

PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE UNA POLIFENOL-OXIDASA BACTERIANA CON ACTIVIDAD DE LACASA

Nuria Jiménez, Brenda Valderrama y Rafael Vázquez. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa. C.P. 62210. Cuernavaca, Morelos. Fax (777) 3 17 23 88. E-mail nuriaj@ibt.unam.mx

Palabras clave: lacasa, polifenol-oxidasa, tirosinasa

Introducción. En Biotecnología ambiental se utilizan diversas enzimas para la remoción de compuestos contaminantes. Uno de los grupos enzimáticos importantes son las lacasas (1). Estas son enzimas dependientes de cobre que oxidan sustratos orgánicos como polifenoles, fenoles metoxisustituidos y diaminas (2). Se distribuyen en diferentes grupos de organismos, principalmente en hongos y plantas, también están representadas en algunos grupos bacterianos aunque poco se conoce de estas.

Las lacasas fungales se utilizan para oxidar compuestos contaminantes pero presentan ciertas desventajas pues oxidan pocos sustratos y requieren mediadores que son tóxicos. Es por ello que con el objetivo de encontrar una opción que rebasa estas limitaciones, proponemos trabajar con oxidasas bacterianas, específicamente con la polifenol-oxidasa de *Marinomonas mediterranea* (3). Esta enzima se distingue de las lacasas fúngicas por su capacidad de oxidar una mayor variedad de sustratos orgánicos característicos de lacasa y tirosinasa (4).

Es por lo anterior que este trabajo se centra en reportar la purificación y caracterización bioquímica de una polifenol-oxidasa con actividad de lacasa, original de la bacteria *M. mediterranea*.

Metodología. *M. mediterranea* se cultivó en 10 l de medio MMC (4) y se recuperó la biomasa; esta se sonicó y después de centrifugarla, el sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio al 40% de saturación; se dializó y se inyectó en una columna de Intercambio aniónico (DEAE Sepharosa fast-flow), las fracciones con actividad se pasaron por Interacción Hidrofóbica (t-butyl); por último las fracciones con actividad se pasaron por Filtración en gel (Sephacryl S-200).

Se determinó actividad de la enzima pura con sustratos típicos de lacasa y tirosinasa. Para aquellos sustratos con los que fue activa, se determinaron el perfil de pH y constantes cinéticas (Km y Kcat), para lo cual se midió la actividad con diferentes concentraciones de sustrato. Con las velocidades iniciales se calcularon Kcat y Km usando la ecuación de Michaelis-Menten. Se midió actividad en presencia de diferentes concentraciones de sales. Para el perfil de temperatura se midió actividad en un rango de temperaturas de 25 a 85°C. Se probaron inhibidores como: azida de sodio, EDTA, cianuro de potasio y L-cisteína, para ello se incubó la enzima durante cinco minutos con diferentes concentraciones de inhibidor (0.1-50 mM) y se midió actividad residual usando 2,6-DMP como sustrato.

Resultados y discusión. Siguiendo el esquema de purificación descrito en la metodología, se purificó la enzima obteniendo un rendimiento de 260% y una actividad específica de 269 mU/mg. Con la enzima pura se efectuaron los perfiles de pH para sustratos fenólicos y no fenólicos. Al compararlos con los perfiles de pH típicos

para las lacasas fungales encontramos que el pH óptimo para todos los sustratos se desfasaba hacia los pHs básicos en una o dos unidades, a diferencia de las lacasas de hongo. En cuanto a los perfiles de tolerancia a sal, la enzima mostró actividad a concentraciones más altas que las reportadas para lacasas fungales.

En cuanto a las constantes cinéticas, el resumen de estas se muestra en la tabla I. En esta se observan sustratos típicos de lacasas de hongos (siringaldazina, catecol, 2,6-DMP, guaiacol, ABTS y ferrocianuro de potasio) y de tirosinasa (L-dopa).

Tabla I. Constantes cinéticas para la polifenoloxidasa

	Km (? m)	Kcat (s ⁻¹)	Kcat/Km
Siringaldazina	1.57	86.9	55.35
Catecol	99.5	228.3	2.29
2,6-DMP	173.2	131.1	0.756
L-Dopa	208	93.91	0.451
Ferrocianuro de potasio	1936	730.1	0.371
ABTS	4837	130.52	0.0269
Guaiacol	NR	—	—

Respecto al perfil de temperatura, la enzima mostró una temperatura óptima a 65 °C y conservó el 64% de actividad a 85 °C. Por último cabe mencionar que todos los inhibidores típicos de lacasas fungales (azida de sodio, EDTA, cianuro de K y L-cisteína) probados, inhibieron la actividad de la enzima, cada uno en una concentración diferente.

Conclusiones. La polifenol-oxidasa de *M. mediterranea* mostró actividad a pHs básicos, a diferencia de las lacasas fungales, las cuales son inhibidas a pHs mayores de 6. Además, mostró actividad a concentraciones de sal elevadas, y conservó actividad a temperaturas elevadas. Aunque esta enzima mostró un comportamiento bioquímico muy parecido al de las lacasas fungales, es importante mencionar que presentó diferencias importantes y únicas que pueden ser utilizadas en diferentes procesos biotecnológicos.

Agradecimiento. A la Biol. Rosa Roman y al M.en B. Raunel Tinoco por su asistencia técnica.

Bibliografía

1. Yaropolov, A.I., et al. Laccase. Properties, Catalytic Mechanism, and Applicability. *App Biochem Biotechnol.* 49:257-280.
2. Solomon, E.I., et al. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev.* 96:2563-2605.
3. Sánchez-Amat, A. y Solano, F. A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas sp* shares catalytic capabilities of tyrosinase and laccase. *Bioch Biophys Res Com.* 240:787-792.
4. Sánchez-Amat, A., et al. Molecular cloning and functional characterization of an unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Bioch Biophys Act.* 1574:104-116.

