba se obtienen muy bajos porcentajes de efectividad debido a su poca capacidad de coagulación. Este tipo de tratamiento exige grandes entradas de compuestos químicos y producen grandes cantidades de lodos contaminados que posteriormente necesitan ser tratados (dos Santos et al., 2007; Piña Mondragon, 2007).

### *1.2.1.2 Métodos químicos.*

Entre los principales métodos químicos para la degradación de colorantes azo destacan los que implican el uso de un agente oxidante como ozono ( $O_3$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y permanganato ( $MnO_4^-$ ) para cambiar la composición química de los contaminantes colorantes. El ozono es de los más utilizados debido a su alta reactividad con un gran número de colorantes y elevados porcentajes de degradación. Sin embargo, para los colorantes dispersos y los insolubles en agua los porcentajes de degradación son muy bajos y el costo del ozono es muy elevado (dos Santos et al., 2007).

Los procesos de oxidación avanzada surgen debido a la baja eficiencia de los métodos químicos habituales. En estos procesos los agentes oxidantes como el  $O_3$  y  $H_2O_2$  son utilizados con catalizadores como Fe, Mn y  $TiO_2$ , puede ser en presencia o en ausencia de una fuente de radiación usualmente ultravioleta. Consecuentemente, se obtiene una mejora en la generación y uso del radical hidroxilo ( $OH^-$ ), esto puede representar un aumento de varios órdenes de magnitud en comparación a los métodos oxidantes normales en ausencia de catalizador (dos Santos et al., 2007).

### *1.2.1.3 Métodos físicos.*

En este tipo de métodos, comúnmente se utilizan la ultrafiltración o nanofiltración y ósmosis inversa para reutilizar el agua y recuperar componentes químicos. En la industria textil estos métodos pueden alcanzar un 96% de efectividad. El tipo y la porosidad del filtro dependerá de la composición química y la temperatura

específica de los efluentes. Los principales inconvenientes de estos métodos son los elevados costos de inversión, el potencial de ensuciamiento de la membrana (dos Santos et al., 2007).

### *1.2.2 Tratamientos biológicos.*

Algunos compuestos aromáticos son susceptibles a ser degradados por agentes biológicos bajo condiciones aerobias o anaerobias y debido a las desventajas que presentan los tratamientos fisicoquímicos se ha generado un gran interés por este tipo de procesos biológicos para la remoción de colorantes azo, estos procesos principalmente se clasifican dependiendo de las condiciones de oxígeno en aerobios y anaerobios.

El tratamiento aerobio de los efluentes textiles no retira considerablemente el color causado debido a los colorantes azo. Aunque los colorantes azoicos son compuestos aromáticos, sus sustituyentes contienen principalmente grupos azufrados y nitro los cuales son muy resistentes a la degradación bacteriana aeróbica, esto se asocia a la naturaleza de aceptor de electrones del enlace azo y su resistencia al ataque de las oxidasas, o debido a que el oxígeno es mejor aceptor de electrones y tiene mayor preferencia para reducir equivalentes que el colorante azo (dos Santos et al., 2007).

La reducción anaerobia comprende varios mecanismos, una forma de distinguirlos es entre reducción enzimática directa y reducción indirecta catalizada por mediadores redox.

La reducción enzimática directa se presenta cuando enzimas especializadas llamadas azorreductasas catalizan la oxidación de los sustratos orgánicos de los colorantes azo. Mientras que en la reducción indirecta mediada, los colorantes azoicos son reducidos por donadores de electrones los cuales pueden reducir directamente los colorantes dentro de una reacción no específica (Piña Mondragon, 2007).

## **2. Nanobiotecnología.**

Desde los años 90's, con el descubrimiento de los nanotubos de carbono, la nanotecnología comenzó a progresar y a esto fue seguido el rápido crecimiento de la nanobiotecnología, en donde el conocimiento y las herramientas tecnológicas a escala nanométrica pueden impulsar la calidad y el crecimiento de las aplicaciones científicas a problemas farmacéuticos, biológicos, medioambientales y médicos (Domínguez, 2009).

En sus inicios la nanotecnología y la biotecnología fueron unidas sin generar algún beneficio de esta unión. Al pasar los años las interacciones entre estas dos tecnologías han dado lugar a grandes avances, entre los cuales destaca la nanobiotocatálisis, en la cual las enzimas son incorporadas en materiales nanoestructurados. La inmovilización enzimática permite que las proteínas puedan colocarse sobre o dentro de una estructura más grande mediante enfoques como adsorción, enlaces covalentes o atrapamiento. En las etapas iniciales de la nanobiotocatálisis las enzimas eran inmovilizadas sobre varios materiales nanoestructurados, posteriormente se comenzó a realizar la

inmovilización de enzimas sobre materiales nanoestructurados con alta área superficial (Kim et al., 2008).

Algunas de las ventajas que presentan estos materiales nanoestructurados es el control que se tiene sobre el tamaño de los poros, el espesor en las nanofibras o nanotubos y el tamaño de las partículas. Otra ventaja importante es la distribución uniforme del tamaño de los nanomateriales y su similitud en tamaño con las enzimas, todo eso sumado a otras características ventajosas propias de los nanomateriales (Han et al., 2002; Lei et al., 2004).

Recientemente los silicatos con estructura porosa han llamado mucho la atención debido a que pueden proporcionar un buen soporte para las enzimas. Estos materiales son conocidos como mesoporosos ya que sus diámetros de poro varían entre 2-50 nm de diámetro, poseen gran área superficial, volumen de poro elevado y un orden estructural del poro apropiado para albergar a las enzimas. Díaz y Balkus fueron los primeros en reportar en 1996 la inmovilización de enzimas sobre sílice mesoporosa MCM-41, ellos encontraron que la cantidad de proteínas que se adsorben sobre el soporte a un tiempo determinado disminuye cuando aumenta la masa molecular de la proteína (Águila et al., 2011; Lei et al., 2004). La inmovilización de enzimas grandes como la peroxidasa de rábano picante (una proteína globular de 4.6 nm de diámetro) fue insignificante en el soporte MCM-41, cuyo diámetro es de alrededor de 4 nm, por lo tanto materiales del tipo MCM serían más exitosos en la inmovilización de enzimas con tamaños menores a 4 nm.

Posteriormente el desarrollo de soportes como SBA-15 en el cual el tamaño de poro es de 13-15 nm y de espuma mesocelular MCF con tamaños de poro de 15-40 nm resolvieron el problema del tamaño de poro observado en los materiales del tipo MCM (Lei et al., 2004).

Existen factores que influyen en el proceso de inmovilización de las enzimas sobre los soportes nanoestructurados. Algunos de ellos son:

- La relación de tamaño entre el poro del material y el tamaño de la enzima, al inmovilizarse en el poro del material la enzima debe encontrarse “cómoda”, es decir, la enzima debe entrar fácilmente al poro (Deere et al., 2003).
- Las características de la superficie del poro del material y de la enzima, las cargas entre el material y la enzima deben ser complementarias debido a que es generalmente aceptado que las interacciones electrostáticas entre la proteína y el material es un factor importante que influye en la adsorción y desorción de enzimas (Takahashi et al., 2001).

Existen factores que influyen en las propiedades de la superficie de los materiales y las enzimas como el pH y la fuerza iónica de la solución de la proteína, entre otros. Wright y sus colaboradores investigaron las propiedades de adsorción y desorción de una enzima en el material SBA-15 modificada con grupos tioles, cloruros, aminos y carboxilos, encontrando que las interacciones entre el material y la enzima dependen fuertemente de los grupos funcionales de la superficie (Lei et al., 2004).

Es importante resaltar que algunos comportamientos presentes en la adsorción de enzimas no han sido entendidos completamente. Por ejemplo, Deere y colaboradores sugieren que las interacciones hidrofóbicas predominan sobre las interacciones electrostáticas en el proceso del citocromo C en sílice comercial Kieselgel (Deere et al., 2003).

La inmovilización enzimática ofrece muchas ventajas en relación a la enzima libre. Entre estas ventajas destaca el aumento de la resistencia a la desnaturalización originada por solventes orgánicos e inorgánicos, efecto del pH y efecto térmico, entre otros. Esto ocurre, ya que mediante la inmovilización aumenta la estabilidad de la enzima debido a la interacción entre la superficie del soporte y la enzima (Águila et al., 2011).

