



00591
**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

TESIS DOCTORAL

**MODIFICACION QUIMICA *EX-SITU E IN-SITU*
DEL GRUPO HEMO DE LA CLOROPEROXIDASA
DEL HONGO *CALDAROMYCES FUMAGO* Y DE LA
HEMOGLOBINA HUMANA.**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS PRESENTA:**

M. EN B. EDUARDO TORRES RAMIREZ

TUTOR: DR. RAFAEL VAZQUEZ DUHALT

CUERNAVACA

2000

MI 2828



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del **Dr. Rafael Vázquez Duhalt**.

La realización de los estudios de Doctorado fue posible gracias al apoyo económico otorgado por el CONACyT, proyecto 121796 y por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP)

Dedicatorias

A Dios, mi razón de existir.

“Escucha Israel: amarás al Señor tu Dios con toda tus fuerzas, con toda tu alma y con todo tu corazón y a El sólo servirás”

Con todo mi amor a mi esposa, Charo, por despertarme del sueño de la soledad y conducir mis días por un nuevo sendero, hacia el mundo del amor.

A mis padres, Humberto y Cristina, y mis hermanos, Claudia, Hector, Enrique y Miguel Angel con todo mi corazón.

A quienes hicieron mi vida más agradable por su amistad: Charito, Mónica, Raunel, Rosa, Maria Elena, Mauricio, Toño, Marcela, Humberto, Lolita, Fernando, Brenda, Juan, Alex.

Al M.en B. Raunel Tinóco Valencia por el apoyo técnico otorgado durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Biol. Rosa Roman Miranda, por el apoyo técnico prestado en este trabajo.

Agradecimientos

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por todo su apoyo y enseñanza durante mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. Eduardo Horjales y al Dr. Eduardo Bárzana por contribuir a mi formación doctoral al formar parte del comité tutorial.

Indice

Indice	I
Resumen	III
Summary	V
Indice de figuras	VII
Indice de tablas	VIII
1 Antecedentes	1
1.1 Oxidación biocatalítica de hidrocarburos poliaromáticos por hemoproteínas	1
1.2 Biocatálisis en solventes no acuosos	10
1.3 Limitaciones de transferencia de masa en la oxidación de HPA's	14
1.4 La cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i>	18
1.4.1 Ambiente protéico del hemo	19
1.4.2 Reacciones de oxidación de la cloroperoxidasa	20
1.5 La hemoglobina humana como biocatalizador	23
1.6 Modificación química de proteínas	25
1.6.1 Entrecruzamiento de proteínas cristalinas	25
1.6.2 Modificación química con polímeros monofuncionales	27
1.6.3 Plásticos biocatalíticos	28
1.6.4 Modificación química de grupos prostéticos	29
1.6.5 Combinación de modificación química y mutación sitio dirigida	31

1.7 Hipótesis de trabajo	32
2 Objetivos	36
3 Materiales y métodos	37
3.1 Reactivos y solventes	37
3.2 Cinética de desplegamiento de la CPO en urea	37
3.3 Cinética de replegamiento de la CPO	38
3.4 Métodos de extracción del hemo	39
3.5 Modificación química de la protoporfirina IX	40
3.6 Modificación química <i>in situ</i> de la hemoglobina	42
3.7 Determinación de las actividades catalíticas	43
3.8 Minimización energética de las reconstituciones con hemo-PEG de la hemoglobina	45
4 Resultados y discusión	47
4.1 La cloroperoxidasa de <i>C. fumago</i>	47
4.2 La hemoglobina humana	56
4.3 Modificación <i>in situ</i> de la hemoglobina	62
5 Conclusiones	70
6 Referencias	71
7 Anexo I : Chemical modification of hemoglobin improves biocatalytic oxidation of PAHs	82

Resumen

La oxidación de hidrocarburos poliaromáticos catalizada por hemoproteínas está seriamente limitada por la partición del sustrato hacia el solvente orgánico. Por esto, el propósito del presente trabajo fue incrementar la hidrofobicidad del sitio activo, a través de modificaciones químicas *ex situ* del grupo hemo, de la cloroperoxidasa y la hemoglobina con el propósito de mejorar sus características como biocatalizadores. La cloroperoxidasa del hongo de *Caldariomyces fumago* fue sometida a un proceso de extracción y modificación *ex-situ* su grupo prostético. Posteriormente, se ensayó la reincorporación del hemo en la apoproteína en la que se presentaron dificultades que impidieron su reconstitución. El diseño experimental incluyó la extracción y reconstitución en sistemas con urea y en solventes orgánicos, la incubación en presencia de aditivos estabilizadores de peroxidasas, la inmovilización de la proteína o del grupo hemo, la incubación con hemos modificados solubles en agua y la variación de las condiciones de reconstitución y extracción como la temperatura y el tiempo de incubación. El resultado de los experimentos sugiere que la causa que podría estar impidiendo la reconstitución de la apoenzima con su grupo prostético es el replegamiento inadecuado de la apoproteína.

La hemoglobina humana fue exitosamente reconstituida con grupos prostéticos modificados químicamente. La reconstitución con su hemo original (sin modificar) produjo una hemoglobina con las mismas características cinéticas y espectroscópicas. La reconstitución con un hemo modificado con polietilenglicol de tamaño molecular de 350 Da produjo una hemoglobina modificada con una eficiencia catalítica similar a la de la hemoglobina no modificada contra tiantreno en un sistema con 15% de acetonitrilo como

solvente. Sin embargo, la reconstitución con el hemo modificado con polietilenglicol de 750 Da redujo al 50% la eficiencia catalítica de la hemoglobina en el mismo sistema. Las constantes de disociación de las tres hemoglobinas contra sustratos fenólicos sugieren que la presencia del polietilenglicol en el hemo de la hemoglobina disminuye la hidrofobicidad del sitio activo. Por otro lado, las construcciones computacionales muestran que la larga cadena de polietilenglicol podría limitar el acceso de los sustratos al sitio activo por impedimento estérico. Ambas causas provocarían que las reconstituciones con polietilenglicol compitan menos eficientemente por el sustrato hidrofóbico en sistemas con solvente orgánico.

Se modificó la hidrofobicidad superficial y del sitio activo de la hemoglobina humana a través de la modificación *in situ* de sus aminos libres con polietilenglicol y la de los carboxilos libres, incluyendo los del grupo hemo, esterificando con trifluoruro de boro en metanol. La doble modificación de la proteína produce un biocatalizador hasta diez veces más activo para la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos en sistemas con solvente orgánico. La correlación encontrada entre la actividad específica contra los poliaromáticos y el potencial de ionización indica un mecanismo de oxidación por un electrón mediada por radicales libres. El aumento en la hidrofobicidad del sitio activo de la hemoglobina, a través de la esterificación de los carboxilos del hemo, incrementa significativamente la afinidad por los sustratos hidrofóbicos. En conclusión, se favoreció la partición de sustratos hidrofóbicos hacia el sitio activo de las hemoproteínas incrementando la hidrofobicidad del sitio activo a través de modificaciones químicas.

Summary

Enzymatic transformations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in organic solvents is limited by the unfavorable substrate partition between the organic phase and the enzyme active site. In this work, reconstitution experiments of chloroperoxidase (CPO) and hemoglobin were done with different chemical modifications of their prosthetic group (heme group) with the aim to improve their biocatalytic activity in organic solvents. The heme group of chloroperoxidase was taken out of CPO, chemically modified and tested for reconstitution in the active site of the apoenzyme in different refolding conditions. To reduce mass transfer limitations, heme dimerization and apoenzyme aggregation an experimental design was carried out with the goal to produce a more hydrophobic enzyme active site in CPO. Unfortunately, reconstitution of CPO was not accomplished. The results of the experiments suggest that an inadequate refold of apoCPO avoids the reconstitution of the enzyme.

Reconstitution experiments with chemically modified heme groups were performed in human hemoglobin. Hemoglobin with a 350 Da poly(ethylen)glycol-modified heme (heme-PEG 350) shows minimal changes in its spectroscopic and kinetic constants; however, reconstitution with heme-PEG 750 reduces ca. 50% of the maximum velocity versus thianthrene in organic solvents. Both chemically modified hemoglobin have less affinity for hydrophobic substrates than unmodified hemoglobin. Equilibrium substrate binding constants and computer models suggest that reduced affinity versus phenolic substrate of chemically modified hemoglobin could be due to reduced hydrophobicity and limited access to the active site.

Chemical modifications on human hemoglobin were performed with the aim to change both surface and active site hydrophobicity. The modifications included covalent coupling of poly(ethylen) glycol on free amino groups and methyl esterification of free carboxyl groups. The modified hemoglobin was assayed for 11 PAH and 2 organosulfur aromatic compounds. The doubly modified hemoglobin, PEG-Met-Hemoglobin, showed up to 10 times higher activity than the unmodified protein. The kinetic constants show that PEG-Met-hemoglobin has a significantly higher catalytic efficiency. Equilibrium substrate binding constants for unmodified and PEG-Met modified hemoglobin show that this catalytic enhancement could be attributed to the increased affinity for hydrophobic substrates in modified hemoglobin.

In conclusion, it was possible to improve substrate partition to the enzyme active site by increasing hydrophobicity of hemoglobin active site through chemical modifications.

Índice de Figuras

Figura 1	Ciclo catalítico de las peroxidasas	4
Figura 2	Efecto de la concentración de tetrahidrofurano y la hidrofobicidad del sustrato en la biocatálisis con citocromo c	16
Figura 3	Espectro de diferencia del citocromo c con tiantreno y pireno a diferentes concentraciones de tetrahidrofurano	17
Figura 4	Actividades catalíticas de la cloroperoxidasa de <i>C. fumago</i>	18
Figura 5	Entrecruzamiento de enzimas con glutaraldehido	26
Figura 6	Copolimerización de enzimas con polímeros de vinilo con previa solubilización de la enzima con un surfactante	29
Figura 7	Modificación química <i>ex-situ</i> del hemo de una hemoproteína y su reconstitución en la apoproteína	30
Figura 8	Ferropotoporfirina IX, grupo prostético de las peroxidasas	31
Figura 9	La cloroperoxidasa de <i>C. fumago</i>	34
Figura 10	La hemoglobina humana	35
Figura 11	Cinética de desplegamiento de la CPO en urea	47
Figura 12	Espectro de emisión en el equilibrio de la CPO a diferentes concentraciones de urea	49
Figura 13	Espectros de absorción de la hemoglobina no modificada y sus reconstituciones con diferentes hemos	57
Figura 14	Efecto de la concentración de solvente sobre la actividad catalítica de la hemoglobina reconstituída y no modificada	59
Figura 15	Modelo estructural de la hemoglobina humana que muestra la posición y el acceso al hemo.	61
Figura 16	Mínimización energética de la hemoglobina reconstituída con hemo-PEG 750	62
Figura 17	Espectros de absorción de las hemoglobinas modificada y no modificada	63
Figura 18	Dependencia del potencial de ionización del sustrato sobre la actividad específica de la hemoglobina humana	67

