



BIOTRASFORMACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE EL USO DE UNA MUTANTE CITOCROMO c DE *Saccharomyces cerevisiae* ESTABLE AL H₂O₂.

Alexis Rodríguez, Raunel Tinoco y Rafael Vazquez-Duhalt.

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

C.P. 62210. Fax: 777-3172388. Correo electrónico: alexisrs@ibt.unam.mx.

Palabras clave: Citocromo c, Fenoles, Oxidación.

Introducción: Los fenoles se encuentran entre los principales contaminantes en los efluentes de industrias manufactureras de petroquímicos, herbicidas y refinerías. Los fenoles son compuestos altamente tóxicos y cancerígenos, por lo que representan un riesgo a la salud humana y al medio ambiente [1]. Enzimas como las peroxidasas se han utilizado en la oxidación de fenoles con buenos resultados, presentándose como una alternativa para la biotransformación de fenoles [2]. En el presente trabajo evaluamos la actividad del citocromo c (proteína con actividad peroxidasa) en la oxidación de compuestos fenólicos.

El objetivo de este trabajo es comparar las eficiencias catalíticas entre el citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae* (Cyt Scc) y una mutante estable a la inactivación por H₂O₂ (Cyt B102).

Metodología: La producción de proteína recombinante se realizó en jarras de fermentación de 10 L y se purificaron de acuerdo a lo reportado [3]. Se determinó la actividad específica de los citocromos en la oxidación de diferentes compuestos fenólicos en una mezcla de reacción que contenía 2 mM de cada compuesto en buffer fosfatos (60 mM/pH 6.1), midiendo la diferencia de concentración de los fenoles por HPLC, utilizando una columna de fase reversa y un detector UV de arreglo de diodos. Los compuestos fenólicos se enlistan en el Cuadro 1.

Resultados y discusión: La variante de citocromo c B102 presentó menor actividad contra 10 de los sustratos ensayados comparada con la proteína nativa, solo en la oxidación de 4-hidroxibenzonitrilo la variante presentó mayor actividad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Actividades específicas contra los compuestos fenólicos.

FENÓLES ENSAYADOS		Act. Esp. Min ⁻¹	
		Cyt c Scc	Cyt c B102
4-ETILFENOL	4-EF	8.94	3.07
p-CRESOL	p-C	8.33	4.06
4-BROMOFENOL	4-Br-F	6.8	3.26
4-CLOROFENOL	4-Cl-F	4.48	1.84
4-ETOXIFENOL	4-ETx-F	4.24	3.51
HIDROQUINONA	HQ	3.13	2.87
4-METOXIFENOL	4-MF	2.9	2.43
FENOL	F	1.83	0.64
4-HIDROXIBENZONITRILLO	4-HBN	1.24	2.8
4-HIDROXIACETOFENONA	4-HAF	1.07	0.81
4-HIDROXIACIDO BENZOICO	4-HAB	0.78	0.46

La capacidad de los citocromos c para oxidar al fenol en solución resulta interesante debido a que no existen reportes de esta actividad del citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que se estudiará más detalladamente.

Analizando los potenciales de oxidación de los compuestos, observamos que en el rango de 0.73 a 0.94 V los citocromos c presentan la mayor actividad. En el caso del citocromo c B102 (variante estable) el aumento en la oxidación de 4-hidroxibenzonitrilo (compuesto con el P. redox mayor), puede atribuirse a cambios conformacionales en el grupo hemoprostético, como resultado de las cinco mutaciones puntuales presentes en esta proteína (Figura 1).

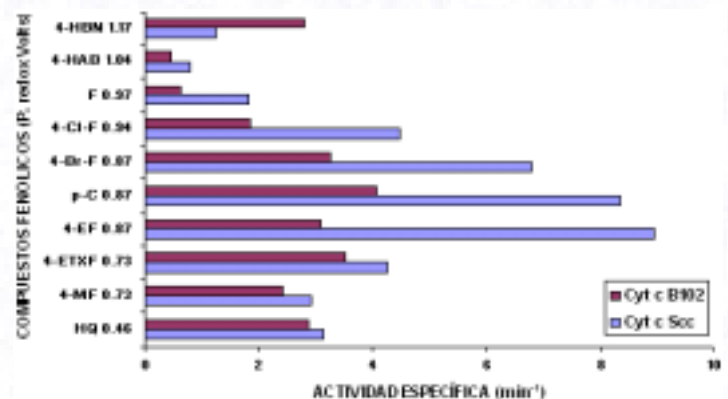


Figura 1. Actividad de los citocromos c en base al potencial de oxidación de los compuestos fenólicos.

Conclusiones: Como efecto de las mutaciones puntuales, la actividad catalítica de la variante Cyt B102 disminuyó. Sin embargo estos cambios podrían permitir que la variante pueda oxidar compuestos con potenciales de oxidación mayores que la proteína nativa como en el caso de 4-hidroxibenzonitrilo.

Agradecimiento: Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

Bibliografía:

1. Autenrieth, R.L., Booner, J.S., Akgerman, A., Okaygun, M. y McCreary, E. M., (1991). Biodegradation of phenolic wastes. *J. Hazard. Matter.* 28, 29-53.
2. Adam W., Lazarus M., Saha-Möller C. R., Weichold O., Hoch U., Häring D. y Schreier P. (1999). Biotransformation with Peroxidases. *Adv. Biochem. Eng./Biotech.* 63:73-108.
3. García-Arellano, H. Valderrama, B. Saab-Rincón G. and Vazquez-Duhalt, R., (2000). High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome c. *Bioconj. Chem.* 13: 1336-1344.