



EFFECTO DE LA MODIFICACIÓN QUÍMICA *EX-SITU* DEL GRUPO HEMO DE LA PEROXIDASA VERSÁTIL DE *Bjerkandera adusta* EN SU ACTIVIDAD CATALÍTICA”.

Canul, Juan y Vázquez-Duhalt, Rafael. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Postal 510-3, C.P.62210. Cuernavaca Mor. México. Fax. (777) 3172388. canul@ibt.unam.mx

Palabras clave: Modificación química *ex-situ*, grupo hemo, hidrocarburos poliaromáticos

Introducción. El hongo *Bjerkandera adusta* es capaz de degradar la lignina y una amplia variedad de xenobióticos, entre ellos, los hidrocarburos poliaromáticos (HPAs). La transformación de los xenobióticos se lleva a cabo en el medio extracelular. El sistema ligninolítico de *B. adusta* está formado por una batería de enzimas extracelulares que incluyen lacasas, oxigenasas y peroxidasas. Entre las peroxidasas se encuentra la lignina peroxidasa (LiP), capaz de oxidar compuestos aromáticos de elevado potencial redox directamente, la manganosa peroxidasa (MnP), que requiere Mn^{+2} para completar su ciclo catalítico, y la peroxidasa versátil (PV), con actividades de tipo LiP y MnP (1).

El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto de la modificación química *ex-situ* de los grupos carboxilos del grupo hemo, en la actividad catalítica de PV.

Metodología. El diseño experimental incluyó la extracción del grupo prostético de la enzima con el método de la acetona ácida (2), la adición de grupos funcionales a los propionatos del cloruro de hemina, mediante la química de la carbodiimida (3) y la regeneración de la holoenzima de PV. Los grupos funcionales acoplados a la hemina fueron el metilo (MET), polietilenglicol (PEG), *p*-nitro bencil alcohol (PAB) y *p*-amino bencil alcohol (PAB). Se obtuvieron las constantes cinéticas del Mn^{+2} , peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y alcohol veratrílico (AV) de PV nativa y modificada. Además, se midió la oxidación de cuatro HPAs, con las preparaciones enzimáticas y en ausencia de iones manganeso (4). Los HPAs utilizados fueron el 9-metilantraceno, antraceno, pireno y fenantreno.

Resultados y discusión. Los hemos modificados se cromatografiaron en una columna de sílica gel para separar las fracciones modificadas de las no modificadas. espectros de infrarrojo se observaron diferencias en la región del carbonilo de las heminas modificadas, indicativo de la modificación de los grupos carboxilos de los propionatos. El grupo hemo se escindió de la PV con el método de la acetona ácida. El grado de remoción del grupo hemo (>98%) se confirmó mediante el monitoreo de la disminución de la banda Soret a 407 nm y la actividad específica de la apoenzima. La inserción del hemo dentro de la apoPV resulta evidente en los espectros de UV/Vis (Fig. 1). Los espectros de absorción de PV con el grupo hemo modificado presentan un máximo de absorción en relación a la enzima nativa, ligeramente desplazado hacia el rojo. Indicativo de una alteración del ambiente del sitio activo de la proteína.

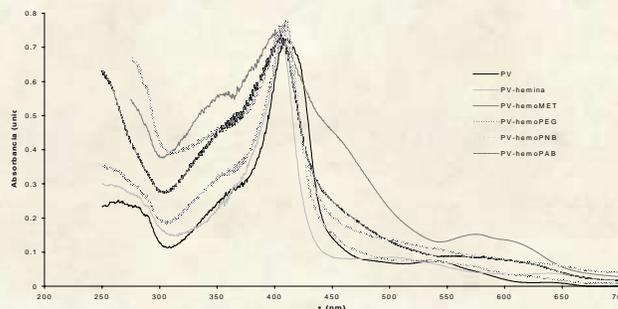


Figura 1. Espectro de absorción de las preparaciones de PV.

Cuadro 1. Parámetros cinéticos de PV y sus modificaciones.

	Mn^{+2}		H_2O_2		AV	
	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})
PV nativa	100	3540	11	4340	3970	605
PVhemina	55	2900	15	3210	4970	440
PVhemoMET	95	2480	17	3300	3100	315
PVhemoPEG	320	1290	18	1480	2090	130
PVhemoPAB	140	640	11	800	2350	85
PVhemoPNB	160	460	20	560	3010	60

Conclusiones. La modificación de los grupos carboxilos del grupo hemo provoca una leve disminución de la actividad catalítica y virtualmente, no afecta la constante de afinidad por los sustratos de las actividades de tipo MnP y LiP, con respecto a PV nativa. Además, las preparaciones de PV modificadas oxidaron los HPAs en la misma proporción que la enzima nativa.

Agradecimiento. Al M.C. Raunel Tinoco y a la Biol. Rosa Román por su asistencia técnica.

Bibliografía.

- Martínez, A. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degradin heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30:425-444.
- Ascoli, F., M.R.S. Fanell, Antonini, E. 1981. Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins. *Methods Enzymol.* 76:72-87.
- Torres, E., Vazquez-Duhalt, R. 2000. Chemical modification of hemoglobin improves biocatalytic oxidation of PAHs. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 273:820-823.
- Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R., Pickard, M. A. 2003. Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Can. J. Microbiol.* 49: 675-682.