Indice de tablas

Tabla I	Actividad benzo[a]pireno hidroxilasa del citocromo P-450 de levadura en sistemas reconstituidos y artificiales	4
Tabla II	Actividad específica y potenciales de ionización de los compuestos aromáticos en la oxidación con lignino peroxidasa	7
Tabla III	Actividad específica del citocromo c de levadura en la oxidación de sustratos aromáticos	8
Tabla IV	Oxidación biocatalítica de HPA's por hemoglobina y H ₂ O ₂	9
Tabla V	Concentración mínima mutagénica (CMM) de hidrocarburos poliaromáticos y sus respectivas quinonas	10
Tabla VI	Efectos generales de los solventes orgánicos en la biocatálisis	11
Tabla VII	Comparación de las peroxidases en la oxidación de metil-fenil-sulfuro	20
Tabla VIII	Oxidación de alquil-aril-sulfuros por la cloroperoxidasa y H ₂ O ₂	21
Tabla IX	Epoxidación de olefinas catalizadas por la cloroperoxidasa	22
Tabla X	Parámetros cinéticos y de producción de oxindoles por la CPO	22
Tabla XI	Oxidación de plaguicidas organofosforados por la CPO de C. fumago	23
Tabla XII	$\Delta\Delta G$ de desplegamiento de la CPO en urea	48
Tabla XIII	Combinación de las variables y condiciones de operación para la reconstitución de la apoCPO	53
Tabla XIV	Constantes cinéticas de la hemoglobina modificada y no modificada contra tiantreno en 15 % de acetonitrilo.	58
Tabla XV	Comparación de las pendientes del modelo de la constante de disociación para la hemoglobina y sus dos reconstituciones	60
Tabla XVI	Constantes cinéticas de la hemoglobina PEG-Met y la hemoglobina sin modificar contra tiantreno en 15 % de acetonitrilo	64
Tabla XVII	Actividad específica (min ⁻¹) de la hemoglobina no modificada y la hemoglobina químicamente modificada contra diferentes HPA's	65
Tabla XVIII	Constantes de disociación para la hemoglobina PEG-Met y para la hemoglobina no modificada	68

1 Antecedentes

1.1 Oxidación biocatalítica de hidrocarburos poliaromáticos por hemoproteínas

Debido al continuo crecimiento del número de compuestos tóxicos generados por nuestra sociedad, en nuestros días se ha intensificado el desarrollo de metodologías y procesos para degradar y destoxificar estos productos que son dispersados en el ambiente. La biotecnología puede tener un impacto benéfico importante sobre el ambiente, por un lado creando procesos a gran escala con tecnologías limpias, y por otro, desarrollando procesos de remediación basados en el uso de microorganismos o sus enzimas.

El uso de enzimas en la transformación de compuestos tóxicos como plaguicidas, herbicidas, colorantes, fenoles, hidrocarburos poliaromáticos, etc. ha sido reportado en numerosas ocasiones como un sistema adecuado de biotratamiento. Además, el desarrollo de técnicas que mejoren la funcionalidad de las enzimas (actividad, especificidad, estabilidad, etc.) en procesos a gran escala potencian la aplicación de éstas en procesos de tratamiento de efluentes tóxicos.

El presente trabajo está enmarcado en la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos por una clase importante de enzimas: las hemoproteínas. Con el objetivo de mejorar las propiedades catalíticas y de estabilidad de estas enzimas, se pueden usar técnicas de modificación genética y química, así como la ingeniería de solventes. Esta última muy importante para mejorar las reacciones con sustratos hidrofóbicos como los hidrocarburos poliaromáticos.

Los hidrocarburos poliaromáticos (HPA's) son constituyentes del petróleo crudo y de materiales derivados del carbón como la creosota o el alquitrán de hulla. Su dispersión en la atmósfera, suelos, superficies de agua y sedimentos, se debe principalmente a los derrames y a la combustión incompleta de combustibles fósiles. Los HPA's son compuestos contaminantes de importancia debido a sus potenciales efectos tóxicos y carcinogénicos (Black , 1983; Kusk, 1981; Pipe *et al*, 1986; Savino *et al.*, 1984). Numerosos son los estudios de los efectos de los HPA's en

los diferentes organismos. A continuación se hace una breve revisión de estudios concernientes a la degradación y destoxificación de los HPA's.

Algunos microorganismos han sido reportados como capaces de llevar a cabo la degradación de estos compuestos (Bezalel *et al.*, 1996; Bogan y Lamar, 1995; Griffoll *et al.*, 1995). La principal dificultad en la degradación de HPA's es su biodisponibilidad, lo que significa que mientras más alto sea el número de anillos bencénicos en un compuesto, disminuye la capacidad de los microorganismos de llevar a cabo su degradación. De esta manera, los HPA's de más de cinco anillos son considerados como recalcitrantes al ataque microbiano. Debido a su alta hidrofobicidad, los HPA's se encuentran en el ambiente adheridos a partículas y/o disueltos en bajas concentraciones por lo que su velocidad de degradación depende, a su vez, de la velocidad a la cual son desorbidos y disueltos en el medio (Volkering *et al.*, 1992).

Una manera efectiva de resolver el problema de la biodisponibilidad es utilizando un surfactante para disminuir la tensión superficial (aumentando el área de contacto) y facilitar con esto la solvatación de compuestos hidrofóbicos. La naturaleza del agente tensoactivo puede ser química o biológica, conocidos estos últimos como biosurfactantes. Grimberg *et al.* (1996), reportaron un aumento en la velocidad de disolución, y en consecuencia, un aumento en la velocidad de degradación del fenantreno por *P. stutzeri*, al utilizar un surfactante no iónico. Por otro lado, Volkering *et al.* (1995) reportaron que la presencia de surfactantes no iónicos aumenta la microdispersión y disponibilidad a la degradación del fenantreno y del naftaleno por cepas bacterianas de *Pseudomonas*. Una forma adicional de disminuir los problemas de transferencia de masa para la degradación de HPA's es utilizando solventes orgánicos miscibles en agua. Sin embargo, estos sistemas son inadecuados para los microorganismos debido a su toxicidad. Este no es el caso para las enzimas, las cuales pueden ser activas en altas concentraciones de solvente orgánico.

Las hemoproteínas, incluyendo las peroxidasas, han sido estudiadas en la oxidación de HPA's (Ortiz-Leon *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1995; Vazquez-Duhalt *et al.*, 1994). Las peroxidasas son

enzimas que poseen a la ferroporfirina IX como grupo prostético. La principal función de estas enzimas es la oxidación de sustratos ligada a la conversión de H_2O_2 en H_2O . El intermediario enzimático de las peroxidases, como la peroxidasa de rábano blanco (HRP), lactoperoxidasa y cloroperoxidasa, formado durante la reacción con peróxido de hidrógeno ha sido descrito como compuesto I, que es una oxo(Fe^{+4})porfirina con un spin de electrones desapareado asociado a cada anillo pirrólico o a algún residuo aminoácido de la periferia de la proteína (figura 1). Para el caso de la HRP, en exceso de H_2O_2 y en presencia de un sustrato reductor, Amao *et al.* (1990) reportaron que el compuesto I puede llevar a dos posibles caminos, dependiendo de la reducción que tome este compuesto: si la reducción es por un electrón se produce el compuesto II y si es por dos electrones se obtiene la enzima en estado basal (figura 1). El mecanismo propuesto en la figura 1 podría aplicarse a otras hemoenzimas como la manganeso peroxidasa, o la ligninasa. En exceso de H_2O_2 o en ausencia de un sustrato oxidable todas la peroxidases son inactivadas por la presencia de H_2O_2 (Aitken *et al.*, 1989; Vazquez-Duhalt *et al.*, 1994). Dos hemoproteínas con actividad peroxidasa, como la hemoglobina y el citocromo c, posiblemente sigan también el mismo mecanismo de reacción que la HRP (Ortiz-Leon *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1995).

El citocromo P-450 es una familia de hemoproteínas presentes en todos los tipos de organismos. Sus funciones abarcan desde la síntesis de esteroides hasta la participación en procesos de desintoxicación. El citocromo P-450 ha sido reportado como capaz de modificar HPA's (Azari *et al.*, 1982; King *et al.*, 1984). King *et al.* (1984) fueron los primeros en reportar la capacidad del citocromo P-450 purificado para formar complejo enzima-sustrato con el benzo[a]pireno para llevarlo a una posterior hidroxilación en presencia de un agente oxidante. Además, reportaron que era posible inducir una enzima más eficiente en su actividad benzo[a]pireno hidroxilasa con la presencia del sustrato poliaromático. En otras palabras, las constantes catalíticas (K_M y V_{max}) podían ser manejadas de acuerdo a la concentración de benzo[a]pireno en el medio de crecimiento.

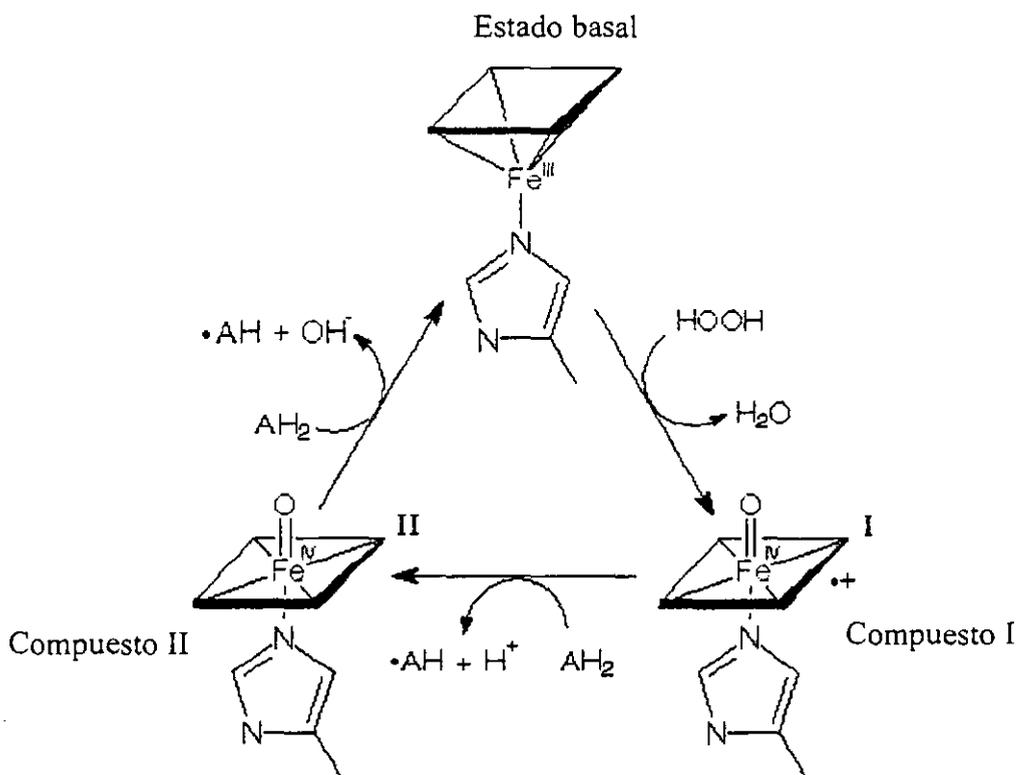


Figura 1.- Ciclo catalítico de las peroxidases (sólo se muestran los compuestos I y II a los que se hace referencia en el texto)

El citocromo P-450 requiere, en forma natural, de un cofactor (NADPH) para su actividad; este requerimiento puede ser reemplazado con el uso de un hidroperóxido como agente oxidante. En la tabla I se muestran los resultados de los cambios en las constantes catalíticas al reemplazar al cofactor por hidroperóxido de cumeno y peróxido de hidrógeno (tabla I).

