

ESTABILIZACION DEL CITOCROMO c POR MODIFICACION QUIMICA

Humberto García Arellano, Brenda Valderrama y Rafael Vázquez Duhalt

Departamento de Bioingeniería. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Avenida Universidad No. 2001 col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. C.P. 62241 MEXICO.

Fax (73) 17-23-88, e-mail hgarcia@ibt.unam.mx

Palabras clave: *estabilidad, polietilenglicol, citocromo*

Introducción. Recientemente se ha mostrado un creciente interés en la industria petrolera por la reducción biocatalítica del azufre orgánico presente en los crudos destinados a la producción de combustibles. Para que un biocatalizador pueda ser empleado eficientemente en este tipo de procesos es necesario atacar dos problemas principales, la estabilidad a la temperatura y la actividad en solventes orgánicos. Se han reportado oxidaciones biocatalíticas de diferentes compuestos aromáticos y azufrados presentes en el petróleo utilizando hemoproteínas como el citocromo c , hemoglobina y cloroperoxidasa (1). La modificación química de enzimas con polietilenglicol (PEG) ha demostrado ser una metodología útil ya que aumenta la solubilidad en solventes orgánicos facilitando la actividad enzimática (2).

Este trabajo pretende obtener un biocatalizador termoestable por medio de la modificación química de hemoproteínas.

Metodología. Se modificó químicamente al citocromo c de corazón de caballo con PEG de diferentes pesos moleculares por el método reportado anteriormente (3). Se determinó el perfil de actividad contra temperatura utilizando sustratos aromáticos y azufrados. Los ensayos de estabilidad se realizaron incubando ambas preparaciones a 80°C o se sometieron a la presencia de diferentes concentraciones de agentes químicos. La estabilidad estructural de la proteína se monitoreó por diferentes técnicas espectrofotométricas. Se determinaron las constantes de inactivación y los parámetros termodinámicos de la desnaturalización.

Resultados y Discusión. El perfil de actividades contra temperatura demuestra que el citocromo no modificado (cyt-wt) es inactivo a 80°C mientras que el citocromo modificado (cyt-PEG) retiene el 10% de su actividad máxima. Los estudios de estabilidad en presencia de agentes químicos indican que el cyt-wt sigue un modelo de desnaturalización de dos estados, a diferencia de la desnaturalización del cyt-PEG que involucra la aparición de un intermediario estable que es catalíticamente activo. Se siguieron las cinéticas de desplegamiento de ambas preparaciones. La señal espectrofotométrica del Soret, característica del grupo

hemo, se mantuvo aún después de que el cyt-PEG se incubó por 7 hrs a 80°C mientras que la del cyt-wt se pierde. Lo anterior demuestra una mayor conservación de la cavidad del sitio activo (grupo hemo) en la proteína modificada. El análisis por difracción circular de la proteína modificada a 80°C indica que no hay cambios significativos en la estructura secundaria del cyt-PEG mientras que el cyt-wt mostró una pérdida considerable. El cuadro 1 muestra el efecto que tiene la modificación química del citocromo con PEG de diferentes pesos moleculares sobre la actividad y la vida media a 80°C. Todos los citocromos modificados presentaron una mayor actividad específica. Este incremento en actividad puede deberse a un desplazamiento de uno de los ligandos axiales (Met80) del grupo hemo, lo cual deja al átomo de hierro del grupo hemo en un estado pentacoordinado altamente reactivo. Las cinéticas de inactivación a 80°C mostraron que el citocromo modificado con Peg de 2000 Da es completamente estable bajo las condiciones ensayadas.

Cuadro 1. Efecto de la modificación química con PEG sobre la actividad específica y la vida media del citocromo c .

Preparación	Actividad específica a 80 °C (min ⁻¹)	t _{1/2} a 80°C (h)
Cyt-wt	0.01 ± 0.001	N.D.*
Cyt-PEG (750 Da)	1.5 ± 0.03	27.1
Cyt-PEG (2000 Da)	1.4 ± 0.03	Estable
Cyt-PEG (5000 Da)	0.64 ± 0.01	14.4

*No determinado debido a la baja actividad a 80°C.

Conclusiones. La modificación química con PEG resulta en un aumento en la estabilidad del citocromo c . Esta modificación produce un estado intermediario catalíticamente activo durante la desnaturalización. El citocromo modificado mantiene su estructura secundaria y su conformación en el sitio activo. El polímero de 2000 Da resultó ser el mejor agente modificante en términos de estabilidad de la proteína.

Agradecimiento. Apoyo financiero: Conacyt, Beca de Posgrado No. 119739. Instituto Mexicano del Petróleo (FIES 98-110-VI).

Bibliografía.

1. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, R. (1998). Chemical modification of cytochrome c improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme Microb. Tech.* **22**:8-12.
2. Takahashi, K. Nishimura, H. Yoshimoto, T. Saito, Y. Inada, Y. (1984). A chemical modification to make Horseradish peroxidase soluble and active in benzene. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **121** (1):261-265.
3. Gaertner, H.F. and Puigserver, A.J. (1989). *Eur. J. Biochem.* **181**:207-213.