



## MODIFICACIÓN QUÍMICA DE UNA VARIANTE ESTABLE DE CITOCROMO c PARA LA OXIDACIÓN DE HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS

Raunel Tinoco, Brenda Valderrama y Rafael Vázquez-Duhalt.

Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62210.

Fax: 777-3172388. Correo electrónico: [raunel@ibt.unam.mx](mailto:raunel@ibt.unam.mx).

*Palabras clave:* Citocromo c, Hidrocarburos poliaromáticos, Modificación química.

**Introducción.** Los hidrocarburos poliaromáticos son contaminantes de ambientes acuosos y terrestres y representan un riesgo para la salud humana debido a su posible actividad carcinogénica y mutagénica. Se ha demostrado la oxidación *in vitro* de hidrocarburos poliaromáticos por medio de enzimas como la lignino peroxidasa, la manganoso peroxidasa o la lacasa. [1]. Estas peroxidases se inactivan por la presencia de peróxido de hidrógeno en la reacción y aunado al carácter hidrofóbico de los hidrocarburos poliaromáticos, la eficiencia de la biocatálisis está limitada. En este trabajo exploramos la actividad peroxidasa del citocromo c, una hemoproteína no enzimática en la oxidación de los hidrocarburos poliaromáticos. El objetivo principal es incrementar la eficiencia biocatalítica de una proteína mutante, la cual es estable al peróxido de hidrógeno, utilizando una metodología de modificación química de la superficie de la proteína con polímeros anfifílicos como el polietilenglicol y la metilación de los propionatos del hemo.

**Metodología.** La producción de las proteínas recombinantes se realizó en jarras de fermentación de 10 L y se purificaron de acuerdo a lo reportado [2]. Las constantes cinéticas ( $K_m$  y  $k_{cat}$ ) se determinaron para la reacción de oxidación del cloruro de pinacianol [3]. La inactivación por peróxido de hidrógeno y el tiempo de vida media de los citocromos se determinaron midiendo la actividad inicial en la oxidación del cloruro de pinacianol, después de incubar las proteínas en buffer fosfatos conteniendo 1 o 10 mM del peróxido. La oxidación de hidrocarburos poliaromáticos como el pireno, se realizó en una mezcla de reacción que contenía 20  $\mu$ M del pireno en 10% de acetonitrilo/buffer fosfatos. Se midió la diferencia de concentración del pireno por HPLC. Las modificaciones químicas en la proteína se realizaron siguiendo los procedimientos previamente reportados [3].

**Resultados.** En la Tabla 1 se compara la caracterización cinética del citocromo mutante (B102) con respecto al parental (WT16) ambos clonados y expresados en *E. coli*, y también con respecto al citocromo comercial de levadura. En la Tabla 2 se muestran los resultados de la inactivación por peróxido de los citocromos recombinantes. Se observa que el citocromo mutante B102 es estable a 1mM y es 80 veces más estable que el parental a 10 mM de peróxido. La tabla 3 resume las velocidades iniciales de oxidación del pireno. Se observa que la modificación química incrementa hasta 6 veces la velocidad de reacción.

Tabla 1. Caracterización cinética de los citocromos recombinantes.

Citocromo	Constantes catalíticas para H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$K_{cat}/K_m$
Saccharomyces	49	46	1.06
WT 16	63	50	1.26
B 102	23	130	0.177

Tabla 2. Estabilidad al peróxido de hidrógeno de los citocromos recombinantes.

Citocromo	Tiempo de vida media a 1 mM (min)	Tiempo de vida media a 10 mM (min)
Saccharomyces	0.13	N.A.
WT 16	0.40	0.50
B 102	Estable	36.2

Tabla 3. Oxidación del pireno por los citocromos modificados químicamente.

Citocromo	Actividad contra pireno (min <sup>-1</sup> )	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 mM
B 102	0.45 ± 0.63	2 ± 0.11
B 102 PEG MET	3.57 ± 0.29	11.44 ± 0.41
B 102 PEG	0.83 ± 0.06	4.25 ± 0.55
Saccharomyces	0.83 ± 0.05	3.13 ± 0.28
Sacc PEG MET	1.31 ± 0.02	6.21 ± 0.3

**Conclusiones.** El citocromo mutante B102 fue más estable a la incubación con peróxido de hidrógeno debido a que presentó una menor afinidad por este sustrato. La eficiencia en la oxidación del pireno fue de hasta 8 veces mayor para los citocromos modificados químicamente.

### Bibliografía.

- Vandertol-Vanier, H. Vazquez-Duhalt, R. Tinoco, R. and Pickard, M. (2002) Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *C. gallica* laccase. *J. Ind Microbiol Biotechnol.* 29: 214-220.
- García-Arellano, H. Valderrama, B. Saab-Rincón G. and Vazquez-Duhalt, R. (2002) High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome c. *Bioconj. Chem.* 13: 1336-1344.
- Tinoco, R. and Vazquez-Duhalt, R. (1998) Chemical modification of cytochrome c improves their catalytic properties in oxidation of PAH's. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 8-12.