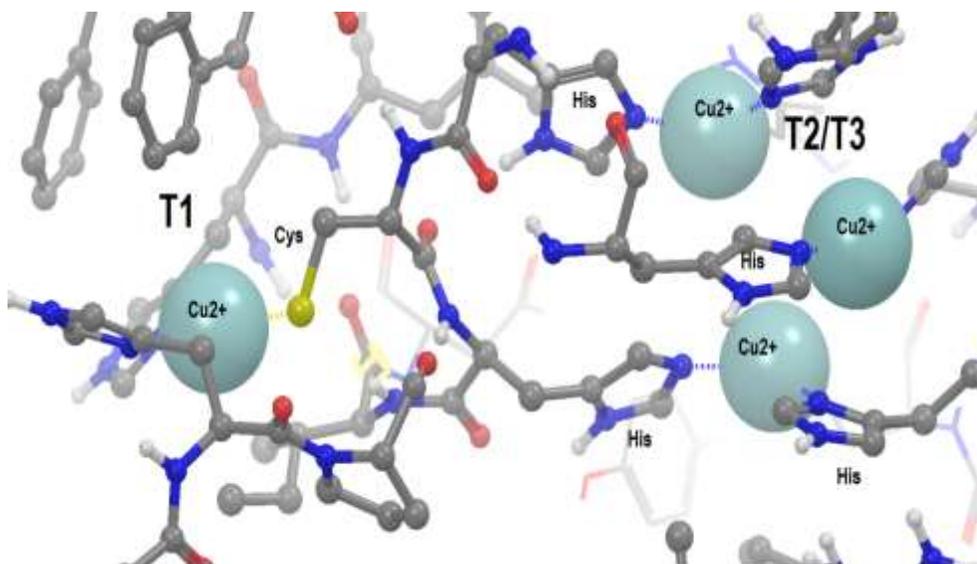
Takahashi y sus colaboradores realizaron la inmovilización de enzimas sobre materiales de sílice mesoporosa y fue probada su estabilidad térmica y actividad catalítica en presencia de solventes orgánicos, donde las enzimas soportadas en los materiales mesoporosos presentaron una mayor actividad residual a comparación de la enzima libre, la cual a menores tiempos de exposición había perdido totalmente su actividad (Takahashi et al., 2001).

Se ha sugerido que la mejora en la actividad de las enzimas inmovilizadas es debido a la aglomeración de una alta cantidad de moléculas de enzima en un solo poro, lo cual genera un confinamiento estrecho que impide el despliegue o desnaturalización de las enzimas (Takahashi et al., 2001).

### 3. Enzimas.

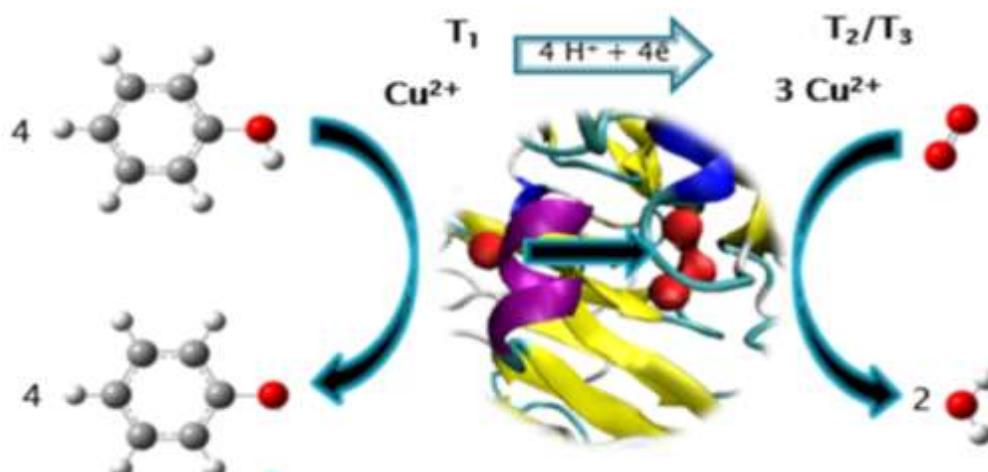
#### 3.1 Lacasa.

Las lacasas son enzimas oxidorreductasas, lignolíticas descubiertas por primera vez del árbol de laca en Japón (Fernández-Fernández et al., 2013). La lacasa es una enzima que puede oxidar una gran variedad de compuestos aromáticos, catalizando la sustracción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromático, para posteriormente formar radicales fenoxi y radicales amino, respectivamente. La enzima no sólo realiza la oxidación de ácidos fenólicos y metoxifenólicos, también los descarboxila y desmetila sus grupos metoxilo (Dávila & Vázquez-Duhalt, 2006). La enzima también reacciona con polifenoles, compuestos aromáticos derivados de la lignina y algunos hidrocarburos poliaromáticos (HPAs).



**Figura 2:** Esquema representativo del sitio activo de la enzima lacasa. El sitio activo está constituido de 4 átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  dispuestos en 3 sitios redox coordinados por un complejo de histidinas y cisteínas, Imagen generada con software académico Maestro (Schrodinger Inc.).

Las lacasas están presentes en muchos tipos de organismos como árboles, bacterias y hongos. La lacasas de hongos tienen un tamaño que oscila entre los 60 y 70 KDa, en su sitio activo se encuentran 4 átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  dispuestos en 3 sitios redox T1, T2 y T3, como se muestra en la Figura 2, donde los compuestos fenólicos llegan al sitio activo T1 y son oxidados en moléculas radicales fenoxi, posteriormente se realiza el transporte electrónico a través de un complejo de His-Cis-His hasta los sitios T2/T3 donde es reducido el oxígeno molecular a agua, tal como se representa en la Figura 3 (Fernández-Fernández et al., 2013).



**Figura 3:** Esquema representativo de la actividad oxidasa de la lacasa. Primeramente 4 moléculas fenólicas se acercan al sitio redox T1 donde son sustraídos 4 electrones y 4 protones que pasan a través del complejo de cisteínas e histidinas hasta el sitio T2/T3 donde el oxígeno molecular es reducido a 2 moléculas de agua. Imagen generada con software académico Maestro (Schrodinger Inc.).

Las lacasas son excelentes biocatalizadores para aplicaciones biotecnológicas y ambientales, debido a que poseen alta actividad, selectividad y especificidad, lo que les permite catalizar complejos procesos químicos. Sin embargo, el uso para aplicaciones prácticas de estas enzimas aún es muy limitado debido a su baja estabilidad (Dávila & Vázquez-Duhalt, 2006).

La inmovilización de la lacasa puede superar algunos de los inconvenientes mencionados a través de la mejora de alguna de las propiedades de la enzima, las principales ventajas que se presentan al inmovilizar la lacasa son el aumento de la estabilidad térmica, la resistencia a condiciones extremas y a reactivos químicos orgánicos. Otra de las ventajas es que al estar inmovilizadas las lacasas se pueden separar de los productos de reacción mediante métodos físicos convencionales, lo cual permite su aplicación en procesos continuos. Sin embargo, los procesos de inmovilización podrían también resultar en cambios conformacionales de la enzima, la heterogeneidad de la enzima en el soporte y una ligera pérdida de actividad catalítica (Fernández-Fernández et al., 2013).

La aplicación de las lacasas de mayor interés para este trabajo es debido a su capacidad para degradar diferentes tipos de colorantes particularmente los tipo azo, dichos componentes son resistentes a la exposición a la luz, agua o sustancias químicas.

A pesar de lo anteriormente mencionado aún existen muchas limitaciones para la aplicación industrial de las lacasas en la oxidación de colorantes tipo azo, incluyendo la no reutilización de la enzima. En consecuencia las lacasas inmovilizadas sobre soportes nanoestructurados están siendo ampliamente estudiadas para aplicarse en la oxidación de colorantes, ya que el sistema promete ser más sencillo de operar, la enzima sería reutilizable y el costo del proceso se reduciría considerablemente (Fernández-Fernández et al., 2013).

Kandelbauer y sus colaboradores detallan la degradación de algunos colorantes entre ellos los tipo azo, el carmín de índigo y el cristal violeta, mediante el uso de

lacasas inmovilizadas sobre soportes mesoporosos de alúmina, en donde estos colorantes fueron los preferentemente degradados (Kandelbauer et al., 2004).

Ammann y sus colaboradores lograron en 2013, la inmovilización sobre soportes mesoestructurados de combinaciones de 5 lacasas de distintos organismos, aplicado a la degradación de contaminantes fenólicos, . Ellos obtuvieron como resultado que al estar las enzimas inmovilizadas sobre soportes a base de sílice aumentaban su resistencia al pH y su tiempo útil en almacenamiento, además que al inmovilizar combinaciones de estas se lograban mayores porcentajes de degradación de los compuestos fenólicos (Ammann et al., 2013).

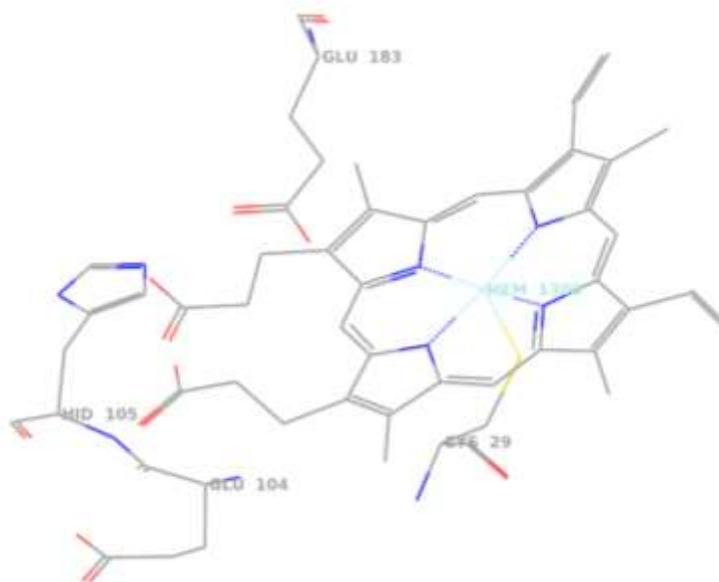
En 2008 Mohan y sus colaboradores realizaron la degradación en fase acuosa del colorante negro ácido mediante lacasa inmovilizada sobre membranas de quitosano que realizaba las funciones de un reactor de tipo lote, obteniendo altos porcentajes de degradación del colorante y determinando que varios parámetros fisicoquímicos intervienen en el proceso de degradación, tales como el pH de la fase acuosa, la temperatura, el tiempo de reacción entre otros, e identificaron los niveles óptimos para la degradación de la sustancia en cuestión (Mohan et al., 2005).

