

DIFERENCIAS CATALITICAS DE LAS LACASAS DE *Pleurotus ostreatus*

Raunel Tinoco Valencia* Michael Pickard y Rafael Vázquez Duhalt
Instituto de Biotecnología-UNAM. Av Universidad 2001 Col. Chamilpa C.P. 62210
Cuernavaca, Morelos. México. Fax: 01 (777) 313-88-11
* e-mail: raunel@ibt.unam.mx

Palabras clave: Lacasa, hongos ligninolíticos

Introducción: Las lacasas (EC 1.10.3.2; bencendiol:oxígeno oxidoreductasas) de los hongos de pudrición blanca forman parte de un sistema enzimático complejo para la degradación de la lignina (1). Estas enzimas catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos fenólicos y aminor aromáticas. El uso de mediadores en la catálisis con lacasas es una alternativa importante para el desarrollo de procesos en biocatálisis ambiental, tales como el blanqueo de la pulpa del papel (2), la decoloración de pinturas de la industria textil (3), o la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos.

Las lacasas de diferentes hongos muestran variaciones significativas en sus propiedades tales como el potencial redox, las constantes cinéticas, la especificidad al sustrato o el pH óptimo. Además, el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* es capaz de metabolizar una variedad de compuestos contaminantes xenobióticos como los bifenilos pliclorados, los hidrocarburos poliaromáticos, los colorantes industriales y los pesticidas. Se ha observado en muchos casos que las cepas de *Pleurotus* son más activas para metabolizar esos xenobióticos que otros hongos ligninolíticos. En el presente trabajo se determinaron las propiedades catalíticas de seis lacasas purificadas de diferentes aislamientos identificados como *Pleurotus ostreatus*.

Metodología: Las lacasas se produjeron en cultivos sólidos de granos de avena y buffer fosfatos (60 mM, pH 6.1), incubados por dos semanas a 28°C. La purificación de estas enzimas incluyó precipitación con polietilimina, cromatografía de intercambio iónico débil y cromatografía de intercambio iónico fuerte. Se verificó la pureza de las preparaciones enzimáticas por electroforesis en gel de poli(acrilamida). Los ensayos enzimáticos se realizaron en espectrofotómetro, estimando la oxidación del ABTS a 436 nm, la oxidación de la siringaldazina a 530 nm y la oxidación del guaiacol a 470 nm en un volumen de reacción de 1ml en buffer de acetatos 60mM, pH 4.5 y a 30°C. Una unidad de lacasa se define como un micromol de sustrato oxidado por minuto.

Resultados y discusión: Se determinaron las constantes cinéticas para tres sustratos de las lacasas: ABTS, Siringaldazina y Guaiacol. Se observaron diferencias significativas en la Constante de Actividad (k_{cat}) y la Afinidad al Sustrato (K_M). El ABTS y la siringaldazina fueron muy buenos sustratos para las lacasas de todas las cepas de *P. ostreatus* y el guaiacol no fue oxidado con la misma velocidad que los otros sustratos. La Actividad Catalítica (k_{cat}) varió de 8 a 1565 U/mg para el ABTS, de 19

a 941 U/mg para siringaldazina y de 4 a 44 U/mg para guaiacol. Las Constantes de Afinidad aparentes (K_M) también mostraron diferencias significativas, de 8 a 80 μ M para ABTS, de 12 a 52 μ M para siringaldazina y de 0.46 a 6.61 mM para guaiacol. Estos valores están en el rango de los reportados para otras lacasas. Por otro lado, se ha demostrado la dependencia de la oxidación de compuestos fenólicos de la diferencia de los potenciales redox entre el sitio catalítico de las lacasas y el sustrato. La baja eficiencia en la oxidación del guaiacol puede deberse a la baja afinidad de la lacasa por este sustrato. El valor de la K_M para guaiacol está en el orden de mM, mientras que para el ABTS y la siringaldazina está en el orden de μ M.

Los perfiles de actividad a diferentes condiciones de pH, de temperatura y de concentración de solvente orgánico fueron muy similares para las lacasas de las diferentes cepas de *P. ostreatus*. La mayor actividad se observó a pH 5 y a temperatura de 30-40°C. El perfil de actividad a diferentes condiciones de pH en forma de campana en la oxidación de compuestos fenólicos, se atribuye a la reducción del potencial redox de los fenoles conforme se incrementa el pH. Por el otro lado, el efecto de la temperatura en la actividad de estas enzimas puede estar relacionado con el número de puentes disulfuro en la molécula, también se ha observado la disociación de los dímeros de lacasas con el incremento de la temperatura y esto puede afectar la actividad de estas enzimas. Se observó que las lacasas de *P. ostreatus* pierden el 50% de su actividad cuando la mezcla de reacción contiene 15% de acetonitrilo.

Conclusiones: Se demostraron diferencias significativas para las constantes cinéticas de las lacasas purificadas de diferentes cepas de *P. ostreatus*. Estas diferencias fueron de hasta 80 veces en términos de la actividad catalítica (k_{cat}) y de la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M). Este hecho puede atribuirse a las diferencias a nivel molecular de las enzimas, las cuales, afectan significativamente la catálisis, pero no el comportamiento a diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración de solvente orgánico.

Bibliografía:

- (1) Hatakka, A. (1994). Lignin modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 125-135.
- (2) Bourbonnais, R., M. Paice, I. Reid, P. Lanthier and M. Yaguchi. (1995). Lignin oxidation by laccase isoenzymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator ABTS in kraft lignin depolymerization. *Appl Environ Microbiol.* 61: 1876-1880.
- (3) Reyes, P., M. Pickard and R. Vazquez-Duhalt. (1999). Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dye decolorization by immobilized laccase. *Biotechnol Lett.* 21: 875-80.