

## PAPEL DE LOS TRIPTOFANOS EN LA INACTIVACION DE UNA PEROXIDASA FUNGAL

Marcela Ayala & Rafael Vázquez-Duhalt, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apartado Postal 510-3 62250

Cuernavaca Morelos, (777) 317 23 88, [maa@ibt.unam.mx](mailto:maa@ibt.unam.mx).

*Palabras clave:* peroxidasa, inactivación, peróxido

**Introducción.** Las peroxidasas son enzimas con un gran potencial en diversos campos, desde el ambiental hasta el de química fina. Por su alto potencial redox y la utilización de peróxido de hidrógeno como agente oxidante amigable para el ambiente, existe gran interés en desarrollar aplicaciones industriales basadas en estas enzimas [1]. Sin embargo, las peroxidasas son inactivadas en presencia del peróxido, que actúa como co-sustrato. Esta inactivación depende del propio mecanismo de reacción de la enzima [2]. Por tanto, la estabilidad de las peroxidasas debe ser mejorada con el fin de desarrollar aplicaciones comercialmente atractivas.

El objetivo del trabajo es contribuir a la comprensión del mecanismo de inactivación de las peroxidasas. En particular, se estudia el papel que juegan los residuos oxidables, como los triptofanos, en el proceso de inactivación de la cloroperoxidasa (CPO) de *C. fumago*, una de las peroxidasas más versátiles y eficientes que se conocen.

**Metodología.** La CPO purificada se incubó en presencia de  $H_2O_2$ , adicionado en dosis sucesivas. La actividad residual se siguió espectrofotométricamente. La enzima control y tratada con peróxido se lavó, concentró y digirió con tripsina y los péptidos fueron separados por HPLC. La identidad de estos péptidos se llevó a cabo por espectrometría de masas (EM). Adicionalmente, se llevaron a cabo análisis similares de la CPO modificada químicamente en los triptofanos con N-bromosuccinimida (NBS).

**Resultados y discusión.** La actividad catalasa que muestra la CPO la protege en cierta medida contra la inactivación por peróxido. La actividad residual de la CPO disminuye gradualmente con adiciones sucesivas de peróxido de hidrógeno. El número de moléculas de peróxido necesarias para inactivar a la enzima en un 50% (CI50%) es de aprox. 21,000 (Fig. 1A).

El análisis por HPLC y EM reveló una oxidación por dos átomos de oxígeno en el péptido que contiene al triptofano 127 (Fig. 2). Este residuo se encuentra conectado mediante la cadena polipeptídica a un residuo catalítico, el ácido glutámico 183, que participa en la activación heterolítica del peróxido en el sitio activo (Fig 1B). La modificación química de los triptofanos de la cloroperoxidasa produjo una enzima con una actividad específica igual a la de la enzima nativa. Sin embargo, el CI50% de la enzima modificada disminuyó drásticamente hasta 14,500 (Fig. 1A), lo cual indica que la enzima es menos estable al no estar disponibles los electrones de los residuos triptofano.

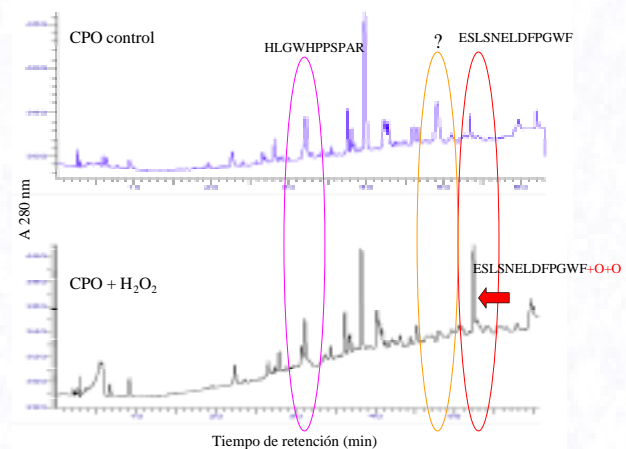


Fig. 2. Análisis por HPLC de digestión triptica de CPO control y expuesta a inactivación por peróxido de hidrógeno

**Conclusiones.** Hipotetizamos que los residuos de triptofano en la cloroperoxidasa, en particular el triptofano 127, podrían actuar como residuos donadores de electrones que protegen a la enzima de la inactivación por peróxido. Estas fuentes de electrones “silenciosas” (es decir, no esenciales para la actividad) podrían encontrarse en otras peroxidasas. De ser así, podrían constituir un mecanismo endógeno de protección para las enzimas. Se planea estudiar a fondo esta hipótesis y estudiar el papel de este tipo de residuos en otras peroxidasas fungales.

**Agradecimiento.** Los autores agradecen al personal de la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología por el análisis de EM.

**Bibliografía.** 1. Hofrichter M, Ulrich R. Heme-thiolate haloperoxidases: biotechnological and environmental significance. (2006) *Appl Microbiol Biotechnol.* 71(3):276-288. 2. Valderrama B, Ayala M, Vazquez-Duhalt R. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. (2002) *Chem Biol.* 9:555-565.

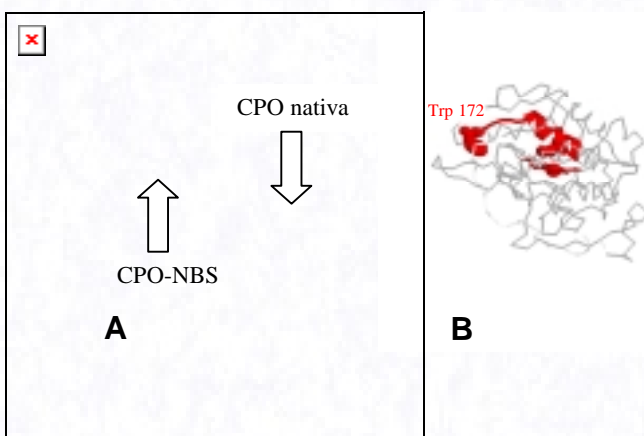


Fig. 1. A) Actividad residual en presencia de  $H_2O_2$  B) Estructura 3D de la CPO, mostrando el triptofano 172 conectado al hemo