Por otra parte Peralta-Zamora y sus colaboradores presentaron un trabajo con un soporte a base de sílice modificado químicamente con grupos imidazol como una estructura soporte eficiente para la inmovilización de lacasa, en procesos de degradación de colorantes como negro de remazol, rojo reactivo 251 y azul brillante de remazol (Peralta-Zamora et al., 2003).

Una degradación efectiva del colorante azo índigo carmín se llevó a cabo mediante lacasa inmovilizada sobre espumas mesocelulares silíceas (MCF), que fueron previamente mejoradas con organosilanos (Fernández-Fernández et al., 2013).

### **3.2 Cloroperoxidasa.**

La cloroperoxidasa (CPO) es una hemoproteína (Figura 4) muy versátil que presenta varias propiedades catalíticas, tales como halogenasa-, peroxidasa-, catalasa y actividad parecida a citocromo P450. La cloroperoxidasa utiliza peróxidos como aceptor de electrones y no necesita cofactores para llevar a cabo esta actividad (Aburto et al., 2005). Estas enzimas han sido utilizadas en la biorremediación y muestran potenciales aplicaciones para desulfuración, oxidación aromática, entre otras. Además de activarse con peróxido de hidrógeno, la tendencia de la reacción de estas enzimas depende del entorno del sitio activo, de la coordinación de los átomos de hierro, del potencial rédox, entre otros (Águila et al., 2011).



**Figura 4:** Representación esquemática del grupo hemo de la enzima CPO. El sitio activo está conformado por un grupo hemo compuesto por un átomo de  $Fe^{3+}$  coordinado por un anillo de porfirina y una cisteína, glutamina y histeina axial, Imagen generada en software libre Maestro (Schrodinger Inc.).

Desafortunadamente la aplicación práctica de esta enzima es limitada debido a que es poco soluble en solventes acuosos y se inactiva ante altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Aunque el mecanismo de inactivación no está explicado completamente, donde existen eventos como la destrucción del grupo hemo y la formación de redes tridimensionales intermoleculares o entrecruzamiento son conocidos por dar lugar a la pérdida de actividad (Águila et al., 2011), además la enzima es muy inestable a altas temperaturas (Bai et al., 2010).

Zhang y sus colaboradores en 2012 realizaron un estudio sobre la decoloración/degradación de colorantes azo (naranja G y amarillo ocaso) en fase acuosa utilizando la enzima cloroperoxidasa libre. En este estudio se logró una

eficiente decoloración de los compuestos al utilizar una solución amortiguadora, peróxido de hidrógeno y manteniendo estrictas condiciones de pH, temperatura y de la concentración de peróxido de hidrógeno (Zhang et al., 2012).

Industrialmente es muy costoso y complicado mantener condiciones similares a las utilizadas en el estudio de Zhang y sus colaboradores, por lo cual está siendo ampliamente estudiada la inmovilización de la cloroperoxidasa en soportes mesoporosos, ya que, análogamente a lo que sucede con la enzima lacasa, al estar inmovilizadas mejoran sus propiedades de resistencia ante factores extremos de pH, temperatura y efectos del solvente.

En otro estudio Han y sus colaboradores realizaron la inmovilización de cloroperoxidasa en varios materiales mesoporosos de sílice, los soportes con tamaño de poro grande 7-15 nm mostraron la mayor eficiencia, esto debido a que proporcionan un mejor acceso de los sustratos hacia la enzima. La cloroperoxidasa inmovilizada conservó su actividad y se comportó de manera similar a la enzima en solución (Han et al., 2002).

Aburto y sus colaboradores realizaron una investigación sobre como la estabilidad de las enzimas dependen del método de inmovilización. Así, se inmovilizó cloroperoxidasa sobre SBA-16 dopado con  $\text{Cs}^{2+}$  el cual aumentaba la cantidad de enzima que se inmovilizaba pero no proporcionaba protección al pH y la temperatura (Aburto et al., 2005).

Finalmente Águila y sus colaboradores realizaron la inmovilización de cloroperoxidasa en soportes mesoporosos de sílice, obteniendo como resultado un incremento en la actividad de oxidación de estireno de la cloroperoxidasa

inmovilizada, así como un notable incremento en la estabilidad térmica y la estabilidad ante solventes orgánicos, para los soportes MCF y SBA-15 (Águila et al., 2011).

#### **4. Sistemas multienzimáticos.**

La síntesis enzimática puede involucrar a un tipo de enzima que cataliza una reacción determinada, o a más de un tipo de enzimas que pueden catalizar de forma secuencial o simultánea una reacción específica (Xue & Woodley, 2012).

En la naturaleza se pueden encontrar un gran número de cascadas de enzimas en diferentes rutas metabólicas dentro de una célula. Este interesante concepto se trata de imitar mediante la síntesis de sistemas multienzimáticos. Xue y colaboradores proponen clasificar los sistemas multienzimáticos según su aplicación, en cuatro categorías principales: (i) regeneración del cofactor, (ii) desplazamiento del equilibrio, (iii) degradación de materia prima para biomasa renovable y (iv) química de azúcares (Xue & Woodley, 2012).

La mayoría de las reacciones multienzimáticas reportadas se han realizado utilizando enzimas solubles (o libres) a escala de laboratorio. Los principales inconvenientes de utilizar enzimas libres son los procesos de separación al finalizar la reacción, los cuales resultan muy costosos y tardados, y la frágil estabilidad operacional de las enzimas. La inmovilización de las enzimas puede proveer una mayor estabilidad operacional y proporciona más opciones para el diseño de reactores, además de simplificar el proceso de separación. Sin embargo, la inmovilización también puede ocasionar ciertos cambios como

disminución de la actividad catalítica y modificación de alguna de sus características, como pH óptimo y/o cambio en sus constantes cinéticas de Michaelis-Menten, la cual describe la velocidad de reacción de algunas reacciones enzimáticas (Johnson & Goody, 2011; Xue & Woodley, 2012).

El uso de sistemas multienzimáticos está siendo ampliamente estudiado con principal aplicación en la generación de fármacos, biocombustibles y biorremediación. El uso de sistemas multienzimáticos inmovilizados de forma covalente y no-covalente en soportes nanoestructurados para su uso en biorremediación es un tema que causa gran interés y que hasta la fecha poco se ha estudiado, dado que la mayoría de los estudios se dirigen a la utilización de una sola enzima o de un grupo de isoenzimas inmovilizadas sobre el mismo soporte.

Grover y sus colaboradores inmovilizaron por separado lacasa y cloroperoxidasa en nanotubos de carbono de pared múltiple para generar pinturas con actividad antimicrobiana (Grover et al., 2012)

Un sistema multienzimático inmovilizado para la degradación de compuestos xenobióticos fue proporcionado por Van Aken y sus colaboradores, quienes co-inmovilizaron manganeso peroxidasa y glucosa oxidasa sobre perlas porosas de sílice, donde el peróxido de hidrógeno requerido por la enzima manganeso peroxidasa era producido por la glucosa oxidasa, el proceso disminuyó la actividad enzimática y la afinidad al sustrato de la manganeso peroxidasa, pero aumentó su estabilidad ante el peróxido de hidrógeno (Rao et al., 2014).

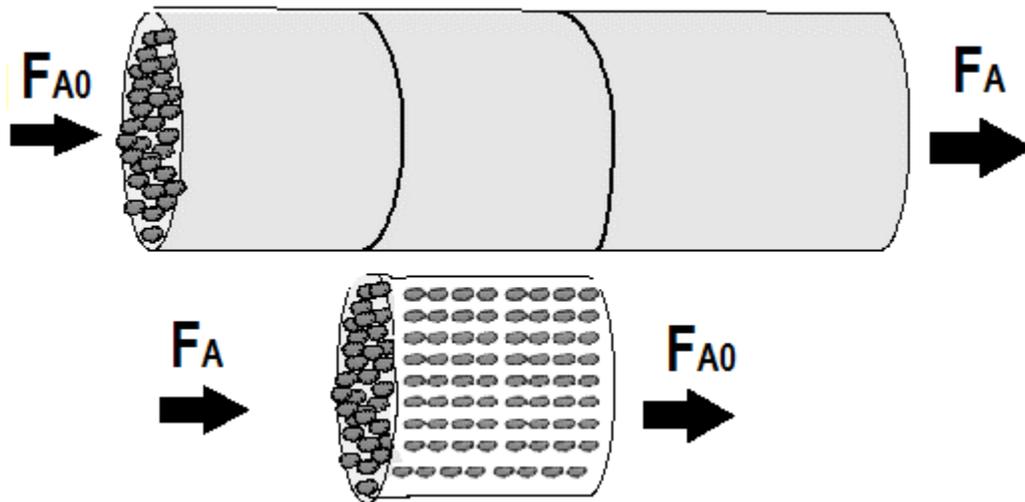
## **5. Reactores.**

La selección de un reactor óptimo para una reacción enzimática usualmente se basa en el costo, espacio, transferencia de masa, cinética y capacidad de reutilizar el catalizador. Los mismos criterios son tomados en cuenta para la selección de un reactor multienzimático (Xue & Woodley, 2012).