Tanto el peróxido de hidrógeno como el hidroperóxido de cumeno generaron velocidades de reacción más altas que el sistema soportado por el NADPH. Sin embargo, la afinidad por el sustrato disminuye para ambos sistemas (incremento en la constante de Michaelis-Menten). En los sistemas artificiales con hidroperóxidos hay una generación mayor de quinonas, fenoles y dioles (King *et al.*, 1984).

Tabla I. Actividad benzo[a]pireno hidroxilasa del citocromo P-450 de levadura en sistemas reconstituidos y artificiales

	$K_M(\mu\text{M})$	$V_{\text{max}}(\text{min}^{-1})$
NADPH	33	0.0167
Hidroperóxido de cumeno	125	0.0219
H_2O_2 <i>in situ</i>	200	0.0337

King *et al.* (1984)

Masaphy *et al.* (1995), determinaron las constantes catalíticas de la actividad benzo[a]pireno hidroxilasa del citocromo P-450 en fracciones microsomales y citosólicas, utilizando NADPH como cofactor. Los valores de las constantes de Michaelis-Menten fueron 200 μM y 667 μM para las fracciones microsomales y citosólicas, respectivamente. Estos valores fueron mucho más grandes que los reportados por King *et al.* (1984) para el citocromo P-450 purificado en el mismo sistema de reacción. Seguramente las limitaciones difusionales presentes en las fracciones microsomales y citosólicas disminuyen la afinidad por el sustrato. Sin embargo, la V_{max} de los sistemas de Masaphy *et al.* (1995) fueron considerablemente mayores (0.125 y 0.570 min^{-1} comparada con 0.0167 min^{-1} del citocromo P-450 purificado).

El citocromo P-450 ha sido sometido a modificaciones por ingeniería genética con el propósito de diseñar un biocatalizador con menor especificidad en la hidroxilación. Fowler *et al.* (1994) reportaron que la sustitución de un sólo aminoácido del sitio activo del citocromo P-450 (Tyr96Ala) permite la oxidación de un nuevo sustrato, difenil metano, produciendo un compuesto p-hidroxilado. Modi *et al.* (1995) reportaron que el citocromo P-450 era susceptible de ser modificado químicamente a través del reemplazo de su grupo hemo por otras ferroporfirinas. La reconstitución del citocromo P-450 con el grupo hemo esterificado generó un biocatalizador 60 veces más eficiente medido por el cociente k_{cat}/K_M comparado con el citocromo P-450 con su

dominio del hemo sin modificar. Asimismo, esta modificación presentó una afinidad 4 veces mayor al sustrato utilizado, reflejada en la disminución de la constante de disociación.

La lignino peroxidasa es otra hemoproteína presente principalmente en los hongos lignolíticos y juega un papel importante en la degradación de la lignina. En presencia de H_2O_2 la lignino peroxidasa (ligninasa) es capaz de catalizar la oxidación por un electrón de una variedad amplia de compuestos aromáticos para producir, como productos iniciales, radicales catiónicos que rápidamente son oxidados. Por ejemplo, Sanglard *et al.* (1986) reportaron que la ligninasa es capaz de oxidar benzo[a]pireno *in vitro* en presencia de H_2O_2 para dar lugar a tres productos de oxidación. Hammel *et al.* (1986) reportaron la oxidación del pireno por la ligninasa en un medio de reacción que contenía N, N-dimetilformamida como solvente produciendo principalmente 1,8 y 1,6 pirenodionas. También se reportó la capacidad de esta enzima para degradar 2-clorodibenzo[p]dioxinas y dibenzo[p]dioxinas.

Vázquez-Duhalt *et al.* (1994) reportaron la oxidación *in vitro* de nueve compuestos poliaromáticos por la ligninasa en sistemas que contenían solventes orgánicos miscibles en agua, para disminuir los problemas de transferencia de masa. En la tabla II se muestran los resultados de la actividad específica de la ligninasa junto con los potenciales de ionización de los HPA's. Como se muestra, la ligninasa fue capaz de oxidar aquellos compuestos que tienen un potencial de ionización (P.I) menor a 8 eV. Los autores reportaron que las constantes cinéticas para la oxidación de pireno fueron afectadas negativamente por la concentración de solvente orgánico en el medio.

Otra hemoproteína que participa en la degradación de la lignina es la manganeso peroxidasa, la cual produce iones Mn^{+3} que son altamente reactivos. La habilidad del acetato mangánico de producir oxidaciones por un electrón de benzo[a]pireno y dibenzo[a]pireno y la habilidad de algunos sistemas $Mn(III)-H_2SO_4$ para oxidar algunos HPA's se ha tomado como base para sugerir que compuestos de esta naturaleza pueden ser sustratos también para la manganeso peroxidasa vía la acción de Mn^{+3} (Bogan y Lamar, 1995; Bogan y Lamar, 1996).

Bogan y Lamar (1996) reportaron la oxidación *in vitro* de fluoreno por un sistema de peroxidación de lípidos dependientes de manganeso peroxidasa (MnP) de *P. chrysosporium*, dando lugar al mismo producto que se obtiene al utilizar el hongo completo en cultivo líquido. Los mismos autores (Bogan y Lamar, 1995) reportaron que en el sistema de peroxidación de lípidos dependientes de MnP se podía llevar a cabo la oxidación de diferentes HPA's presentes en la creosota. El porcentaje de degradación presentó una buena correlación con el potencial de ionización. En este sistema fue posible oxidar HPA's con altos potenciales de ionización (como fenantreno, trifenileno, y criseno), los cuales no son sustratos para la lignino peroxidasa.

Tabla II. Actividad específica y potenciales de ionización de los compuestos aromáticos en la oxidación con lignino peroxidasa en 10 % de acetonitrilo.

Sustrato	Actividad específica (seg ⁻¹)	Potencial de ionización (eV)	
		Transferencia de carga	Impacto electrónico
Pentaceno	O.N.E.	6.55	8.69
9-Metilantraceno	3.01	7.23	7.26
Carbazol	1.69	7.20	7.92
1-metilantraceno	1.62	N.D.	7.36
Pireno	0.33	7.72	7.45
Acenafteno	0.28	7.70	7.70
2-metilantraceno	0.25	7.40	7.35
Fluoranteno	0.15	7.76	8.15
Dibenzotiofeno	0.06	7.93	8.14
Criseno	N.R.	8.01	8.12
Fenantreno	N.R.	8.03	8.18
Trifenileno	N.R.	8.19	8.10
Naftaleno	N.R.	8.25	8.19
1-Metilnaftaleno	N.R.	8.50	7.97
Fluoreno	N.R.	8.52	8.03
1,3-Difenilpropano	N.R.	8.60	8.53
Dibenzofurano	N.R.	7.77	8.42
Bifenilo	N.R.	8.80	8.46

Vázquez-Duhalt *et al.*, 1994.

O.N.E. Oxidación no enzimática

N.R. no reaccionó

N.D. no disponible

El citocromo c es una hemoproteína con actividad peroxidasa capaz de catalizar la oxidación de algunos sustratos tóxicos como benceno, o-metoxifenol, compuestos heterocíclicos azufrados y compuestos poliáromáticos, en presencia de H₂O₂ como agente oxidante (Akasaka *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 1995; Vazquez-Duhalt *et al.*, 1993) . El citocromo c presenta varias ventajas como biocatalizador: es activo en un amplio rango de pH (de 2 a 11), tiene su grupo hemo covalentemente unido a la proteína (lo cual permite su permanencia en la proteína en presencia de solvente orgánico), es activo a altas concentraciones de solvente orgánico y es relativamente barato (Vazquez-Duhalt, 1999).

En trabajos anteriores (Torres *et al.*, 1995) se determinaron las actividades catalíticas del citocromo c en la oxidación de diferentes compuestos aromáticos. En la tabla III se reproducen los resultados reportados. El citocromo c fue capaz de catalizar la oxidación de cinco de estos compuestos aromáticos; sin embargo, la oxidación de aromáticos por citocromo c no presentó una correlación con el potencial de ionización, como en el caso de la ligninasa. Por ejemplo, el citocromo c oxidó al dibenzotiofeno (P.I. 7.93 eV) y no catalizó la oxidación del acenafteno, ni del fluoranteno (P.I. de 7.7 y 7.76 eV, respectivamente).

Tabla III. Actividad específica del citocromo c de levadura en la oxidación de sustratos aromáticos.

Sustrato	Actividad específica (min ⁻¹)
Dibenzotiofeno	3.18 (± 0.11)
Antraceno	2.08 (± 0.13)
Pireno	1.28 (± 0.32)
Benzotiofeno	0.99 (± 0.23)
Carbazol	0.87 (± 0.11)
Fenantreno	N.R.
Criseno	N.R.
Fluoranteno	N.R.
Fluoreno	N.R.

Torres *et al.* (1995)
 N.R. no reaccionó

Con el objetivo de aumentar la versatilidad del citocromo c, para incrementar el número de sustratos susceptible a la oxidación, así como el de aumentar la actividad catalítica, se le realizaron diferentes modificaciones por ingeniería de proteínas (Akasaka *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1994). Akasaka *et al.* (1994) inmovilizaron al citocromo c en poli-g-metil-L-glutamato dándole la capacidad de oxidar benceno en un sistema con bajo contenido de agua. La constante catalítica del citocromo c inmovilizado fue similar a la del citocromo P-450 y, al parecer, el mecanismo de reacción podría ser el mismo para ambas proteínas. Un ejemplo de la modificación de la actividad catalítica del citocromo c fue reportada por Fujita *et al.* (1994) en el que el citocromo c al ser unido a una bicapa de fosfolípidos aumentó considerablemente su actividad para oxidar o-metoxifenol (10 veces más activo respecto al citocromo en forma libre).

La hemoglobina es otra hemoproteína que contiene cuatro grupos ferroporfirinas por molécula y es capaz de oxidar algunos sustratos poliaromáticos. En la tabla IV se muestran los resultados reportados por Ortiz-Leon *et al.* (1995). La hemoglobina fue capaz de oxidar fluoreno (P.I. 7.91 eV), el cual no fue oxidado por la ligninasa, ni por el citocromo c. La naturaleza de los productos indica que probablemente el mecanismo de reacción sea el mismo para las tres proteínas (Ortiz-Leon *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1995; Vazquez-Duhalt *et al.*, 1994). La comparación de las constantes catalíticas en la oxidación del pireno por la ligninasa, el citocromo c y la hemoglobina colocan a la primera como el mejor biocatalizador (2.6 s^{-1} , 0.13 s^{-1} y 0.15 s^{-1} , respectivamente).

Por lo anteriormente expuesto, podemos decir que la modificación biocatalítica de hidrocarburos polinucleararomáticos por hemoproteínas se presenta como una alternativa interesante para la disminución de la toxicidad de estos compuestos. La naturaleza de los productos es de una mayor facilidad a la degradación posterior por bacterias u otros microorganismos (Meulenberg *et al.*, 1997), y su toxicidad es cientos de veces inferior siendo muchos de ellos no mutagénicos (Durant *et al.*, 1996) (tabla V).

Tabla IV. Oxidación biocatalítica de HPA's por hemoglobina y H₂O₂

Sustrato	Potencial de ionización (eV)	Reactivo transformado (%)
9-Hexilantraceno	N.D.	100.0
Antraceno	7.55	91.2 (± 4.4)
Carbazol	7.20	83.9 (±27.8)
Pireno	7.72	73.9 (± 0.9)
Dibenzotiofeno	7.93	48.9 (±30.7)
Fluoreno	8.52	N.R.
Dibenzofurano	8.77	N.R.

