



MEJORAMIENTO DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA PEROXIDASA VERSÁTIL DE *Bejrkandera adusta* MEDIANTE SU MODIFICACIÓN SUPERFICIAL CON TRIPTÓFANO.

Flor Sánchez-Alejandro^a, Rafael Vazquez-Duhalt^b. ^aCICESE, Ensenada, B.C., CP 22860. ^bCentro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, Ensenada, B.C., CP 22860. Corresponding author: rvd@cnyunam.mx

Palabras clave: Peroxidasa versátil, LRET, triptófano.

Introducción. Las hemo peroxidases extracelulares son producidas por hongos implicados en la pudrición de la madera como estrategia natural de degradación de lignina. El basidiomiceto *Bejrkandera adusta* es uno de estos microorganismos y para tal efecto sintetiza peroxidasa dependiente de manganeso (MnP), lingino-peroxidasa (LiP) y el híbrido de ellas, la peroxidasa versátil (VP) (1,2). En la VP y en otras peroxidases (3,4), la oxidación del sustrato puede efectuarse mediante un proceso de transferencia de electrones a larga distancia (LRET) que implica un radical proteico expuesto para la oxidación de moléculas grandes (5). En VP el sitio de oxidación de estos sustratos es el Trp177 que esta expuesto al solvente y en proximidad al sitio hemo. Este residuo es oxidado selectivamente por el compuesto I y compuesto II mediante LRET en el ciclo catalítico y oxida a los sustratos que no pueden llegar al sitio hemo (1,6,7). Este radical le confiere una gran capacidad de degradar sustratos voluminosos y difíciles de oxidar incluso en ausencia de un mediador.

El objetivo de este trabajo es mejorar las propiedades catalíticas de la VP de *B. adusta* mediante la modificación química de sus residuos superficiales con triptófanos formadores de radicales libres.

Metodología. A los carboxilos y aminos libres en la superficie de la VP les fueron unidos triptófanos vía enlace amida usando carbodiimida y succinimida como activadores de los grupos carboxilo. Las constantes catalíticas k_{cat} y K_M de la enzima modificada (W-VP) y de la VP nativa fueron determinadas por espectrofotometría siguiendo reactivos y productos en las reacciones, y cuyos resultados fueron ajustados a una cinética de Michaelis-Menten. La constante de inactivación de las enzimas en presencia de peróxido de hidrógeno (k_{in}) se obtuvo de la ecuación $A = A_0 e^{-k_{in}t}$ y se determinó mediante incubación de las enzimas a diferentes tiempos en 1 mM de H_2O_2 y en ausencia de sustrato reductor con posterior medición de actividad residual. Además, fue medido el número de recambio total (TTN) que corresponde al número de moléculas de sustrato transformadas por moléculas de enzima hasta que se deja de detectar conversión de sustrato.

Resultados.

La W-VP mostró un incremento de 47% en la actividad catalítica con 2,6-dimetoxifenol y de 54% en la transformación del sustrato voluminoso Azul de Remazol,

mientras que la actividad sobre manganeso II fue drásticamente reducida.

Fig. 1. Modelo del posible plegamiento de la secuencia de la VP de *B. adusta* usando como templatado la estructura cristalográfica de la VP de *Pleorotus ostratus* (a) y mostrando posibles sitios superficiales de unión covalente para triptófanos adicionales (b).

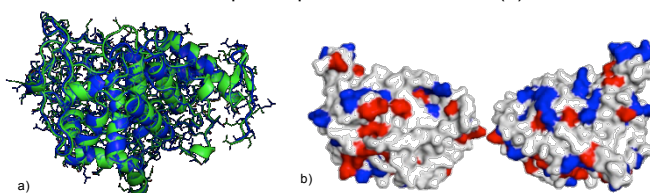


Tabla 1. Constantes catalíticas de VP y W-VP con tres sustratos.

Preparación enzimática	k_{cat} (min^{-1})	$K_M H_2O_2$ (μM)	K_M Sustrato (mM)	k_{in} 1 mM H_2O_2	TTN
2,6-Dimetoxifenol					
VP	550 (± 11)	6.3 (± 0.5)	36.8 (± 17.9)	0.117	2 400 (± 59)
W-VP	810 (± 53)	13.5 (± 7.0)	66.1 (± 17.1)	0.122	2 240 (± 47)
Manganeso II					
VP	5170 (± 241)	11.4 (± 2.3)	0.14 (± 0.02)	0.338	119 500
W-VP	0.52 (± 0.01)	3.98 (± 0.8)	2.45 (± 0.5)	0.116	3 800
Azul de remazol					
VP	1060 (± 69)	3.7 (± 1.3)	0.010 (± 0.003)	0.220	2 140 (± 123)
W-VP	1600 (± 118)	155 (± 80)	0.008 (± 0.002)	0.108	3 300 (± 56)

Conclusiones. La metodología utilizada favoreció la creación de nuevos sitios catalíticos superficiales por anclaje covalente de Trp, lo cual se refleja en el mejoramiento de la estabilidad operacional de la W-VP en comparación con la VP durante la oxidación de un sustrato grande.

Agradecimiento. El primer autor agradece al CONACyT la beca de doctorado otorgada.

Bibliografía.

- Ruiz-Dueñas FJ y AT Martínez (2010) Torres E. M Ayala. Springer-Verlag, Germany 2010, 37-59.
- Pogni R, MC Baratto, S Giansanti, C Teutloff, J Verdin, B Valderrama, F Lenzian, W Lubitz, R Vazquez-Duhalt and R Basosi (2005) Biochemistry. 44, 4267-4274.
- Pérez-Boada M., Ruiz-Dueñas F.J., Pogni R., Basosi R., Choinowski T., Martínez M.J., Piontek K. and Martínez A.T. (2005) J. Mol. Biol. 354: 385-402.
- Miki Y. Calviño F.R., Pogni R. Giansanti S. Ruiz-Dueñas F.J., Martínez M.J., Basosi R. Romero A. and Martínez A.T. (2011) J. Biol. Chem. 286: 15525-15534
- Ruiz-Dueñas F.J., Morales M., García E., Miki Y., Martínez M.J. and Martínez A.T. (2009) J. Exp. Botany, 60, 441-452.
- Ayala Aceves M, MC Baratto, R Basosi, R Vazquez-Duhalt, R Pongí (2001) J. Mol. Catal. B-Enzym: 159-167.
- Tinoco R, J Verdin, R Vazquez-Duhalt (2007) J. Mol. Catal. B: Enzymatic 46 (2007) 1-7.