

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES CATALÍTICAS DE LA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD DE FENOLOXIDASA DERIVADA DE LA HEMOCIANINA DE *LITOPENAEUS VANNAMEI*

Abdiel Keni Cota-Ruiz y Fernando L. García-Carreño. Correspondencia: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, A.P. 128, La Paz, B.C.S. 23000, México. Tel: +52 612 123 8484. E-mail: fgarcia@cibnor.mx.

Palabras clave: hemocianina, melanosis, fenoloxidasas

Introducción. La melanosis es un problema que va en detrimento de las propiedades sensoriales de los crustáceos. El desarrollo de melanina parece depender de polifenoloxidasas (PO) endógenas localizadas en los hemocitos, sin embargo, una proteína más abundante, la hemocianina (Hc), podría estar involucrada. Recientemente se demostró que esta proteína puede ser convertida en una proteína con actividad de fenoloxidasas (HcdPO) por algunos agentes como lo son el SDS y la tripsina (1 y 2).

Se investigó la conversión de hemocianina en HcdPO, así como sus propiedades catalíticas.

Metodología. La Hc fue purificada mediante filtración en gel (3), agregados hexaméricos y dodecámicos fueron purificados utilizando electroforesis preparativas. La actividad de HcdPO fue medida espectrofotométricamente utilizando L-DOPA como sustrato. Se cuantificó el efecto de activadores químicos, SDS 0.1%, Isopropanol 25 %, Urea 0.1 M, metanol 25 % y Acetona 25 %, y enzimáticos, tripsina 100 µg y quimotripsina 100 µg. Se evaluó la afinidad por sustratos monofenólicos y difenólicos. También se evaluó la estabilidad de esta proteína.

Resultados y Discusión. En la cromatografía de filtración en gel se obtuvo una fracción principal con una razón de absorbancia (A340/280) de 0.214. La proteína purificada muestra dos bandas muy cercanas entre sí en SDS PAGE (7.5 %), asimismo, en condiciones nativas (4.5 %), se presentan dos bandas correspondientes a agregados hexaméricos y dodecámicos, este último con actividad de PO (Fig. 1). La hemocianina nativa no tiene actividad de fenoloxidasas, pero sí su derivado HcdPO (Fig.2). HcdPO tiene mayor afinidad por sustratos difenólicos; con los monofenólicos, presenta una fase de demora tal como la experimentan las tirosinasas.

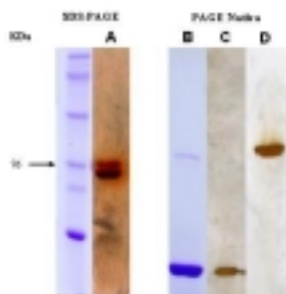


Fig. 1 Análisis PAGE y SDS PAGE de Hc. A y B: Hc pura, C; Hexámero y D: dodecámero

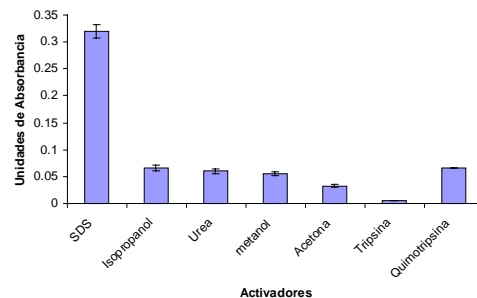


Fig.2 Conversión de la hemocianina en HcdPO utilizando diferentes activadores.

La Hc mantiene la actividad aún después de ser almacenada por tres meses a -20°C (Fig. 3), mientras que fenoloxidasas de especies como *Penaeus japonicus* pierden casi por completo su actividad.

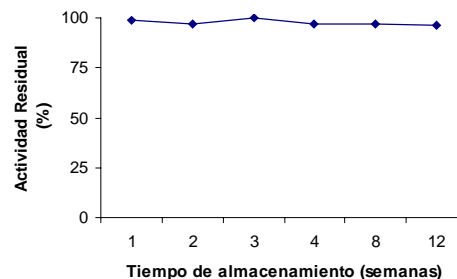


Fig.3 Estabilidad de la Hc bajo congelamiento a -20°C .

Conclusiones. La Hc puede ser convertida en HcdPO, ésta tiene mayor afinidad por sustratos difenólicos, solo los agregados dodecámicos tienen actividad. Hc es estable al congelado y descongelado a -20°C .

Agradecimientos. A CONACYT por la beca de postgrado 200936 a AKCR y por el proyecto E.P. 4.3.

Bibliografía

- Adachi, K, Hirata, T, Nishioka, T y Sakaguchi, M.(2003). Hemocytes components in crustacean convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *CBP*. 134:134-141
- Decker, H, Ryan M, Jaenicke, E y Terwilliger, N. (2001). SDS-induced Phenoloxidase Activity of Hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *J. Biol. Chem.* 276, 17796–17799.
- Adachi, K, Hirata, T, Nagai, K y Sakaguchi, M. (2001). Hemocyanin a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicus* during storage. *J. Food Sci.* 66, 1130–1136.