Ortiz-Leon *et al.* (1995)

N.D. no disponible

N.R. no reaccionó

Tabla V. Concentración mínima mutagénica (CMM) de hidrocarburos poliaromáticos y sus respectivas quinonas.

Compuesto	CMM (ng/ml)
Ciclopenta(cd)pireno	1.8
Ciclopenta(cd)pireno-3-diona	2600
Fenantreno	N.M.
Fenantrenodiona	N.M.
Benzo[a]antraceno	570
Benzo[a]antracenodiona	N.M.
Criseno	750
Criseno quinona	N.M.
Benzo[a]pireno	14
1,6-Benzo[a]pirenodiona	N.M.
3,6-Benzo[a]pirenodiona	N.M.
4,5-Benzo[a]pirenodiona	N.M.

Durant *et al.* (1996)

N.M. No mutagénica

1.2 Biocatálisis en solventes no acuosos

El uso de solventes orgánicos como medios de reacción para reacciones biocatalíticas ha probado ser un sistema extremadamente útil para expandir el rango y la eficiencia de las aplicaciones prácticas de la biocatálisis (Khmelnitski y Rich, 1999). La tabla VI resume las principales ventajas y desventajas de la biocatálisis en medio orgánico. En años recientes la investigación en esta área está progresando significativamente, particularmente en la elucidación de las propiedades estructurales de la enzima en ambientes no acuosos, en el mejoramiento de las propiedades catalíticas, en el diseño de nuevos tipos de medios de reacción y, eventualmente, en la implementación de estos desarrollos en aplicaciones a gran escala.

Tabla VI. Efectos generales de los solventes orgánicos en la biocatálisis

Principales ventajas

- Alta solubilidad de sustratos hidrofóbicos**
- Incremento de la regio-, enantio- y estereoespecificidad**
- Ajuste del equilibrio químico**
- Eliminación de la contaminación microbiana**
- Mejoramiento de la termoestabilidad de las enzimas**
- Reducción de las reacciones laterales encontradas en agua**

Principales desventajas

- Disminución de la actividad enzimática**
 - Los solventes polares pueden actuar como desnaturalizantes**
 - Inactivación en la interfase en sistemas de dos fases**
-

Una de las preguntas más importantes en la biocatálisis en medios orgánicos es porqué las enzimas son menos activas al ser transferidas del medio acuoso a los solventes orgánicos. Numerosos trabajos han contribuido a responder esta pregunta desde diferentes perspectivas, descritas brevemente a continuación. Inicialmente los trabajos se enfocaron a determinar si los cambios estructurales de las enzimas expuestas al solvente orgánico eran los responsables de la disminución de la actividad. Trabajos con la en diferentes solventes orgánicos mostraron que, sin importar en qué solvente se encontraba la enzima, la estructura terciaria y secundaria era virtualmente idéntica (Schmitke *et al.*, 1997; Griebenow y Klibanov, 1997).

La estabilización del estado basal del sustrato, la energía del estado de transición y las intensidades de las interacciones enzima-sustrato pueden ser significativamente afectadas por el solvente orgánico. Estos efectos han sido cuantitativamente determinados en varios trabajos como responsables parcialmente de la reducción en la actividad enzimática (Xu *et al.*, 1994; Wangikar *et al.*, 1995; Schmitke *et al.* 1996). El problema puede ser resuelto con la selección adecuada del sistema de solventes a utilizar; esta selección deberá estar basada principalmente en las propiedades termodinámicas del solvente que disminuyan la energía de desolvatación del sustrato, incrementándose así las interacciones enzima-sustrato y favoreciendo la estabilización del estado de transición.

La incapacidad de la mayoría de los solventes orgánicos de formar los múltiples puentes de hidrógeno que forma el agua con la proteína, por un lado, y la baja constante dieléctrica de los sistemas no acuosos, por otro lado, provocan que la flexibilidad de una enzima en sistemas con baja actividad de agua esté significativamente disminuida. La baja flexibilidad de las enzimas o su alta rigidez trae como consecuencia que las enzimas sean menos activas, aunque, como ha sido reportado, su termoestabilidad sea más alta (Zaks y Klibanov, 1988). Las reacciones llevadas a cabo a condiciones óptimas de actividad de agua, con solventes hidrofóbicos (poca capacidad de secuestrar las moléculas de agua), el uso de solventes o aditivos con capacidad de formación de enlaces de hidrógeno, o solventes sin capacidad de secuestrar el agua (hidrofóbicos) pueden ayudar a aumentar la actividad catalítica de las enzimas en medios no convencionales (Zaks y Klibanov, 1988; Kitaguchi y Klibanov, 1989; Halling, 1994).

Otro aspecto de importancia que debe tomarse en cuenta para evitar la caída en la actividad catalítica en medios con baja actividad de agua es el estado de protonación de la enzima. En sistemas acuosos la actividad biocatalítica es altamente dependiente del estado de protonación de los grupos ionizables de la proteína, y dado que en solventes orgánicos el pH no tiene un significado real, el estado de protonación estará controlado por el pH de la solución acuosa a la cual estuvo la proteína expuesta previamente a su liofilización. Este fenómeno fue nombrado como "memoria al

pH ". Es decir, el comportamiento biocatalítico de la enzima en solventes orgánicos estará en función del pH de la última solución acuosa a la cual fue expuesta. El fenómeno de "memoria al pH" fue cuantitativamente elucidado en base a estudios de espectroscopia de infrarrojo de Fourier; el estado de ionización de diferentes compuestos modelos que contenían grupos funcionales encontrados en las proteínas (grupos amino, carboxilos y fenólicos) fue determinado en estado sólido después de ser liofilizados a diferentes valores de pH. Los valores de pK_a de los compuestos modelos fueron muy similares (0.3 unidades de diferencia) en solución acuosa y en estado liofilizado. Esto significa que la remoción de agua por liofilización no afecta el estado de ionización de grupos cargados (Constantino *et al.*, 1997).

La elucidación de algunas de las causas de la disminución de la actividad catalítica de las enzimas en medio orgánico ha llevado al planteamiento de nuevas estrategias con el propósito de mejorar la funcionalidad de las enzimas en estos sistemas. Una estrategia utilizada en constante crecimiento es la modificación de las propiedades del medio de reacción, denominada **ingeniería de solventes**, la cual ha contribuido notablemente a mejorar las propiedades catalíticas de las enzimas como la especificidad, selectividad, estabilidad y la termoestabilidad. Millquist-Fureby *et al.* (1997) reportaron recientemente que el uso de soluciones metaestables sobresaturadas de carbohidratos como medio de reacción para reacciones de glicosilación, donde el azúcar sirve como medio de reacción (disminuye la actividad termodinámica del agua) y sustrato al mismo tiempo. Las enzimas ensayadas fueron activas hacia la reacción de síntesis y no para la de hidrólisis.

Otra estrategia empleada para incrementar la actividad catalítica en solventes orgánicos ha sido la aplicación del **estampado biomolecular**; es decir, la inducción de una mejor conformación estructural del sitio activo de la enzima para un determinado. La conformación inducida se logra a través del acomplejamiento de la enzima en solución con una ligando químicamente similar al sustrato pero que no produzca reacción. La remoción del ligando en solvente anhidro mantiene el sitio activo de la enzima en una conformación estructural de mayor afinidad para el sustrato de interés. Como resultado de este procedimiento tres proteínas, albúmina,

papaína, y lactoglobulina mostraron actividad catalítica en reacciones de β -eliminación en acetonitrilo, mientras que las mismas proteínas no sometidas a ese tratamiento no mostraron actividad para la misma reacción (Ohya *et al.*; 1996; Slade y Vulfson, 1998).

Finalmente, la **ingeniería de proteínas**; es decir, el mejoramiento del comportamiento enzimático por modificación de la naturaleza del biocatalizador, esto incluye, inmovilizaciones del biocatalizador, el acomplejamiento de las enzimas con lípidos o surfactantes, las modificaciones químicas, genéticas o ambas de la proteína (De Santis y Jones, 1999).

1.3 Limitaciones de transferencia de masa en la oxidación de HPA's

En sistemas acuosos hidrofílicos la interacción entre el sitio activo de la enzima y el medio se ve favorecido al incrementarse la hidrofobicidad del sustrato, siempre y cuando el ambiente protéico del sitio activo sea hidrofóbico. Esto resulta en una mayor afinidad por el sustrato y una mayor actividad catalítica al incrementarse la hidrofobicidad del sustrato (Backes *et al.*, 1993; Khatisashvili *et al.*, 1997; Satoh *et al.*, 1999). Por otro lado, la biocatálisis con solventes orgánicos obedece al proceso contrario: el aumento de la hidrofobicidad del sustrato disminuye la interacción con el sitio activo de la enzima (Torres *et al.* 1996). Es decir, la biocatálisis con sustratos hidrofóbicos en sistemas orgánicos está limitada por la partición del sustrato hidrofóbico hacia el solvente, lo cual disminuye tanto la actividad catalítica como la afinidad por el sustrato (Ryu y Dordick, 1992; Wangikar *et al.*, 1995).

Como resultado de los trabajos desarrollados en nuestro laboratorio fue posible demostrar que la biocatálisis con sustratos hidrofóbicos, como los compuestos aromáticos, está seriamente limitada por la partición del sustrato entre el sitio activo y el solvente. En un inicio al aumentar la concentración de solvente orgánico la actividad específica aumenta hasta un máximo, ya que se disminuyen los problemas de transferencia de masa. A concentraciones de solvente mayores, y después de alcanzar ese máximo, la actividad disminuye debido a la disminución de la interacción entre el sitio activo y el sustrato (figura 2 y 3). Este comportamiento fue similar para los diferentes

sustratos ensayados, pero los máximos de afinidad y actividad estuvieron en función de la hidrofobicidad del sustrato: a mayor hidrofobicidad del sustrato, menor la actividad biocatalítica del citocromo c.

Como se muestra en la figura 2 el citocromo c conserva el 50% de su actividad máxima a concentraciones de solvente tan altas como 60% de tetrahidrofurano (THF) cuando el sustrato es hidrofílico (cloruro de pinacianol), mientras que únicamente conserva el 50% de su actividad máxima a 20% de THF cuando el sustrato es hidrofóbico (pireno). Es decir, a determinada concentración de solvente el sustrato deja de interactuar con el sitio activo, limitando la reacción enzimática. Esto se demostró con diferencia de espectros del complejamiento del citocromo c con dos sustratos de hidrofobicidad variada (figura 3). Como se muestra, el citocromo forma un complejo con ambos sustratos, medido como la diferencia en el espectro de absorción en la banda Soret del citocromo en ausencia y presencia del sustrato, el cual disminuye al incrementar la concentración de tetrahidrofurano. El aumento de la concentración de solvente no afecta la estructura tridimensional del citocromo c (Wu y Gorenstein, 1993). En conclusión, la C_{50} (concentración de solvente a la cual se observa el 50% de la actividad máxima) resultó ser una función de la hidrofobicidad del sustrato (Torres *et al.*, 1997 y Torres, 1998) y no del poder de desnaturalización del solvente, como había sido reportado previamente (Khmelnitsky *et al.*, 1991).