### **5.1 Reactor de lecho empacado.**

Un reactor continuo de lecho empacado (CPBR por sus siglas en inglés) es la configuración de mayor importancia a nivel industrial para reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas (Figura 5). Entre sus principales ventajas destacan: bajo costo de fabricación, alta productividad volumétrica, bajo estrés mecánico y es ideal para reacciones en las cuales se produce inhibición con el producto. Además, el corto tiempo de residencia puede llevar a un menor número de reacciones secundarias (Xue & Woodley, 2012).

En un reactor continuo de lecho empacado los gránulos del catalizador se acomodan de tal forma que llenan la cámara de reacción, esto conlleva a limitaciones externas e internas de transferencia de masa y calor, incluyendo la difusión del sustrato sobre el empacado a través de la superficie del catalizador, además, el ajuste del pH resulta muy complicado cuando el sustrato atraviesa el lecho empacado. Debido a lo anterior es necesario que las enzimas posean un amplio rango de trabajo, lo cual les permita adaptarse a las variaciones de pH.



**Figura 5:** Diagrama de reactor de lecho empacado.

### 5.1.1 Ecuaciones de diseño.

La velocidad de una reacción química es una cantidad intensiva que depende de la concentración y la temperatura. La ecuación de velocidad para una reacción es básicamente una expresión algebraica, y para una reacción específica, la dependencia de la concentración se deberá determinar por observación experimental (Fogler, 2001).

Entonces para una reacción mediada por enzimas la ecuación puede tomar la forma:

$$-r'_A = \frac{k_1 C_A}{1 + k_2 C_A} \quad (1)$$

Donde:

$-r'_A$  es la velocidad de desaparición de una sustancia A.

$C_A$  es la concentración de la sustancia A.

$k_1$  y  $k_2$  son constantes enzimáticas.

Para reacciones heterogéneas fluido-sólido la velocidad de reacción depende de la masa del catalizador sólido,  $W$ , y no del volumen del reactor,  $V$ . Para un sistema heterogéneo fluido-sólido, la velocidad de reacción para una sustancia  $A$  se define como (Fogler, 2001):

$$\frac{dF_A}{dW} = r'_A \quad (2)$$

Donde

$dF_A$  representa el diferencial del flujo de entrada.

$dW$  representa el diferencial de la masa del catalizador.

Omitiendo la caída de presión a lo largo del reactor y de la desactivación del catalizador, es posible usar la forma integral de la ecuación de diseño para calcular la masa del catalizador (Fogler, 2001).

$$W = \int_{F_{A0}}^{F_A} \frac{dF_A}{r'_A} \quad (3)$$

Para un sistema multienzimático secuencial, la velocidad de la desaparición de  $A$  será la suma de las velocidades de formación de  $U$  y  $D$ :

$$-r'_A = r'_D + r'_U \quad (4)$$

Cuando las ecuaciones anteriores toman valores implícitos y se tienen sistemas de ecuaciones diferenciales es necesario recurrir a paquetes matemáticos para su resolución, la forma más sencilla es suponer un sistema unidimensional. Al modelar estos sistemas se deberán hacer las siguientes consideraciones:

- Suponer que el catalizador se encuentra uniformemente distribuido en el reactor.
- En una posición axial dada la velocidad de reacción será la misma.
- No existirán perfiles radiales o angulares de concentración, mismo tiempo de residencia a lo largo del reactor.
- Temperatura y presión constante a lo largo del reactor.

Los procesos multienzimáticos son una alternativa para la catálisis de contaminantes recalcitrantes debido a que con esto se pueden aumentar el número de sustratos posibles, la velocidad de reacción y el porcentaje de degradación. Con lo anterior al explorar el uso de nuevos sistemas multienzimáticos para aplicaciones medioambientales, es imprescindible realizar la caracterización de las enzimas que componen el sistema bajo las condiciones de operación ya que un requisito importante para el diseño del biorreactor es que las enzimas sean resistentes a las condiciones fisicoquímicas con las que son desechados los colorantes de las industrias textiles.

## **Hipótesis**

El uso de un sistema multienzimático con enzimas inmovilizadas en soportes nanoestructurados nos permitirá un mayor rendimiento operacional al oxidar colorantes industriales tipo azo a comparación con el sistema de las enzimas libres.

## **Objetivo general**

Realizar el estudio y diseño de un sistema multienzimático con enzimas inmovilizadas en soportes nanoestructurados para la oxidación de colorantes industriales tipo azo.

## **Objetivos particulares**

- Caracterizar un sistema multienzimático compuesto de las enzimas lacasa y cloroperoxidasa en estado libre aplicado a la oxidación de compuestos azo.
- Inmovilizar las enzimas en soportes nanoestructurados MSU-F, Al-MSU-F, Mordenita mesoporosa y nanotubos de carbono de pared múltiple.
- Fabricar y caracterizar un sistema multienzimático compuesto de enzimas lacasa y cloroperoxidasa inmovilizadas sobre soportes nanoestructurados aplicado a la oxidación de compuestos azo.

## METODOLOGÍA

### 1. Materiales.

#### 1.1 Enzimas.

Las enzimas lacasa de *Coriolopsis gallica* y cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* estaban previamente purificadas. Las características físicas de las enzimas se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1:.** Características generales de las enzimas Lacasa y Cloroperoxidasa.

Enzima	Organismo	Cepa	Masa molecular (kDa)	Punto isoeléctrico	Dimensión (nm <sup>3</sup> )
Lacasa	<i>Coriolopsis gallica</i>	UAMH 8260	66	3.4	6.6×5.2×4.4
Cloroperoxidasa	<i>Caldariomyces fumago</i>	-	36.8	4.0	3.1×5.3×5.5

#### 1.2 Soportes nanoestructurados.

Se utilizaron los soportes comerciales sílice mesoestructurada (MSU-F) y aluminosilicato mesoestructurado (Al-MSUF) obtenidos de sigma Aldrich, y mordenita mesoporosa facilitada por el Dr. Oscar Raymond de CNyN, UNAM.

**Tabla 2.** Características generales de los soportes nanoestructurados mesoporosos.

<b>Soporte</b>	<b>A<sub>BET</sub> (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>V<sub>T</sub> (cm<sup>3</sup>/g)</b>	<b>D<sub>P(BJH)</sub>(nm)</b>
<b>Sílice mesoestructurada (MSU-F)</b>	562	2.31	15
<b>Aluminosilicato, mesoestructurado (Al-MSUF)</b>	605	2.03	~22
<b>Mordenita mesoporosa</b>	10.88	0.03	1.97

Los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT's) muestran un diámetro de entre 20-25nm, un largo de 5 µm y un contenido de nitrógeno del 5%.

### 1.3 Reactivos.

Se utilizó Siringaldazina (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehídoazina) 99% obtenida de Sigma-Aldrich, Monoclorodimedona, reactivo de Bradford (protein Assay) obtenido de Biorad, N-Hidroxisuccinimida (1-Hidroxi-2,5-Pirrolidinodiona) 98% obtenida de Sigma-Aldrich, EDAC o N-Carbodiimida (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidroclicida) obtenido de Sigma-Aldrich.

Se utilizó el colorante Negro directo 22 obtenido de BASF Mexicana S.A de C.V.

## **2. Métodos.**

### **2.1 Ensayos generales**

#### *2.1.1 Ensayos de actividad enzimática*

##### A. Lacasa

Los ensayos de actividad enzimática se llevaron a cabo utilizando espectrofotometría UV-vis. La reacción se llevó a cabo agregando 100  $\mu$ L de siringaldazina a 0.5 mmol/L disuelta en acetonitrilo, solución amortiguadora de succinato 50 mmol/L a pH 4.5 y concentraciones crecientes de enzima lacasa en un volumen final de reacción de 1 mL, se estudió el incremento de la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm en un tiempo de 2 minutos.

##### B. Cloroperoxidasa

Los ensayos de actividad enzimática se llevaron a cabo utilizando espectrofotometría UV-vis, la reacción se llevó a cabo agregando 100  $\mu$ L de Monoclorodimedona 2 mmol/L disuelta en acetonitrilo, 100  $\mu$ L de Cloruro de sodio 1 mol/L, 10  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno 100 mmol/L, solución amortiguadora de fosfatos 50 mmol/L a pH 5 y concentraciones crecientes de enzima cloroperoxidasa en un volumen final de reacción de 1 mL. Se estudió el decremento de la absorbancia a una longitud de onda de 278 nm en un tiempo de 2 minutos.

