

## CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE UNA PEROXIDASA HÍBRIDA: EVIDENCIA DE UN RADICAL LIBRE SOBRE LA PROTEÍNA

Marcela Ayala Aceves\* y Rafael Vázquez Duhalt. Instituto de Biotecnología, UNAM.  
Apartado Postal 510-3 Cuernavaca 62250 Morelos, México. Correo actual\* [mayalaa@imp.mx](mailto:mayalaa@imp.mx)

*Palabras clave:* peroxidasa, radical libre, EPR

**Introducción.** Los hongos de la pudrición blanca cuentan con una batería de enzimas extracelulares oxidativas que les permite degradar a la lignina. Dentro de estas enzimas, las mejor caracterizadas son la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP) de *Phanerochaete chrysosporium*. La MnP requiere la presencia de Mn(II), el cual actúa como un intermediario oxidante. La LiP no requiere la presencia de Mn(II) y cataliza directamente la oxidación del sustrato mediante un mecanismo de radicales libres. Recientemente se purificó una nueva enzima proveniente de *Bjerkandera adusta* y *Pleurotus eryngii* que presenta actividad tanto de LiP como de MnP. La literatura sugiere que el mecanismo podría involucra un radical libre sobre la proteína (1).

El objetivo de este trabajo es investigar el mecanismo de reacción de una nueva enzima con potencial biotecnológico mediante el uso de técnicas espectroscópicas.

**Metodología.** La enzima producida por *Bjerkandera adusta* fue purificada y caracterizada espectroscópicamente por UV-Vis y EPR, en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Con el fin de determinar la localización del radical se realizó una modificación química sobre los triptofanos de la proteína con N-bromosuccinimida. La actividad de la enzima nativa y modificada fue monitoreada espectrofotométricamente.

**Resultados y discusión.** La peroxidasa híbrida de *B. adusta* presenta actividad dependiente e independiente de Mn(II). De manera similar a la LiP, la reacción con hidroquinona en ausencia de Mn(II) es más rápida a pH más ácido. Aunque la peroxidasa híbrida cataliza tanto la reacción clásica de MnP con Mn(II) como la de LiP con alcohol veratrílico, es más eficiente para oxidar al Mn(II) (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad de la peroxidasa híbrida con sustratos clásicos

Sustrato	pH	Velocidad inicial (min <sup>-1</sup> )
Hidroquinona	3	16.4 ± 0.8
Hidroquinona	5	4.5 ± 0.2
Alcohol veratrílico	4	263 ± 13
Mn (II)	4.5	2487 ± 142

En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se detectó la presencia de un radical sobre la proteína. El espectro de este radical a 120 K se muestra en la Figura 1. Este espectro es similar al de un radical libre centrado en triptofano (2). Con el fin de investigar el papel de éstos en la actividad de la enzima, se realizó sobre la peroxidasa híbrida una modificación química, específica para estos aminoácidos.

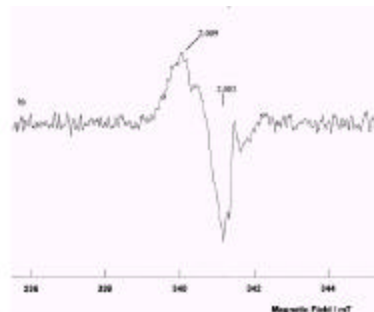


Fig. 1. Espectro EPR del radical centrado sobre la peroxidasa híbrida a pH 5 y 120 K, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La actividad dependiente de Mn(II) sufre una reducción del 45% después de la modificación química, mientras que la actividad independiente de Mn(II) se reduce en un 85%. Por otro lado, el radical libre ya no se detecta en la enzima modificada. La fluorescencia de la peroxidasa modificada se reduce en un 60%, lo que sugiere que puede haber ocurrido una modificación en triptofanos superficiales. Según la literatura, el mecanismo de la LiP involucra varios sitios de unión al sustrato. Aparentemente, uno de estos sitios es un triptofano superficial en el cual se ha detectado la formación de un radical (3).

**Conclusiones.** Aunque aún no se conoce la estructura tridimensional de la nueva peroxidasa híbrida, los resultados obtenidos en este trabajo (4) en conjunto con otros reportes permiten suponer que esta nueva enzima es un verdadero híbrido que posee dos mecanismos de reacción para oxidar a los sustratos. En presencia de Mn(II), la enzima sigue el mecanismo clásico de la MnP. En ausencia de Mn(II), la peroxidasa híbrida se comporta como LiP transfiriendo electrones a través de la proteína, presumiblemente mediante un triptofano superficial en el cual se forma un radical libre.

**Agradecimientos.** Al Dr. M. Pickard por proporcionar la enzima y al CONACYT (33611U) por financiar este trabajo.

### Bibliografía.

- Heinfling A, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Bergbauer M, Szewzyk U, Martínez AT (1998) *FEBS Lett.* 428:141-146
- Hori H, Yonetani T. (1985) *J Biol Chem.* 260:349-355
- Doyle WA, Blodig B, Veitch NC, Piontek K, Smith A. (1998) *Biochemistry* 37:15097-15105
- Ayala Aceves M, Baratto MC, Basosi R, Vazquez-Duhalt R, Pogni R (2001) *J Mol Catal B: Enzymatic* 16:159-167