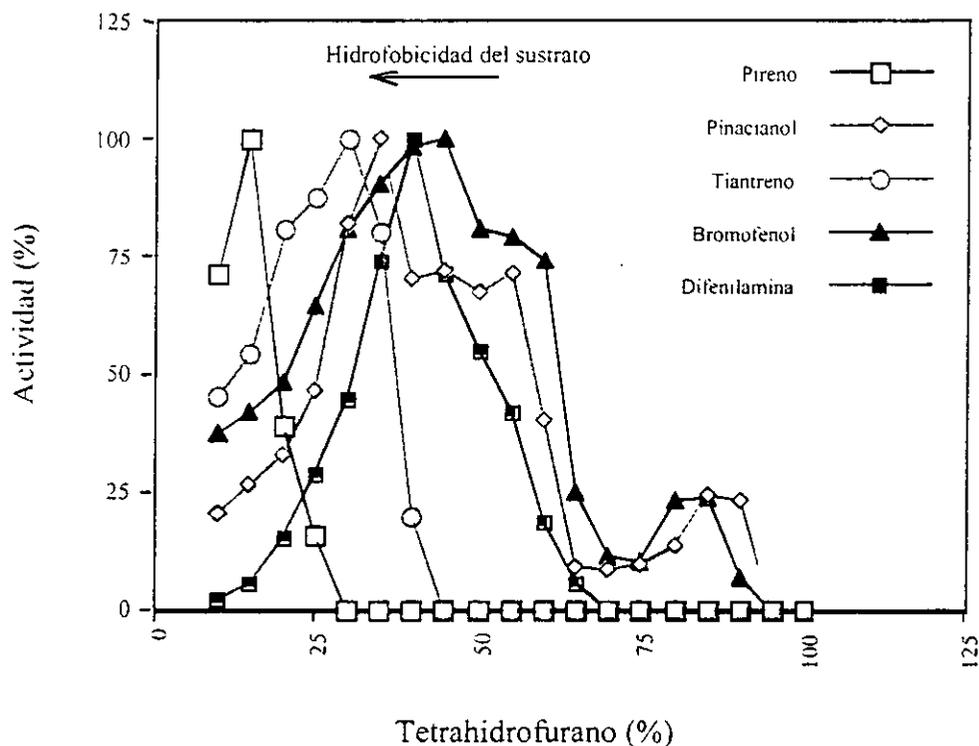


Figura 2. Efecto de la concentración de tetrahidrofurano y la hidrofobicidad del sustrato en la biocatálisis con citocromo c (Torres *et al.*, 1997).

Ryu y Dordick (1992) reportaron que la oxidación de sustratos fenólicos con la peroxidasa de rábano blanco en solventes orgánicos está limitada principalmente por la estabilización del estado basal del sustrato, o en otras palabras, la desestabilización del complejo enzima-sustrato en solventes orgánicos comparada con el sistema acuoso. Esta estabilización del sustrato se manifestó por un incremento significativo de la K_M , lo cual redujo hasta en cuatro órdenes de magnitud la eficiencia catalítica de la peroxidasa, comparada con el sistema en ausencia de solvente. Los autores concluyeron que la enzima puede mantener casi la totalidad de su estructura tridimensional en solventes orgánicos y que el efecto del solvente sobre la termodinámica del sustrato debe ser considerado en la biocatálisis en solventes orgánicos.

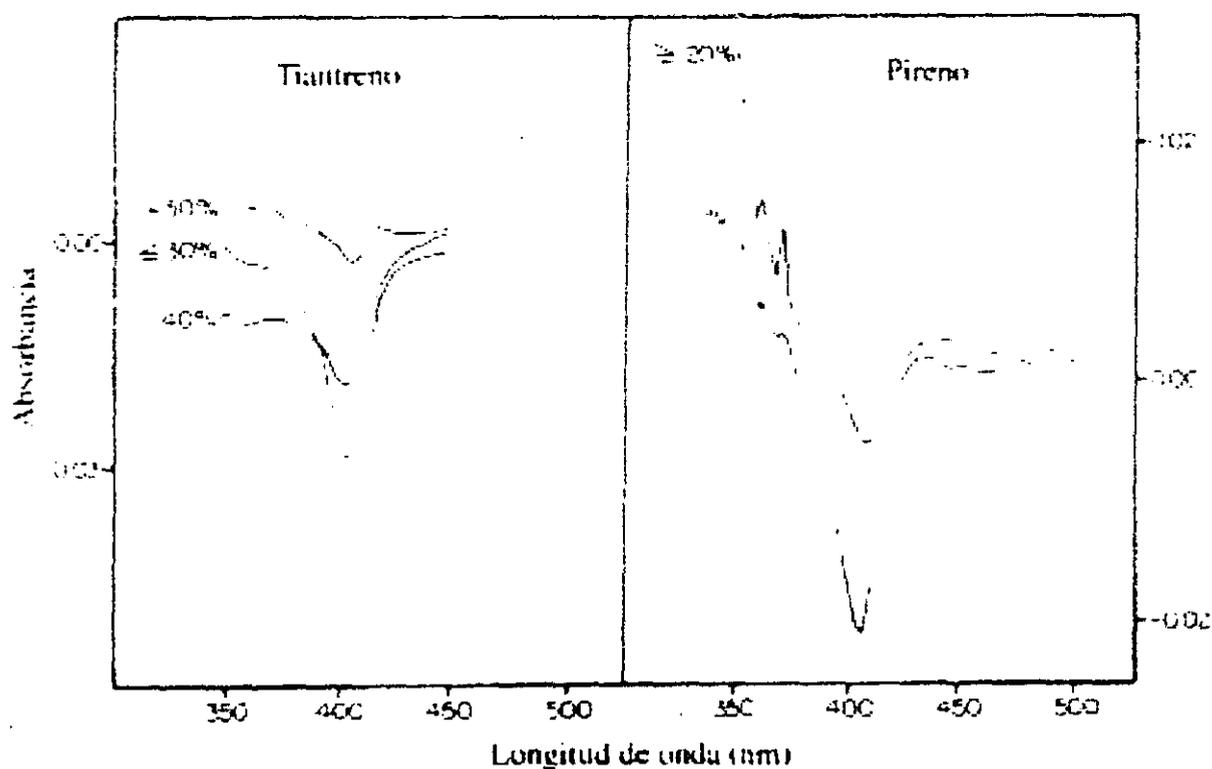


Figura 3.- Espectro de diferencia del citocromo c con tiantreno y pireno a diferentes concentraciones de tetrahidrofurano

Wangikar *et al.* (1995) reportaron que la biocatálisis con quimotripsina en solventes orgánicos es dependiente del solvente, del sustrato y de la hidrofobicidad del sitio activo, y por ende, es modificable variando cualquiera de estas variables. De esta manera, comprobaron que el aumento de la hidrofobicidad del sustrato disminuye la eficiencia catalítica en solventes orgánicos hidrofóbicos debido a la partición desfavorable del sustrato entre el sustrato y el solvente. Sin embargo, con solventes hidrofílicos (como agua, acetona, alcoholes, etc) el aumento de la hidrofobicidad del sustrato favorece la partición de éste hacia el sitio activo y, por lo tanto, la eficiencia catalítica aumenta.

En conclusión, en la biocatálisis con solventes orgánicos es posible modificar la partición del sustrato hacia el sitio activo por ingeniería de solventes, ingeniería genética y por modificación química de la enzima.

1.4. La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*

La cloroperoxidasa (CPO) es una glicoproteína extracelular producida por el hongo filamentoso *Caldariomyces fumago* con un peso molecular aproximado de 42 000 Da. La actividad principal de la cloroperoxidasa como enzima son las reacciones de halogenación; sin embargo, además presenta actividad catalítica de peroxidasa, monooxigenasa y catalasa (figura 4). Debido a esto, la CPO es la más versátil de las hemoenzimas conocidas y ha sido objeto de múltiples investigaciones acerca de su estructura y función como biocatalizador. La cloroperoxidasa posee características propias de las peroxidases y, como ha sido reportado por Sundaramoorthy *et al.* (1995), características similares a las del citocromo P-450 (figura 9, al final de la introducción). El campo de reacciones catalizadas por la CPO es muy amplio, incluye, entre otras, epoxidación de alquenos, oxidación de sulfuros a sulfóxidos, oxidación de alcoholes a aldehídos, dealquilación de alquilaminas, halogenación de β -dicetonas, etc. A continuación se hace una descripción más detallada de las características estructurales y catalíticas que hacen de la CPO un biocatalizador atractivo.

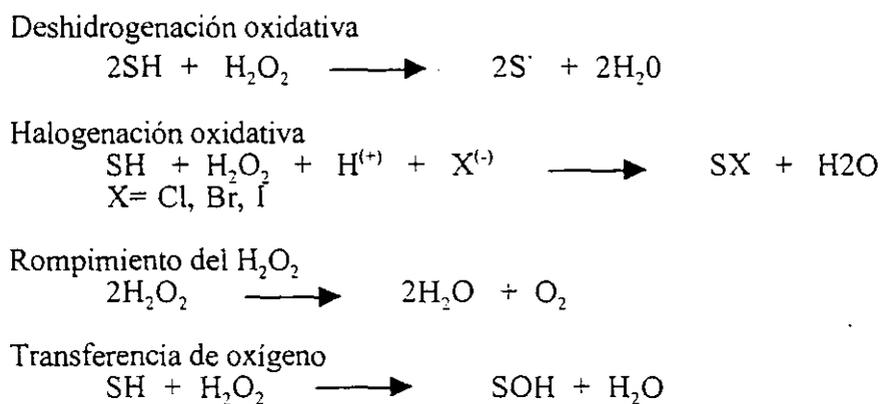


Figura 4.- Actividades catalíticas de la cloroperoxidasa de *C. fumago*

1.4.1 Ambiente proteico del hemo

El grupo prostético de la cloroperoxidasa es la ferropotoporfirina IX, la cual está unida a la proteína principalmente por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Los grupos nitrógeno de los grupos pirrólicos proveen los cuatro ligantes ecuatoriales del hierro, mientras que la naturaleza del quinto ligante corresponde al grupo tiol de la cisteína 29, a diferencia del resto de las peroxidases en las que el grupo axial cercano es una histidina (Sundaramoorthy *et al.*, 1995). De la misma manera que en el citocromo P-450, el grupo tiol de la cisteína en la CPO funciona como un fuerte donador de electrones interno que facilita el rompimiento del enlace O-O que da lugar al compuesto I de las peroxidases (figura 1). En consecuencia con este hecho, la biocatálisis se favorece. La parte distal del hemo de la CPO está ocupada por una molécula de solvente, la cual está demasiado lejos, 3.4 Å, como para formar un enlace axial fuerte. Debido a lo anterior, el hierro de la cloroperoxidasa presenta un estado pentacoordinado de alto spin. El sitio activo de la CPO es de carácter polar, como en la mayoría de las peroxidases, y el aminoácido involucrado en la catálisis de rompimiento del enlace O-O es el ácido glutámico 183, mientras que en el resto de las peroxidases el aminoácido involucrado en la catálisis es la histidina. La histidina en la CPO está posiblemente involucrada en la orientación adecuada del Glu 183 y en proveer interacciones del tipo polar (Sundaramoorthy *et al.*, 1995).

La estructura cristalográfica de la CPO muestra que tanto los contornos como el hierro del hemo están accesibles al sustrato, aunque en una dimensión diferente; es decir, el acceso al hierro está limitado a sustratos pequeños, mientras que el acceso a los contornos presenta mayor tamaño. Esto resulta en una enzima capaz de reconocer un amplio número de sustratos de diversa naturaleza química, lo que la hace un biocatalizador muy atractivo principalmente para la industria de síntesis.