### 2.1.2 Cuantificación de proteína.

La cuantificación de la enzima libre se llevó a cabo mediante el método de Bradford. La cantidad de proteína inmovilizada fue determinada de forma indirecta a través de la medición de la concentración de la proteína presente en el sobrenadante de los lavados y/o corroborada por la remoción de la proteína del soporte. El método de Bradford es un ensayo en el que se presenta la unión de un colorante (azul brillante de Coomasie) a una proteína, en el cual se manifiesta un cambio de color del colorante en respuesta a la variación de la concentración de proteína. La máxima absorción para una solución ácida de azul brillante de Coomasie está entre 465 y 595 nm, donde ocurre la unión a la proteína. El colorante azul de Coomasie se une principalmente a residuos aminoacídicos básicos y aromáticos, especialmente a Arginina. La concentración de proteína tiene una respuesta lineal a la coloración (absorbancia a 595 nm), por lo tanto es posible aplicar la ley de Lambert-Beer para obtener la cuantificación precisa de proteína seleccionando una relación apropiada de volumen de colorante y concentración de la muestra (Bradford, 1976).

### 2.2. Inmovilización enzimática en soportes nanoestructurados.

Se utilizaron soportes nanoestructurados MSU-F, Al-MSUF, nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) y Mordenita mesoporosa, para inmovilizar Lacasa de *Corioloopsis gallica* y Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*.

### *2.2.1 Inmovilización en MSU-F y AL-MSUF*

La inmovilización se realizó a un pH tal, que las enzimas y el soporte mantienen una carga eléctrica opuesta. A una masa de 0.1 mg de soporte se añadieron 100  $\mu$ L de enzima ( Lacasa 44 g/L en solución de succinato 50 mmol/L a pH 4.5 o Cloroperoxidasa 14 g/L en solución de fosfatos 50 mmol/L a pH 5). El proceso se realizó bajo agitación orbital a 250 rpm por 24 horas a 4°C. Después de este tiempo, fueron centrifugados a 3500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se removió. Cada soporte fue lavado dos veces y se cuantificó la proteína que se mantuvo en solución.

### *2.2.2 Inmovilización covalente en nanotubos de carbono (MWCNT)*

Los MWCNT (obtenidos de CNyN, UNAM) fueron carboxilados utilizando ácido nítrico como agente oxidante durante 4 h a 80 °C. Posteriormente fueron lavados utilizando agua Milli-Q y filtrados utilizando un papel filtro Whatman No. 1, después fueron secados a 25°C en un horno.

Los grupos carboxilos de MWCNT fueron esterificados con los grupos aminos libres de las enzimas (lacasa o cloroperoxidasa) utilizando la química de la carbodiimida. La funcionalización fue realizada disolviendo 7.5 mg de MWCNT, 100  $\mu$ L de EDAC 200  $\mu$ mol/L, 100  $\mu$ L de NHS 200  $\mu$ mol/L, 10  $\mu$ L de enzima lacasa a 44 mg/mL o 50  $\mu$ L de enzima Cloroperoxidasa a 14 mg/mL en 790  $\mu$ L de solución amortiguadora MES 100 mmol/L a pH 4.8, la reacción se incubó durante 24 h a 4 °C, en agitación continua. Los MWCNT-Enzima fueron lavados tres

veces con 1.2 mL de solución amortiguadora MES 100 mmol/L a pH 4.8 y centrifugados a 9000 rpm durante 4 min. Los MWCNT-Enzima fueron almacenados en una solución de buffer MES 100 mmol/L a pH 4.8.

### *2.2.3 Inmovilización en Mordenita mesoporosa.*

Para realizar la inmovilización enzimática fue necesario esterificar las enzimas utilizando N-carbodiimida creando un enlace amida entre el grupo amino de las enzimas (lacasa o Cloroperoxidasa) y un dicarboxilo, ácido succínico. La esterificación fue realizada disolviendo 7.5 mg de ácido succínico, 100  $\mu$ L de EDAC 200  $\mu$ mol/L, 100  $\mu$ L de NHS 200  $\mu$ mol/L, 100  $\mu$ L de enzima lacasa a 44 mg/mL o 100  $\mu$ L de cloroperoxidasa a 14 mg/mL en 790  $\mu$ L de solución amortiguadora MES 100 mmol/L a pH 4.8, la reacción se incubó durante 24 h a 4 °C, en agitación continua. Se retiró el medio de reacción mediante ultrafiltración utilizando una membrana de 30 KDa de poro y se sustituyó por 1 mL de solución amortiguadora MES 100 mmol/L a pH 4.8. La enzima fue cuantificada como se menciona en el punto 1.2.

La inmovilización se realizó a pH 4.8, debido a que las enzimas y el soporte mantienen una carga eléctrica opuesta debido a la esterificación. A una masa de 0.1 mg de soporte se añadieron 100  $\mu$ L de enzima (lacasa 44 g/L o cloroperoxidasa 14 g/L). El proceso se realizó bajo agitación orbital a 250 rpm por 24 horas a 4°C. Después de este tiempo, fueron centrifugados y el

sobrenadante se removió. Cada soporte fue lavado dos veces y se cuantificó la proteína que se mantuvo en solución.

### **2.3. Caracterización operacional de la enzimas libres e inmovilizadas.**

#### *2.3.1 Efecto del pH.*

Se determinó el pH óptimo de operación para cada una de las enzimas libres e inmovilizadas y fueron comparadas. Se realizaron ensayos de actividad enzimática empleando el colorante industrial multiazó negro directo 22 como sustrato. La reacción se llevó a cabo agregando 100  $\mu\text{L}$  de colorante negro directo 22 a 1 mmol/L, 10  $\mu\text{L}$  de enzima o enzima inmovilizada (concentración para todas las enzimas e híbridos de nanomateriales-enzimas de 9.2  $\mu\text{mol/L}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno 100 mmol/L para la reacciones que incluyen cloroperoxidasa y solución amortiguadora de fosfatos 50 mmol/L a pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, en un volumen final de reacción de 1 mL, la reacción se incubó 24 horas a temperatura ambiente bajo agitación orbital a 250 rpm. Se determinó la degradación del colorante mediante la disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 485 nm en un espectrofotómetro UV-vis Carry 60.

#### *2.3.2 Efecto del peróxido de hidrógeno.*

Se determinó la estabilidad de la enzima lacasa ante diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno mediante espectrofotometría UV-vis a una longitud de

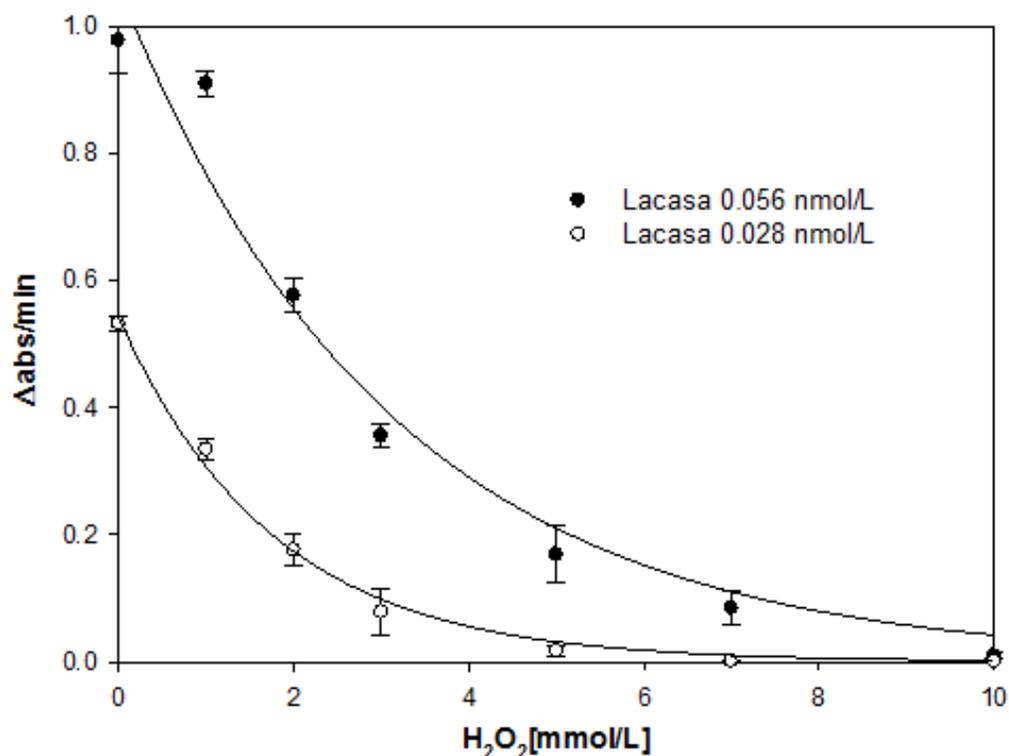
onda de 530 nm, donde se midió la variación de la actividad catalítica de la enzima respecto a la oxidación de siringaldazina 0.05 mmol/L disuelta en solución amortiguadora de succinatos 50 mmol/L a un pH de 4.5 a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (10 hasta 100 mmol/L).

