



COOPERATIVIDAD CINÉTICA DE LA CLOROPEROXIDASA: OXIDACIÓN DEL 4,6 DIMETIL DIBENZOTIOFENO EN FORMA DE DIMERO

Eduardo Torres, Jorge Aburto, Instituto Mexicano del Petróleo, fax 9175 8429, etorres@imp.mx

Palabras clave: sigmoidismo, cinética enzimática, interacción sustrato-sitio activo.

Introducción. La cloroperoxidasa (CPO) es la más versátil de las peroxidasa dada las características de las reacciones por ella catalizadas. Su potencial de aplicación en la desulfurización oxidativa del diesel y la desmetalización de porfirinas la muestra como una enzima interesante para la industria petrolera.

Dado que las moléculas organozufradas tienen la tendencia de formar complejos π - π estables, en este trabajo determinamos la capacidad de la CPO para reconocer tales dímeros y el efecto de los mismos sobre el comportamiento cinético de la enzima.

Metodología. Se determinó la formación del dímero del 4,6 dimetil dibenzotiofeno (DMDBT) por fluorimetría de estado estacionario. La oxidación catalizada por CPO se monitoreó por la desaparición del sustrato por fluorescencia. Las constantes cinéticas se ajustaron a la ecuación de Hill

Resultados y discusión. El DMDBT, compuesto representativo de organozufrados del petróleo, forma dímeros estables cuya constantes de disociación fueron determinadas en sistemas con diferentes concentraciones de solvente orgánico (1, datos no mostrados). A continuación se determinaron las curvas cinéticas de velocidades iniciales contra concentración de sustrato (figura 1). Como puede observarse la CPO muestra un comportamiento sigmoidal, el cual es diferente al encontrado con otros sustratos que no forman dímeros (2)

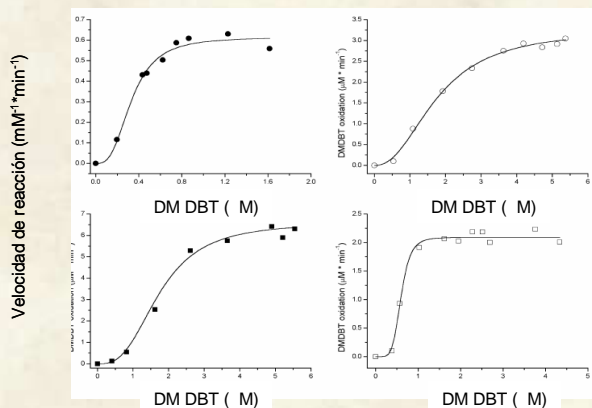


Fig. 1. Oxidación del DMDBT a diferentes concentraciones de acetonitrilo: 5 (●), 20 (○), 30 (■), 40% (□).

De estos gráficos se obtuvo las constantes cinéticas aplicando la ecuación de Hill (tabla 1). Sabiendo que la CPO tiene únicamente un sitio activo, el valor de n de la ecuación puede ser indicativo de cooperatividad cinética, es decir, la activación/inhibición de la enzima por el reconocimiento de más de una molécula de sustrato para la catálisis.

Tabla 1. Constantes cinéticas de la oxidación del DMDBT catalizada por la CPO obtenidas de la ecuación de Hill

Acetonitrilo %	K_{cat} (min^{-1})	K_h (μM)	n
5	123.04	0.33	2.92
20	653.44	1.77	2.26
30	661.13	1.73	2.86
40	209.31	0.59	5.50

El siguiente paso fue determinar si el dímero era reconocido por la CPO. Para esto, se realizaron estudios de fluorimetría en estado estacionario. El centro espectral de masa (CEM), que es un parámetro que mide los cambios promedio de intensidad de emisión y longitudes de onda por efecto de cambios en el medio ambiente de la especie fluorescente (ingreso al sitio activo), muestra que tanto el monómero como el dímero son reconocidos por la CPO, con una afinidad un poco mayor hacia el dímero (cambios en el CEM mayores para el dímero que el monómero en presencia y ausencia de la enzima) (figura 2)

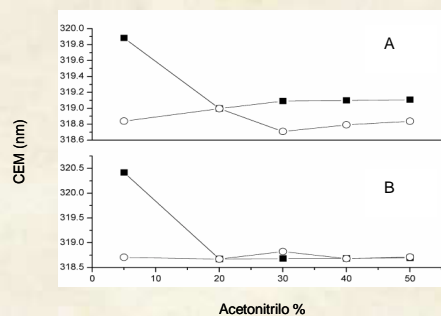


Fig. 2. Centro espectral de masas del dmdbt del dímero (A) y monómero (B) en ausencia (○) y presencia de la CPO (●)

Conclusiones. La cloroperoxidasa reconoce dímeros de sustrato policíclico, mostrando una cooperatividad cinética a causa de ello.

Agradecimientos
IMP D.00293

Bibliografía.

- Torres, E.; Aburto, J. (2005). Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of 4,6 DMDBT as dimer: evidence for kinetic cooperativity. Arch Biochem Biophys. 437:224-232.
- Torres, E.; Bustos-Jaimes, I.; Le Borgne, S. (2003). Potential use of oxidatives enzymes for the detoxification of organic pollutants. Appl Catal B-Environ 46 (1):1-15