1.4.2 Reacciones de oxidación de la cloroperoxidasa

Oxidación de heteroátomos.- Una de las reacciones más estudiadas de la CPO es la oxidación de sulfuros para producir sulfóxidos quirales, utilizando al peróxido de hidrógeno como

agente oxidante. Los sulfuros quirales son compuestos de alto interés en la industria farmacéutica y de síntesis. En la tabla VII se reproducen los resultados de la comparación de la CPO con otras peroxidases capaces de catalizar la oxidación del metil-fenil-sulfuro (Colonna *et al.*, 1990, 1993, 1994; Miller *et al.*, 1992).

Tabla VII. Comparación de las peroxidases en la oxidación de metil-fenil-sulfuro (Colonna *et al.*, 1990, 1994, 1995; Miller *et al.*, 1992).

Enzyme	Conversión (%)	ee ^a (%)	Actividad específica (min ⁻¹)
CPO	100	98 (R)	1050
HRP	95	46 (S)	0.48
LPO	40	52 (R)	0.54
MP-11	45	3 (S)	0.06

^a exceso enantiomérico

Como se muestra, la CPO es un enzima realmente atractiva para la conversión de sulfuros a sulfóxidos quirales debido a su alta actividad catalítica y a su habilidad de producir prácticamente puro al enantiómero deseado, a diferencia de las demás peroxidases, en las que su actividad catalíticas es hasta seis órdenes de magnitud menor y el enantiómero no es producido con la pureza requerida. En la tabla VIII se exponen los resultados de la biocatálisis de la CPO contra diferentes sulfuros (Colonna *et al.*, 1990). Como se aprecia la CPO es capaz de reconocer como sustratos diferentes alquil-aril-sulfuros, y aunque en algunos casos la enantioselectividad y la conversión fueron bajas, el problema puede ser resuelto al eliminar las trazas de diferentes óxidos de metales que catalizan la oxidación de los sulfuros sin ninguna selectividad. La eliminación de estos óxidos llevó a la producción del enantiómero puro en altas conversiones.

Oxidación de alquenos.- Los epóxidos ópticamente activos son moléculas de interés en la industria de síntesis de compuestos bifuncionales; además, son intermediarios claves en la producción de compuestos quirales bioactivos o como productos finales con actividad biológica. A

causa de la importancia de los epóxidos en la industria de síntesis, numerosos trabajos se han encaminado a su producción masiva.

Tabla VIII.- Oxidación de alquil-aril-sulfuros por la cloroperoxidasa y H_2O_2

Sulfuro R_1-S-R_2		Conversión (%)	ee (%)
R_1	R_2		
<i>p</i> - $CH_3C_6H_4$	CH_3	98	91
<i>p</i> - $CH_3C_6H_4$	C_2H_5	50	68
<i>p</i> - $CH_3C_6H_4$	C_3H_7	53	5
<i>o</i> - $CH_3C_6H_4$	CH_3	27	31
<i>p</i> - $CH_3OC_6H_4$	CH_3	72	90
<i>o</i> - $CH_3C_6H_4$	CH_3	24	27
C_6H_5	CH_3	100	98
<i>o</i> - ClC_6H_4	CH_3	33	85
2-Piridil	CH_3	100	99

Colonna *et al.*, 1993

El uso de la CPO para producir epóxidos se presenta como una alternativa prometedora. La oxidación de alquenos catalizada por la CPO se resume en la tabla IX (Zaks y Dodds, 1995). Como se muestra, la enantioselectividad puede llegar hasta el 100% con buenas conversiones para *cis*-alquenos pequeños de hasta 9 carbonos con el enlace doble cerca al carbono terminal. En contraste, la epoxidación de *trans*-alquenos y alquenos terminales da muy bajas producciones de los epóxidos puros debido principalmente a la inactivación de la enzima por alquilación del hemo.

Oxidación de indoles.- La oxidación de indol e indoles sustituidos, catalizada por la CPO en presencia de hidroperóxidos para obtener oxindoles es un método más eficiente y rápido que la obtención de los mismos por métodos químicos. En la tabla X se muestran los resultados de la oxidación de indoles sustituidos por la CPO (van Deurzen, 1996). Como se muestra, a escala preparativa se obtienen altas purzas y excelentes producciones de los oxindoles. La catálisis con CPO en la oxidación de indoles es dependiente de la posición y la naturaleza del sustituto;

particularmente, la sustitución en las posiciones 5 y 6 disminuye significativamente la interacción de la enzima con el indol, afectando con esto la eficiencia catalítica.

Tabla IX. Epoxidación de olefinas catalizadas por la cloroperoxidasa

Olefina	Enantioselectividad (%)	Conversión (%)
cis-2-Hepteno	95	100
cis-3-Hepteno	99	40
cis-3-Octeno	95	20
cis-2-Noneno	94	20
2-metil-1-hepteno	95	23
trans-2-Hepteno	3	38
cis-1-Hepteno	10	2
trans-3-Hepteno	0	<2
Estireno	49	40

Zaks y Dodds, 1995.

Tabla X.- Parámetros cinéticos y de producción de oxindoles por la CPO

Derivado del indol	Conversión (%)	Pureza (%)	k_{cat} (seg ⁻¹)(mM)	K_M
Indol	96	96	250	22
4-Cl	70	76	160	200
5-Cl	99	99	84	24
5-OCH3	93	95	475	400
6-Cl	96	99	263	75

van Deurzen, 1996

Oxidación de plaguicidas organofosforados.- La cloroperoxidasa es capaz de catalizar la oxidación de compuestos tóxicos como los pesticidas organofosforados. En la tabla XI se muestra la actividad específica de la CPO contra diferentes plaguicidas (Hernandez *et al.*, 1998). Los compuestos producidos son los respectivos oxones, los cuales son productos más tóxicos que inhiben directamente la función de la acetilcolinesterasa, llevando a graves efectos disfuncionales del sistema nervioso.

Tabla XI .- Oxidación de plaguicidas organofosforados por la CPO de *C. fumago* (Hernández *et al.*, 1998)

Compuesto	Actividad específica (seg ⁻¹)
Paratión	5.58 ± 0.04
Terbufos	5.03 ± 0.58
Diclorofention	4.19 ± 0.06
Cloropirifos	3.37 ± 0.79
Azinofosmetil	2.73 ± 0.35
Dimetoato	2.43 ± 0.26
DEF	N.R.
Fosfamidón	N.R.
Triclorofon	N.R.

N.R. no reaccionó

Otras reacciones catalizadas por la CPO.- La cloroperoxidasa es también capaz de catalizar la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos, y en algunos casos la oxidación continúa hasta el ácido (Geigert *et al.*, 1983). Otra reacción catalizada por la CPO es la hidroxilación selectiva de hidrocarburos cíclicos y alquenos en presencia de H₂O₂ (Zaks y Dodds, 1995). La mezcla de productos obtenidos contiene principalmente los alcoholes, aunque también se producen aldehídos y en pocas ocasiones la oxidación llega hasta el ácido respectivo.

1.5. La hemoglobina humana como biocatalizador

La hemoglobina es la proteína transportadora de oxígeno en la sangre. Está compuesta de cuatro subunidades (dos unidades α y dos β), las cuales están unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo hemo unido a la proteína por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, principalmente. El ligando axial cercano al fierro del grupo hemo es el grupo imidazol de la histidina, y el ligando lejano se encuentra también ocupado por otra histidina débilmente unida que se mueve ligeramente para auxiliar en la ligación de la molécula de oxígeno con el fierro.

La hemoglobina fue la primera proteína para la cual la estructura tridimensional por rayos-x fue determinada. La molécula de hemoglobina es prácticamente esférica, con un diámetro de 55 Å. Las cuatro subunidades están empaquetadas en un arreglo tetrahédrico. Los grupos hemo están localizados en cavidades de aminoácidos cercanos a la superficie, con los propionatos en el exterior de la proteína (figura 10 al final de la introducción). Cada cadena α está en contacto con ambas unidades β , por lo tanto, existe poca interacción entre ambas unidades α o entre las dos unidades β . Cada subunidad α y β presenta una alta similitud estructural con la molécula de la mioglobina, proteína transportadora de oxígeno, en la que las ocho α -hélices de cada subunidad son virtualmente superponibles a las α -hélices de la mioglobina.

El ambiente proteico de la hemoglobina alrededor del grupo hemo es de naturaleza no polar, como en la mioglobina, y seguramente, el acceso de los sustratos al hemo es similar también al de la mioglobina, en donde los bordes del hemo interactúan con las moléculas de sustrato.

Pocos trabajos han sido reportados sobre la hemoglobina como biocatalizador. Como fue descrito anteriormente, en presencia de peróxido de hidrógeno la hemoglobina (una proteína no diseñada por la naturaleza para funcionar como biocatalizador) es capaz de catalizar la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos (Ortiz-Leon *et al.*, 1995). También ha sido reportado la oxidación de anilinas (Mieyal *et al.*, 1976), lípidos (Yoshida *et al.*, 1994), alquenos (Catalano y Ortiz de Montellano, 1987), y algunos compuestos azufrados (Klyachko y Klibanov, 1992; Alvarez y Ortiz de Montellano, 1992).

Otra característica que hace atractiva a la hemoglobina como biocatalizador es que es activa a concentraciones tan altas de solvente orgánico como el 99% de etanol, 1,2-propanodiol, etilenglicol, metanol, 1,3-propanodiol, 1,2-butanodiol, 2-metoxietanol, formamida, 2,3-butanodiol, 1-propanol, aunque las velocidades de reacción y las conversiones de sustrato son bajas (Klyachko y Klibanov, 1992). Sin embargo, a concentraciones más bajas de solvente, la actividad específica de la hemoglobina contra dibenzotiofeno es mayor que algunas peroxidasas como la de rábano blanco y la lactoperoxidasa (Klyachko y Klibanov, 1992). Incluso, la

hemoglobina es capaz de catalizar la oxidación de moléculas no reconocidas como sustratos para otras hemoproteínas (Vazquez-Duhalt, 1997).

1.6. Modificación química de proteínas

Las aplicaciones potenciales de las enzimas como biosensores, como fármacos, como catalizadores en el procesamiento de alimentos, en detergentes y en procesos de biorremediación han requerido del desarrollo de técnicas que permitan mejorar sus propiedades catalíticas. Dentro de estas técnicas, la modificación química de las enzimas ha sido usada exitosamente para mejorar el desempeño de la biocatálisis (DeSantis y Jones, 1999).

1.6.1. Entrecruzamiento de proteínas cristalinas

Uno de los desafíos para la implementación práctica de enzimas como biocatalizadores es el incrementar su estabilidad (hacia el medio de reacción-solvente orgánico-, temperatura, pH extremos, etc). En este sentido, el entrecruzamiento de enzimas con enlaces inter e intramoleculares utilizando reactivos bi y polifuncionales ha sido ampliamente utilizado (figura 5). El uso de glutaraldehído para el entrecruzamiento fue inicialmente reportado por Quioco y Richards (1964), quienes emplearon este procedimiento para estabilizar a la carboxipeptidasa con el fin de determinar su estructura por rayos x. El éxito de este procedimiento llevo al entrecruzamiento de la termolisina, previamente cristalizada, para obtener un cristal catalítico insoluble (CLEC, por sus siglas en inglés), el cual incrementó significativamente su estabilidad reteniendo un alto nivel de actividad enzimática (St. Clair y Navia, 1992)

La modificación de la Subtilisina en CLEC elimina barreras que existían para la síntesis de péptidos con enzimas: autodigestión de la enzima y la poca estabilidad al solvente orgánico. La síntesis de péptidos basada en la biocatálisis con CLEC's es más eficiente comparada con el procedimiento con la enzima sin modificar ya que genera menos desechos y produce el péptido

deseado con un alto rendimiento y con una alta pureza diastereomérica, aun cuando se suministre una mezcla racémica de aminoácidos como sustratos (Wang *et al.*, 1996).