## RESULTADOS Y DISCUSIONES.

### **Caracterización operacional de las enzimas libres e inmovilizadas.**

*Estabilidad de la actividad catalítica de lacasa con respecto al peróxido de hidrógeno.*

La enzima cloroperoxidasa utiliza peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como aceptor de electrones en una concentración optima de 1 mmol/L para llevar a cabo el proceso de oxidación de los colorantes. Al ser un compuesto altamente reactivo puede reaccionar químicamente con los aminoácidos que componen a las enzimas dañando el sitio activo y por consiguiente inhibiendo su capacidad catalítica. Al diseñar sistemas multienzimáticos en los cuales una de las enzimas es una peroxidasa, es preciso estudiar la resistencia ante el peróxido de hidrógeno de las otras enzimas que componen el sistema para que el rendimiento operacional no se vea comprometido con posibles residuos de peróxido de hidrógeno. En este trabajo se realizó el estudio de la resistencia de la enzima lacasa a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno mediante el seguimiento del cambio en la actividad enzimática bajo concentraciones crecientes del compuesto en cuestión y ante diferentes tiempos de incubación, obteniendo los siguientes resultados:



**Figura 6:** Cambio de la actividad catalítica de la enzima lacasa ante concentraciones de peróxido de hidrógeno de 0 a 10mmol/L.

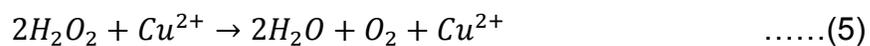
En la Figura 6 se muestra la variación de la actividad enzimática respecto a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y es posible apreciar que a concentraciones de 1 mmol/L, la enzima lacasa mantiene cerca del 90% de su actividad enzimática y a concentraciones de 2 mmol/L de peróxido de hidrógeno la enzima lacasa ya ha perdido cerca del 40% de su actividad enzimática. A concentraciones mayores a 5 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la enzima lacasa ya presenta una pérdida de cerca del 70 % de su actividad enzimática. Es posible apreciar una actividad enzimática residual en concentraciones más elevadas de peróxido de hidrógeno, pero oxida a las enzimas dañando su estructura y conformación, lo cual repercute en la actividad enzimática. Dicho daño es irreversible dado que las alteraciones son químicas,

es decir el peróxido oxida los residuos aminoacídicos que conforman la estructura funcional de la enzima.

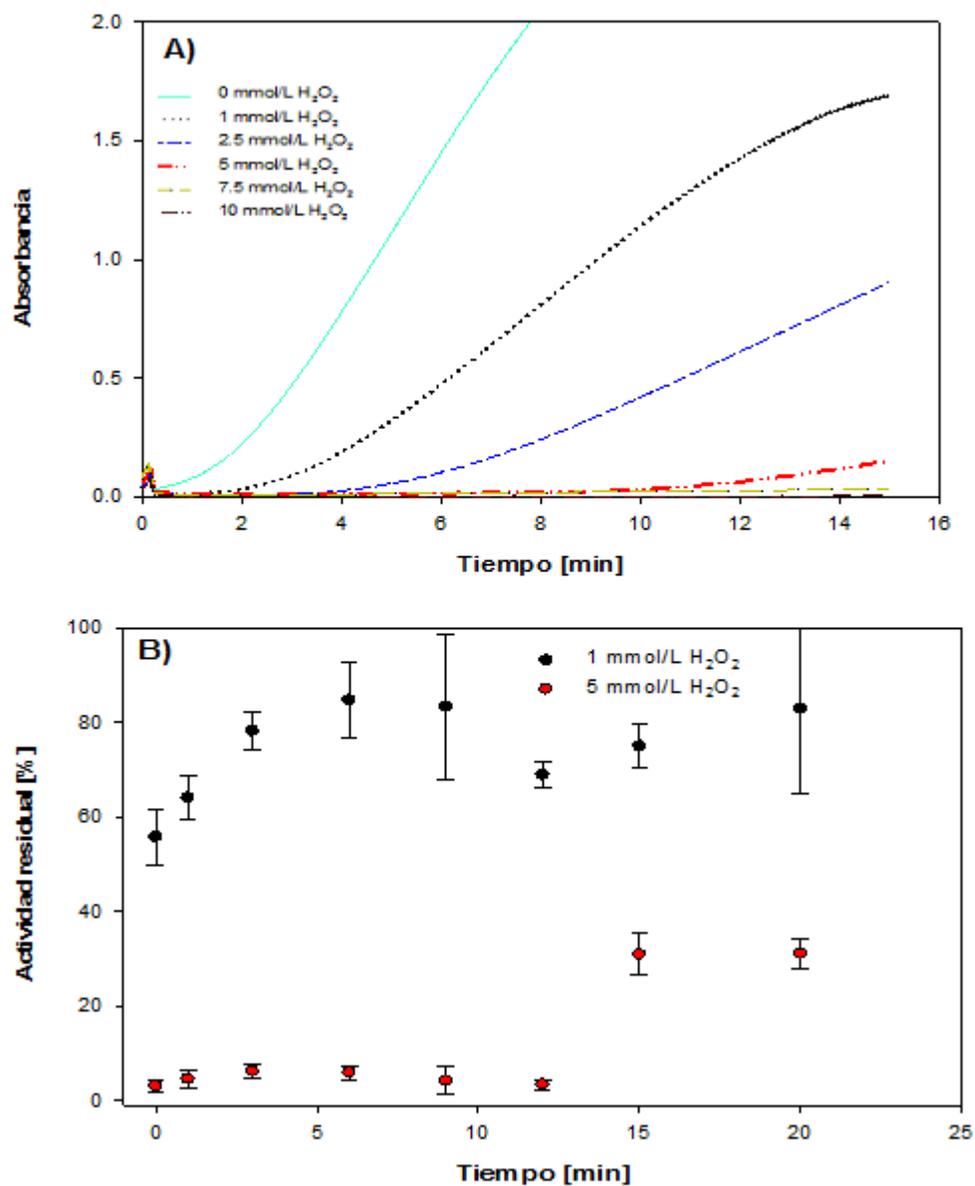
La enzima lacasa es una glicoproteína cuya proporción de carbohidratos consiste principalmente de Beta-D-manosa y N-acetilglucosamina y constituye aproximadamente entre el 10 y el 20% de la masa de la lacasa, estas glicosilaciones le permiten resistir ataques químicos y de radicales libres, así como ataques de enzimas proteasas (Torres-Duarte, 2009). De esta forma a concentraciones bajas (menores a 2 mmol/L) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> las glicosilaciones actúan como escudos que protegen la integridad del sitio activo de la enzima lacasa y su actividad no se ve afectada de forma considerable, pero a concentraciones muy elevadas (mayores a 5 mmol/L) las glicosilaciones no son suficiente protección y la estructura y funcionalidad de la enzima se ven dañadas hasta el grado de perder casi en su totalidad su capacidad catalítica. Esto es algo que se mantiene y es independiente de la concentración de la enzima, por lo tanto a distintas concentraciones de enzima lacasa bajo 1 mmol/L de peróxido de hidrógeno perderá menos del 10% de su actividad catalítica inicial como se aprecia en la Figura 5.

En la Figura 7A es posible apreciar un periodo de retardo durante la fase de transición en la reacción de degradación de siringaldazina, esto posiblemente debido a una inhibición competitiva por parte del peróxido de hidrógeno, es decir, el peróxido de hidrógeno y el sustrato compiten por el sitio activo, el peróxido de hidrógeno interactúa con los iones de cobre presentes en el sitio activo

principalmente al  $\text{Cu}^{2+}$  del sitio rédox T2 y se descompone hasta agua según la reacción general(Brändén et al., 1971):



Cuando la concentración de peróxido de hidrógeno disminuye hasta ser casi nula, el sitio activo de las enzimas que aún se mantienen activas comienza a interactuar con la siringaldazina y la reacción da inicio.



