

ESTUDIOS SOBRE FUNCIONALIDAD DEL COMPONENTE GLICOSILADO DE LA PEROXIDASA DE NABO (*Brassica napus* L. VAR PURPLE TOP WHITE GLOBE)

Miguel Ángel Duarte-Vázquez; Blanca García; Carlos Regalado. DIPA, PROPAC. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las Campanas S/N, CP 76010. Fax (4) 2156867. madv@sunserver.uaq.mx; carlosr@sunserver.uaq.mx

Palabras clave: *Peroxidasa, glicoproteínas, desglicosilación.*

Introducción. La mayoría de las peroxidases de plantas son glicoproteínas, donde la porción glicosídica contribuye hasta con un 26% del peso molecular total. Normalmente los oligosacáridos están unidos por enlace N-glicosídico a la cadena polipeptídica (1). Los carbohidratos en unión covalente con la proteína pueden tener un papel fundamental en la modulación de las propiedades fisicoquímicas y actividad biológica. Aún cuando la naturaleza glicoproteica de las peroxidases de plantas ya es conocida, muy poco se sabe de la funcionalidad de los carbohidratos unidos a ellas.

En este trabajo se investigó la posible función de las cadenas de carbohidratos unidos covalentemente a una isoperoxidasa de nabo.

Metodología. La peroxidasa se purificó mediante precipitación con acetona, cromatografías de intercambio aniónico y de hidrofobicidad (2). La actividad de peroxidasa se determinó utilizando ABTS como cromógeno (3). Los carbohidratos unidos a la cadena polipeptídica se eliminaron por oxidación con metaperyodato de sodio. El efecto de la eliminación de carbohidratos se determinó evaluando los cambios en estabilidad contra factores como temperatura, proteasas, peróxido de hidrógeno y constantes cinéticas. El efecto en la estructura secundaria se evaluó usando un equipo Jasco J-715 de dicromismo circular.

Resultados y Discusión. El tratamiento con peryodato redujo sustancialmente la actividad de la enzima, alcanzando un máximo de pérdida de actividad de 40% a las 6 h. Esto sugiere que la cadena intacta de carbohidratos es necesaria para la actividad enzimática. La peroxidasa nativa fue resistente al ataque de proteasas después de 6 h de incubación, mientras que la enzima desglicosilada después de someterla al mismo tratamiento, mostró una pérdida de la actividad retenida después de la desglicosilación del 70%. La velocidad de inactivación térmica fue mayor en la enzima desglicosilada que en la enzima nativa (Fig. 1). La eliminación de los carbohidratos resultó en una inhibición por peróxido de hidrógeno a concentraciones más bajas en la enzima desglicosilada que en la nativa, El valor de K_m para la enzima desglicosilada fue más bajo (50 μM) que el de la enzima nativa (76 μM), indicando que la remoción de los carbohidratos facilita el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima. La eliminación de los carbohidratos no produjo modificaciones en la estructura secundaria determinada por dicromismo circular (Fig. 2).

Conclusiones. Aparentemente los carbohidratos unidos a

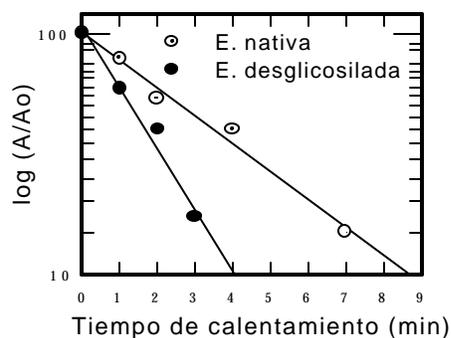


Figura 1. Velocidad de inactivación térmica de la peroxidasa de nabo nativa y desglicosilada.

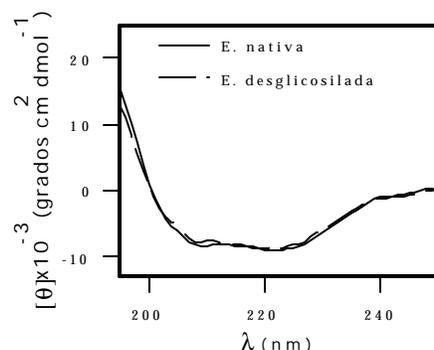


Figura 2. Estructura secundaria de la peroxidasa de nabo nativa y desglicosilada.

una isoperoxidasa de nabo tienen una función protectora, debido a que incrementaron la estabilidad contra factores tales como H_2O_2 , temperatura y proteasas, además de afectar la actividad catalítica interfiriendo el acceso del sustrato al sitio activo.

Agradecimientos. Se agradece al Dr. John R. Whitaker (UC-Davis) por sus observaciones. Este trabajo es parte del proyecto financiado por CONACYT Ref. 31696-B.

Bibliografía.

- (1) Hu, C. y van Huystee, R.B. (1989). Role of carbohydrate moieties in peanut (*Arachis hypogaea*) peroxidases. *Biochem. J.* 49:407-410.
- (2) Duarte-Vázquez, M.A., García-Almendarez, B.E., Regalado, C. y Whitaker, J.R. (2000). Purification and partial characterization of

three turnip (*Brassica napus* L var esulenta D.C.) peroxidases. *J. Agric. Food Chem.* 48:1574-1579.

(3) Childs, R.E. y Bardsley, W.G. (1976). The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethy-benzthiazolin-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* 145:93-103.