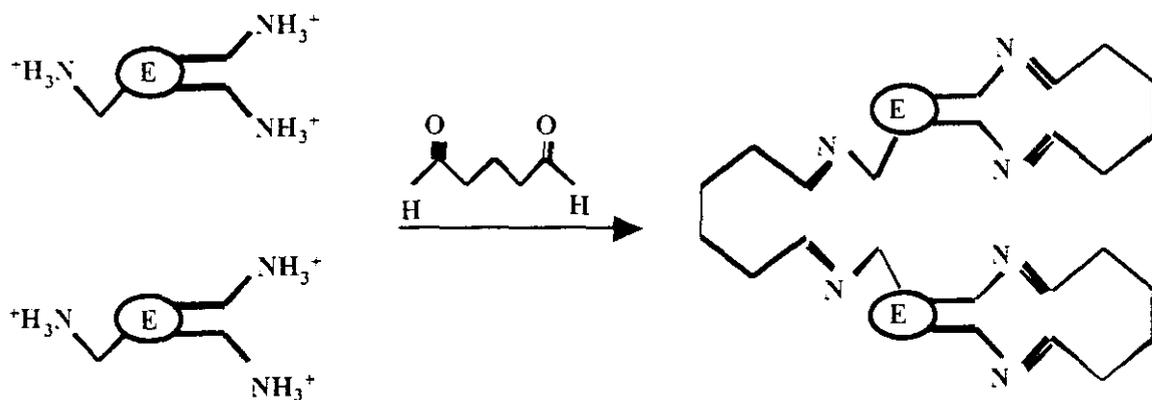


Figura 5.- Entrecruzamiento de enzimas con glutaraldehído

Los CLEC's de la penicilina acilasa, utilizados para hidrolizar cefalosporina G para producir precursores para nuevos antibióticos de interés industrial, ilustran las altas productividades que es posible obtener con catalizadores insolubles. La cantidad de CLEC's usados en este proceso es sólo el 1-2% en peso del utilizado con la enzima sin modificar, y después de 1000 reacciones en batch los cristales retuvieron el 70% de su actividad original (Baust-Timpson y Seuffer-Wasserthal., 1998).

Entre las desventajas de la modificación de enzima en CLEC's se encuentra la disminución de la actividad específica de los cristales. La existencia de este problema ha sido atribuida a la reducción de la transferencia de masa de los sustratos y los productos. Además, dada la heterogeneidad de la mezcla obtenida en el entrecruzamiento de los cristales, la cuantificación de los sitios activos viables remanentes es compleja, lo que hace difícil la comparación de los datos con la enzima en solución y con otros cristales (Govardhan, 1999).

La viabilidad técnica de la producción de cristales catalíticos entrecruzados está limitada principalmente por dos razones. Primero, la cristalización de la enzima no es siempre posible, sobre todo a gran escala y, segundo, el cristal entrecruzado puede ser inactivo por la obstrucción de los sitios activos de la enzima (Govardhan, 1999).

1.6.2 Modificación química con polímeros monofuncionales.

La modificación química de enzimas con polímeros monofuncionales ha permitido la mejora en las propiedades catalíticas de algunas enzimas. En particular, la modificación de grupos aminos superficiales con polietilenglicol (PEG) ha sido empleada para solubilizar proteínas para su aplicación en sistemas con solventes orgánicos (Hernaiz *et al.*, 1997), y para la preparación de proteínas terapéuticamente activas con reducida antigenicidad y mejorada estabilidad *in vivo* (Lundbland y Bradshaw, 1997).

La modificación covalente de la peroxidasa de rábano blanco (HRP) con *p*-nitro-fenilcloroformato-metoximetilpolietilenglicol (m-PEG) protege a la enzima contra la desnaturalización por pH extremo y la hace más termoestable (García *et al.*, 1998). Según los autores, los cambios en las propiedades de la HRP podrían deberse a que el mPEG disminuyó las repulsiones electrostáticas entre cargas superficiales.

El citocromo c de corazón de caballo fue modificado con PEG y posteriormente metilado en los carboxilos libres, incluidos los de los propionatos del grupo hemo, para producir un biocatalizador menos específico para los hidrocarburos poliaromáticos (HPA's). El citocromo c sin modificar fue capaz de oxidar, en presencia de peróxido de hidrógeno, 8 de 20 HPA's ensayados, mientras que la proteína modificada oxidó 17 de los 20 HPA's. Un aumento del doble en el rango de sustratos oxidados (Tinoco y Vazquez-Duhalt, 1998).

Una alternativa a la modificación con PEG puede ser el uso de detergentes no iónicos anfipáticos como el Brij 35 (polioxietilen lauril eter). La modificación con Brij 35 se llevó a cabo en

la catalasa, la cual resultó más soluble en tolueno y 1,1,1-tricloroetano, mostrando una actividad catalítica 200 veces mayor que la nativa en tricloroetano y de 15-20 veces más activa en solución acuosa (Jene *et al.*, 1997).

La solubilización de la proteínas en sistemas orgánicos resulta en una catalisis más eficiente debido a que no hay limitaciones en la transferencia de masa de los sustratos y productos. Sin embargo, los costos de recuperación de los biocatalizadores de la fase orgánica al finalizar la reacción son elevados. Para resolver este problema Ito *et al.* (1999), acoplaron a los grupos amino libres de la subtilisina un polímero que contenía grupos espiropiranos en sus cadenas laterales, los cuales tienen una solubilidad que es dependiente del tipo de luz que se les irradie. La subtilisina modificada fue soluble en tolueno y activa en reacciones de transesterificación. Al finalizar la reacción, la subtilisina se expuso a una irradiación de luz ultravioleta con lo que se precipitó del medio de reacción, posteriormente fue fácilmente recuperada por centrifugación, se resolubilizó en tolueno aplicando únicamente una radiación de luz visible. Esta preparación de la subtilisina fue activa después de varios ciclos de precipitación-solubilización.

1.6.3. Plásticos biocatalíticos

Una técnica recientemente desarrollada para producir biocatalizadores estables y activos en solventes orgánicos y sistemas acuosos es la introducción de una enzima dentro de un polímero. Es decir, la polimerización de un monómero en presencia de la enzima produce un plástico biocatalítico (figura 6). Las enzimas α -quimotripsina y subtilisina fueron incorporadas en materiales plásticos como poly(metil metacrilato), estireno, acetato de vinilo, etc. que alcanzaban a contener hasta 50% en peso de proteína. Los plásticos biocatalíticos resultaron ser altamente dependientes del medio de reacción. En sistemas acuosos y solventes apolares la enzima soluble (acomplejada con un detergente para solubilizarla en los solventes orgánicos, y así ser comparables los resultados) fue más activa que las enzimas modificadas, mientras que en solventes polares resultaron ser hasta 1200 veces más activas que la enzima soluble para la síntesis de

péptidos y además, ambas enzimas modificadas fueron significativamente más estables en hexano y tetrahidrofurano. La razón de este comportamiento fue los problemas de difusión de los sustratos hacia el sitio activo en sistemas acuosos y en solventes apolares -factor de efectividad de 0.1-, mientras que en solventes orgánicos polares los problemas de difusión eran despreciables -factor de efectividad de 0.9- (Wang *et al.*, 1997).

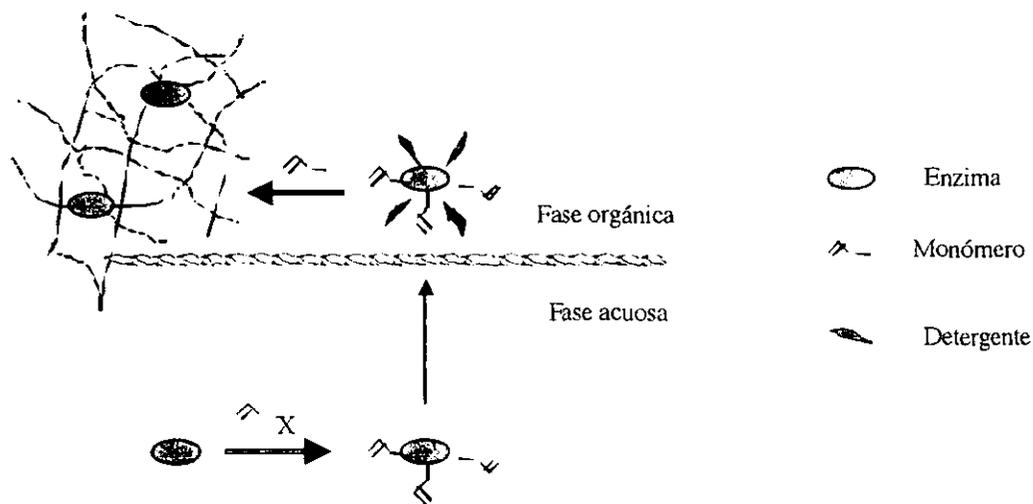


Figura 6.- Copolimerización de enzimas con polímeros de vinilo con previa solubilización de la enzima con un surfactante

1.6.4 Modificación química de grupos prostéticos

La modificación química *ex-situ* e *in-situ* del grupo hemo de las hemoproteínas ha sido reportada como una técnica que mejora las propiedades catalíticas y de ligación del sustrato de las enzimas. La modificación química *ex-situ* del hemo requiere que este sea primeramente extraído de la proteína, posteriormente ser modificado o sintetizado una metaloporfirina con diferentes características químicas, electroquímicas y estéricas, y finalmente reincorporarlo en la apoproteína (figura 7) (Fioretti *et al.*, 1976; Ascoli *et al.*, 1981). Una metodología diferente requiere la expresión heteróloga de la apoproteína en algún microorganismo huésped, la purificación de la misma y finalmente el ensamblaje de la metaloporfirina deseada con la apoproteína en un medio

adecuado que permita el plegamiento correcto de la holoproteína (Johnson y Li, 1991; Whitwam *et al.*, 1995).

Modi *et al.* (1995), reportaron la extracción y modificación *ex-situ* del grupo hemo del citocromo P-450. La reincorporación del propio hemo sin modificar produjo una enzima con las mismas características cinéticas que la enzima nativa. La reincorporación con un hemo modificado, la ferroprotoporfirina IX dimetilester, dió lugar a una enzima con una afinidad mayor por el sustrato, el ácido dodecanoico, triplicando con este hecho la eficiencia catalítica del citocromo P-450. La ferroprotoporfirina IX dimetilester es una porfirina que está metilada en los propionatos del grupo hemo; es decir, es una porfirina que no tiene la carga negativa de la ferroprotoporfirina IX por lo que al ser incorporada en el sitio activo del citocromo P-450, incrementa su carácter no polar. Esto explicaría el hecho de que la afinidad por el sustrato hidrofóbico es mayor en la hemoproteína modificada que en la no modificada.