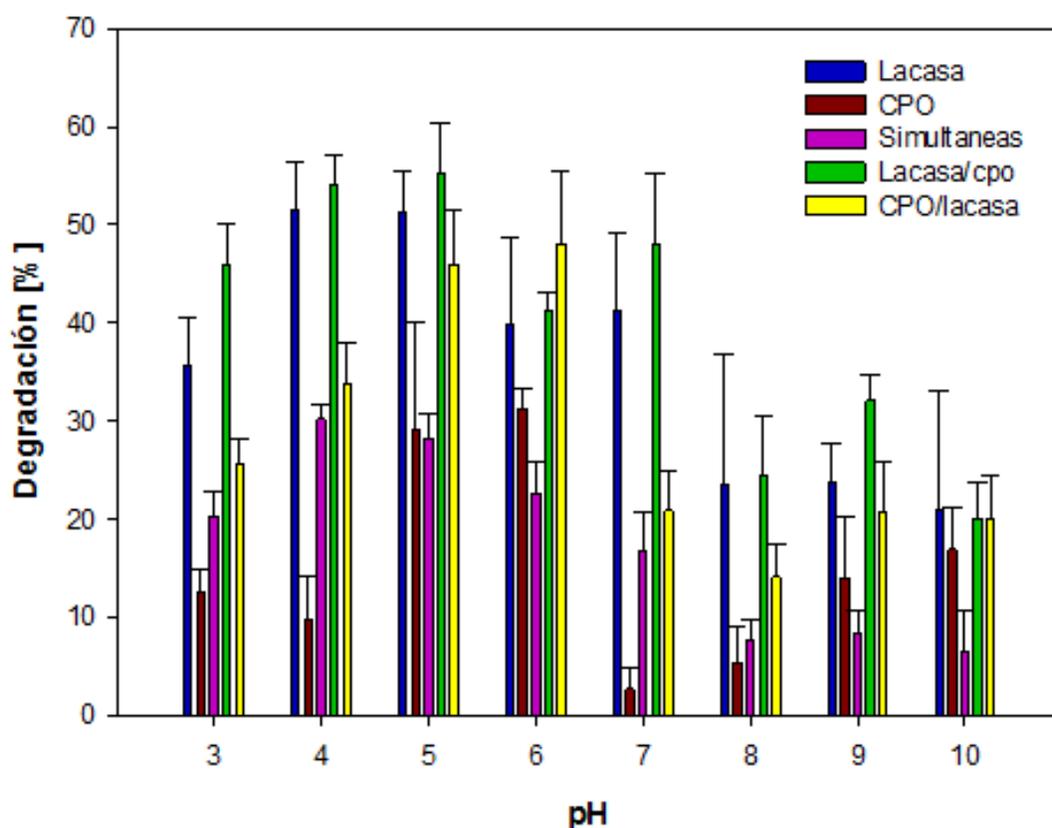
**Figura 7:** A) variación de la velocidad catalítica de la enzima lacasa a 0.028 nmol/ml ante diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno que van de 0 a 10 mmol/L. B) Estabilidad catalítica de lacasa frente a tiempos de incubación con  $H_2O_2$ . Cuadros negros corresponde a incubación de lacasa de 1mmol/L de  $H_2O_2$  y círculos rojos corresponde a incubación de lacasa en 5 mmol/L de  $H_2O_2$ .

En la Figura 7B se muestra la variación de la actividad enzimática con respecto del tiempo de incubación de la enzima en presencia de peróxido de hidrógeno (concentraciones de 1 y 5 mmol/L respectivamente) previo a la degradación de la siringaldazina, inicialmente la enzima lacasa presenta una actividad catalítica menor, la cual aumenta ligeramente al paso del tiempo y se mantiene estable, esto es posiblemente debido a que al contener las enzimas iones de  $\text{Cu}^{2+}$  en su sitio activo estos pueden interactuar y catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (Marroca Garcia et al., 2004), a mayor tiempo de incubación la concentración de peróxido de hidrógeno disminuye hasta ser casi nula, y es en este momento cuando la enzima presenta un crecimiento en la actividad catalítica, dicho crecimiento ocurre a los 1 y 12 minutos para 1 y 5 mmol/L respectivamente, lo cual concuerda con lo mostrado en la Figura 7A ya que a estos tiempos termina el periodo de retardo en la reacción de descomposición de la siringaldazina.

Como producto de la reacción se forman radicales hidroxilo, los cuales presentan alto potencial redox y podrían contribuir con la degradación de la siringaldazina, además se aumenta la concentración de oxígeno molecular en la solución de reacción, dicho oxígeno molecular actúa como aceptor de electrones de la enzima lacasa, estos factores también podrían contribuir ligeramente al incremento de la actividad catalítica de la lacasa.

*Efecto del pH sobre las enzimas libres e inmovilizadas.*

La mayoría de las enzimas muestran una estricta dependencia de la actividad catalítica al pH, causada por algunos residuos aminoacídicos que actúan como bases o ácidos. De la mayoría de los grupos ionizables presentes en las enzimas solo algunos toman parte en el proceso catalítico.



**Figura 8:** Degradación del colorante multiazó negro directo 22 bajo diferentes acomodos del sistema multienzimático lacasa-cloroperoxidasa en valores de pH que varían de 3 a 10.

En la Figura 8 se muestra el grado de degradación del colorante negro directo 22 por las enzimas libres bajo distintos acomodos de reacción, en los cuales se puede apreciar que el sistema multienzimático secuencial actuando sobre el

colorante negro directo 22 obtiene un mayor porcentaje de degradación que las enzimas actuando individualmente y en sistema multienzimático simultáneo.

En el sistema multienzimático simultáneo, ambas enzimas compiten por el sustrato y se interfieren mutuamente reduciendo así su porcentaje de degradación. En los sistemas multienzimáticos secuenciales, una de las enzimas actúa primero sobre el colorante hasta su máximo de degradación y la otra enzima actúa sobre el resto del colorante que no fue degradado por la primera enzima. En las dos modalidades de reacción multienzimática secuencial se obtienen porcentajes de degradación mayores a las enzimas individuales. Por otro lado en el sistema multienzimático simultáneo, el orden de acción del sistema multienzimático lacasa-cpo mostró mayor estabilidad que el orden cpo-lacasa, en la mayoría de valores de pH estudiados.

Al realizar la degradación del colorante negro directo catalizada por el sistema multienzimático inmovilizado en los soportes nanoestructurados MSU-F, Al-MSUF no se observó degradación en el rango de los valores de pH estudiados, esto debido a una repulsión electrostática entre los soportes nanoestructurados y las moléculas del colorante, lo cual no permite que las enzimas interactúen con el colorante y no se produzca la catálisis de degradación. Los soportes nanoestructurados MSU-F y Al-MSUF mantienen una carga superficial negativa la cual permite la adsorción física de la enzima (la cual mantiene una carga positiva bajo las condiciones de inmovilización) y en la mayoría de colorantes

multiazos sus auxocromos son constituidos por grupos azufrados que en solución se mantienen como aniones (carga negativa) (dos Santos et al., 2007).

Es posible descartar el tamaño de las moléculas del colorante como una de las causas de la nula degradación, ya que los poros son de alrededor de 150 Å (como se muestra en la tabla 2) y la molécula apenas de 15 Å de ancho y 26 Å de largo. Así mismo en el trabajo de Xu y colaboradores del año 1996 se muestra que debido a su alto potencial redox la transferencia de electrones entre la enzima lacasa y su sustrato estaba mediada por efectos cuánticos donde el sustrato no necesariamente debía estar en las cercanías o dentro del sitio activo para que se llevara a cabo la degradación. Es decir, al estar las moléculas del colorante a distancias de unos cuantos Amstrongs de las enzimas se puede dar la transferencia de electrones y la oxidación del colorante lo cual provocaría que se generaran radicales libres y el colorante comenzará a polimerizar (Fu et al., 2012).

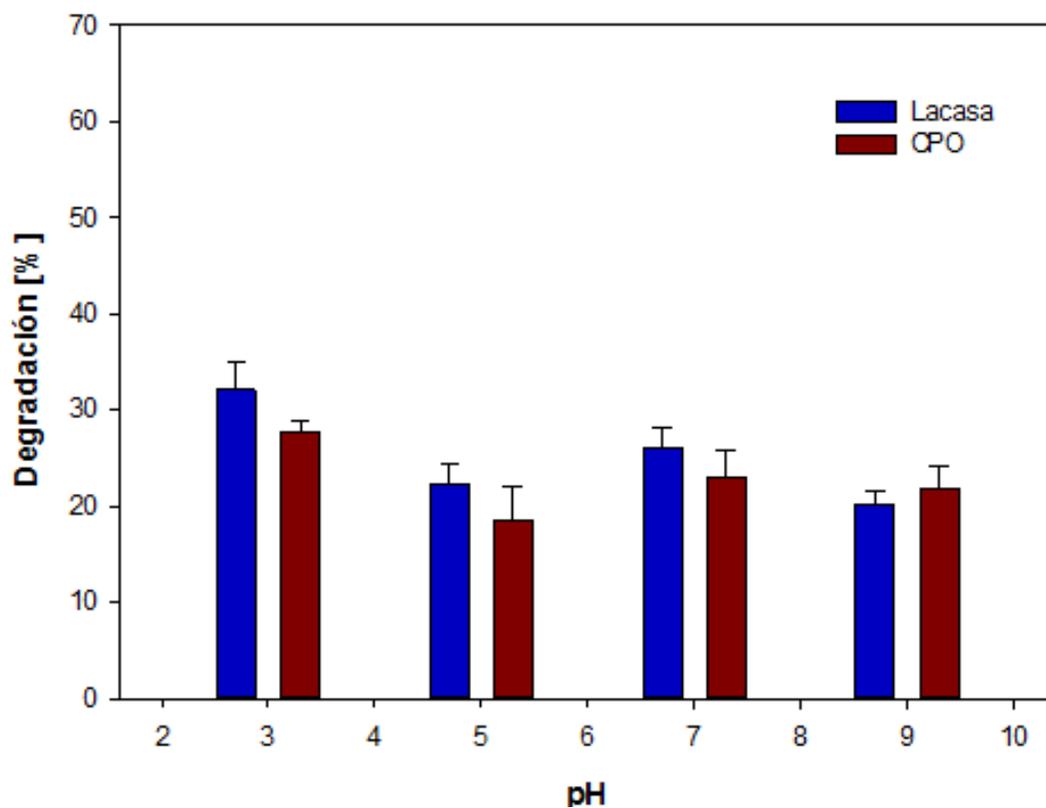
#### *Inmovilización en mordenita.*

Se realizó una modificación química a las enzimas añadiendo grupos carboxilos para que estas mantengan una carga electrostática opuesta con la mordenita durante la inmovilización, al realizar las pruebas de degradación del colorante negro directo 22 se observó nula degradación para todos los valores de pH estudiados esto debido a las dimensiones del poro, ya que al ser tan pequeños, prácticamente las enzimas no se inmovilizan en ellos. El tamaño del poro debe

ser lo suficientemente grande para albergar cómodamente a la enzima (Lei et al., 2004).

#### *Unión covalente de lacasa*

Para estudiar la actividad enzimática de lacasa y cloroperoxidasa inmovilizadas covalentemente, fueron utilizados nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT's) los cuales estaban dopados con nitrógeno para hacerlos más biocompatibles. Los MWCNT's son compuestos apolares (no presentan una carga), es decir, las interacciones electrostáticas son despreciables entre el soporte y las moléculas del colorante. Se realizó la degradación del colorante multiazó negro directo con las enzimas inmovilizadas sobre los MWCNT's bajo diferentes valores de pH obteniendo los resultados que se muestran en la Figura 9:



**Figura 9:** Degradación del colorante multiazo negro directo 22 catalizada bajo diferentes valores de pH por las enzimas lacasa y cloroperoxidasa (cpo) inmovilizadas sobre nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT's).

## CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

### 1. CONCLUSIONES.

La enzima lacasa mantiene el 90% de su actividad catalítica bajo concentraciones menores o iguales a 1 mmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lo cual la hace una enzima elegible como compañera de peroxidasas en sistemas multienzimáticos. Las interacciones electrostáticas entre los soportes nanoestructurados y los colorantes azo juegan un papel importante en la degradación de los colorantes ya que si se presentan cargas similares se producirá repulsión entre estos y no habrá degradación.

Las enzimas inmovilizadas sobre nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT's) mostraron una reducción en la actividad catalítica con respecto a las enzimas libres. Los MWCNT's a pesar de permitir la degradación del colorante no mejoran la estabilidad operacional de las enzimas lo cual no los hace soportes viables para su aplicación en un sistema biorreactor.

El tamaño del poro en la mordenita no fue lo suficiente grande para albergar cómodamente a la enzima y desafortunadamente la inmovilización por adsorción no ocurrió adecuadamente.

Los sistemas multienzimáticos mostraron mayor efectividad que las enzimas solas al degradar al colorante negro directo 22, el mejor acomodo para el sistema multienzimático es de forma secuencial empleando primero la enzima lacasa y posteriormente la enzima cloroperoxidasa.

## 2. PROYECCIONES

Se deben modificar químicamente los soportes nanoestructurados utilizados en este trabajo mediante la incorporación de grupos funcionales que aporten cargas positivas, por ejemplo, grupos amino o con tratamientos post-inmovilización con gluteraldehído que recubran las partículas para minimizar las interacciones electrostáticas de repulsión entre las moléculas del colorante y los soportes MSU-F y Al-MSUF.

Se deben estudiar los parámetros cinéticos de las enzimas lacasa y cloroperoxidasa inmovilizadas sobre los soportes nanoestructurados modificados y establecer las ecuaciones de diseño para el reactor de lecho empaquetado.

Se debe estudiar la posibilidad de incorporar otras enzimas al sistema multienzimático que mejoren la capacidad operacional de este.

## REFERENCIAS

- A. D. McNaught and A. Wilkinson. (1997). IUPAC Gold Book - mesopore in catalysis. *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed.*
- Aburto, J., Ayala, M., Bustos-Jaimes, I., Montiel, C., Terrés, E., Domínguez, J. M., & Torres, E. (2005). Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials. *Microporous and Mesoporous Materials, 83*(1-3), 193–200.
- Águila, S., Vazquez-Duhalt, R., Covarrubias, C., Pecchi, G., & Alderete, J. B. (2011). Enhancing oxidation activity and stability of iso-1-cytochrome c and chloroperoxidase by immobilization in nanostructured supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 70*(3-4), 81–87.
- Ammann, E. M., Gasser, C. A., Hommes, G., & Corvini, P. F.-X. (2013). Immobilization of defined laccase combinations for enhanced oxidation of phenolic contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology.*
- Bai, C., Bo, H., Jiang, Y., Hu, M., Li, S., & Zhai, Q. (2010). Inactivation of chloroperoxidase by arginine. *Process Biochemistry, 45*(3), 312–316.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry, 72*, 248–54.
- Brändén, R., Malmström, B. G., & Vänngård, T. (1971). The interaction of fungal laccase with hydrogen peroxide and the removal of fluoride from the inhibited enzyme. *European Journal of Biochemistry / FEBS, 18*(2), 238–241.
- Couto, S. R. (2007). Decolouration of industrial azo dyes by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Journal of Hazardous Materials, 148*(3), 768–70.
- Dávila, G., & Vázquez-Duhalt, R. (2006). Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico, XXX.*
- Deere, J., Magner, E., Wall, J. G., & Hodnett, B. K. (2003). Adsorption and activity of proteins onto mesoporous silica, *85*(January), 19–23.
- Domínguez, A. R. (2009). BIONANOTECNOLOGÍA Y NANOBIOLOGÍA: CÓMO APROVECHAR EL MICROCOSMOS. *Razón y Palabra, 14*(68).
- Dos Santos, A. B., Cervantes, F. J., & van Lier, J. B. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology, 98*(12), 2369–85.
- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. Á., & Moldes, D. (2013). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances, 31*(8), 1808–25.
- Fogler, H. S. (2001). *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. Pearson Educación.
- Fu, J., Nyanhongo, G. S., Gübitz, G. M., Cavaco-Paulo, A., & Kim, S. (2012). Enzymatic colouration with laccase and peroxidases: Recent progress. *Biocatalysis and Biotransformation.*
- Grover, N., Borkar, I. V., Dinu, C. Z., Kane, R. S., & Dordick, J. S. (2012). Laccase- and chloroperoxidase-nanotube paint composites with bactericidal and sporicidal activity. *Enzyme and Microbial Technology, 50*(6-7), 271–9.

- Han, Y.-J., Watson, J. T., Stucky, G. D., & Butler, A. (2002). Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(1), 1–8.
- Johnson, K. a., & Goody, R. S. (2011). The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264–8269.
- Kandelbauer, A., Maute, O., Kessler, R. W., Erlacher, A., & Gübitz, G. M. (2004). Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(4), 552–63.
- Kim, J., Grate, J. W., & Wang, P. (2008). Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends in Biotechnology*, 26(11), 639–46.
- Kommineni, S., & Zoeckler, J. (2000). 3.0 Advanced Oxidation Processes. ... , *Advanced Oxidation*
- Lei, J., Fan, J., Yu, C., Zhang, L., Jiang, S., Tu, B., & Zhao, D. (2004). Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace. *Microporous and Mesoporous Materials*, 73(3), 121–128.
- López, C., Moreira, M., Feijoo, G., & Lema, J. (2007). Tecnologías para el tratamiento de efluentes de industrias textiles. *Afinidad*, 64, 561–573.
- Marroca Garcia, C., Brizard, A., Rincón Arévalo, P., & Nieves Sánchez, R. (2004). ESTUDIO CINÉTICO DE LA DESCOMPOSICIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN CONDICIONES DE EXTREMA ALCALINIDAD. *Revista de Ciencia, Tecnología Y Medio Ambiente*.
- Mohan, S. V., Prasad, K. K., Rao, N. C., & Sarma, P. N. (2005). Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere*, 58(8), 1097–105.
- Peralta-Zamora, P., Pereira, C. M., Tiburtius, E. R. ., Moraes, S. G., Rosa, M. a, Minussi, R. C., & Durán, N. (2003). Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis B: Environmental*, 42(2), 131–144.
- Piña Mondragon, S. (2007). *Decoloración biológica del colorante azul directo 2 en un filtro anaerobio/aerobio*. Universidad Nacional Autonoma de México.
- Rao, M. a, Scelza, R., Acevedo, F., Diez, M. C., & Gianfreda, L. (2014). Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*.
- Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500–13.
- Takahashi, H., Li, B., Sasaki, T., Miyazaki, C., Kajino, T., & Inagaki, S. (2001). Immobilized enzymes in ordered mesoporous silica materials and improvement of their stability and catalytic activity in an organic solvent. *Microporous and Mesoporous Materials*, 44-45, 755–762.
- Torres-Duarte, C. (2009). Transformación de plaguicidas por el sistema Lacasa-Mediador de *C. gallica*.
- Xue, R., & Woodley, J. M. (2012). Process technology for multi-enzymatic reaction systems. *Bioresource Technology*, 115, 183–95.
- Zhang, J., Feng, M., Jiang, Y., Hu, M., Li, S., & Zhai, Q. (2012). Efficient decolorization/degradation of aqueous azo dyes using buffered H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

oxidation catalyzed by a dosage below ppm level of chloroperoxidase.  
*Chemical Engineering Journal*, 191, 236–242.