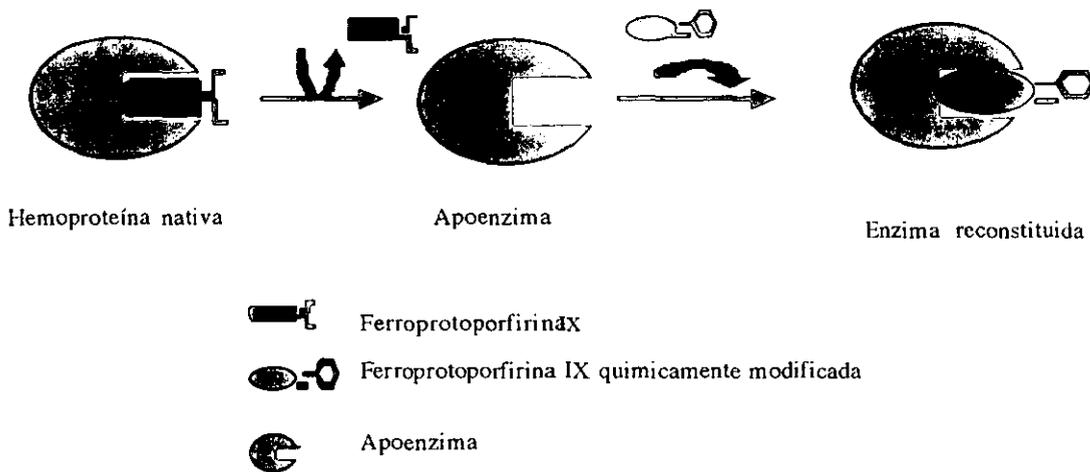


Figura 7. Modificación química *ex-situ* del hemo de una hemoproteína y su reconstitución en la apoenteína

La modificación del hemo en las posiciones 2, 4, 6 y 7 (figura 8) ha demostrado tener un efecto importante tanto en estructura como en catálisis y estabilidad a la temperatura. El grupo

hemo de la peroxidasa de rábano blanco fue sujeto a modificación de sus grupos vinilos, los cuales fueron sustituidos por hidrógenos y etilos para producir dos enzimas con características cinéticas y espectroscópicas diferentes a la nativa. Los autores demostraron que la modificación en las posiciones 2 y 4, interactúan estéricamente con la apoproteína y no tienen un efecto significativo en la velocidad de reincorporación de la porfirina en el sitio activo ni en la catálisis; mientras que las modificaciones en las posiciones 6 y 7 (grupos propionatos), que también interactúan con la apoproteína, tienen un efecto importante en la cinética de reincorporación del hemo en la apoperoxidasa y en las actividades catalíticas y electroquímicas de las enzimas reconstituídas (DiNello y Dolphin, 1981; Ryabov *et al.*, 1999)

La modificación en las posiciones 2 y 4 de la mioglobina de caballo y la hemoglobina de *Scapharca inaequalvis* con grupos etilos e hidrógenos produjo proteínas menos sensibles a los cambios estructurales, reflejados por los cambios en la banda Soret, provocados por el aumento en la temperatura (de 80° a 300 °K). Este cambio de comportamiento respecto a la temperatura fue debido a la disminución de las interacciones entre el hemo y la apoproteína, las cuales fueron cuantitativamente determinadas por los autores (Boffi *et al.*, 1997).

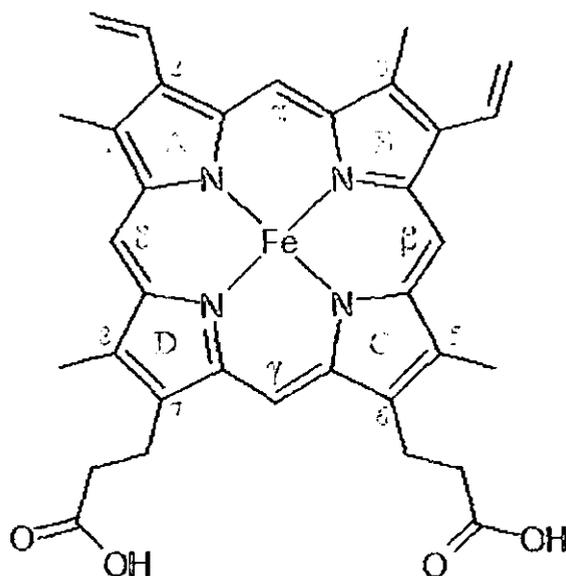


Figura 8.- Ferroprotoporfirina IX, grupo prostético de las peroxidosas

1.6.5 Combinación de modificación química y mutación sitio dirigida

Aunque la modificación química de proteínas ha resurgido como una técnica factible para mejorar la funcionalidad de las enzimas, el hecho de que en la mayoría de los casos la extensión y el lugar exacto de la modificación no puedan ser controlados con precisión no permite deducir cuales cambios son los responsables de la mejora en estabilidad y/o actividad. Esta problemática podría ser superada con la combinación de la mutación sitio dirigida y la posterior modificación química de la proteína (Bech y Breddam, 1988; Smith *et al.*, 1988; Gron *et al.*, 1990; Foong *et al.*, 1997).

Esta combinación de mutagénesis y modificación química fue aplicada para alterar las propiedades catalíticas de la subtilisina de *Bacillus lentus*. La estrategia involucró la introducción de un residuo de cisteína por mutación sitio dirigida en una posición clave del sitio activo, el cual fue posteriormente tioalquilado haciendo reaccionar la enzima con metanotiosulfonato para finalmente dar lugar a una mutante de subtilisina químicamente modificada. El metanotiosulfonato reacciona exclusivamente con los sulfidrilos, resultando esto en un producto homogéneo para el caso de esta subtilisina que no posee cisteínas de manera natural. La eficiencia catalítica se incrementó hasta tres veces cuando el alquilo introducido fue el $\text{CH}_2\text{-c-C}_6\text{H}_{11}$, el cual indujo un incremento en la hidrofobicidad en el ambiente del sitio activo y una disminución del pK_a de la histidina catalítica, que llevó a una mejor funcionalidad de la enzima (De Santis y Jones, 1998).

En resumen, podemos concluir que la modificación química de proteínas es una técnica rápida y de bajo costo para estabilizar enzimas por diferentes metodologías. La principal desventaja es la falta de control con respecto a la extensión y especificidad de la modificación. Por otro lado, la combinación de la mutación sitio dirigida y la modificación química, ha surgido como una estrategia rápida, controlada y versátil para producir productos homogéneos.

1.7 Hipótesis de trabajo.

La modificación enzimática de los hidrocarburos poliaromáticos requiere de la presencia de un solvente orgánico que permita su disolución. Sin embargo, en presencia del solvente orgánico la partición del sustrato hacia el sitio está desfavorecida. Por lo anterior, nos hemos propuesto mejorar la partición del sustrato aromático hacia el sitio activo de dos hemoproteínas, la cloroperoxidasa del hongo *C. fumago* y la hemoglobina humana, incrementando la hidrofobicidad del sitio activo por medio de la modificación química del grupo hemo. Con estas modificaciones se pretende incrementar la afinidad de la proteína por los sustratos hidrofóbicos, aun en presencia de solventes orgánicos.

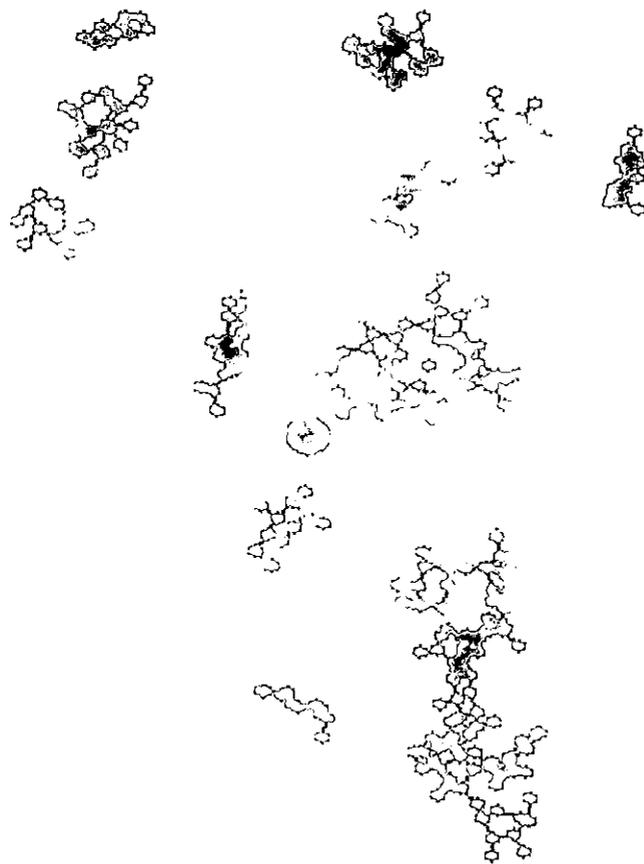


Figura 9.- La cloroperoxidasa de *C. fumago*.

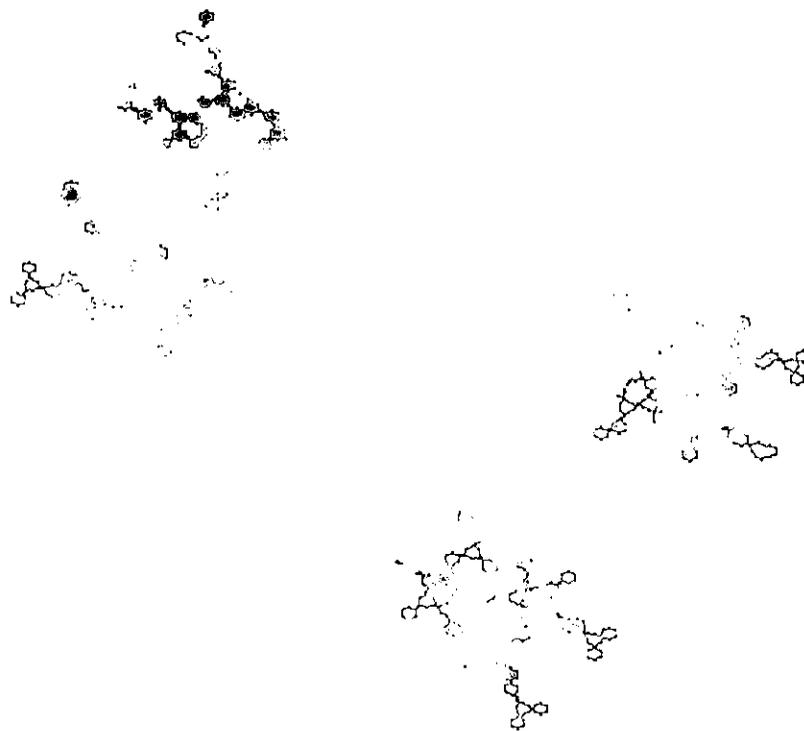


Figura 10.- La hemoglobina humana

2 Objetivos

General.

Estudiar el efecto de la modificación química del grupo hemo sobre el comportamiento catalítico de la cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* y de la hemoglobina humana.

Particulares

1. Optimizar las condiciones de extracción y reincorporación del hemo de ambas hemoproteínas
2. Modificar químicamente al hemo y reincorporarlo en las apoproteínas
3. Modificar químicamente el hemo de la hemoglobina *in situ*
4. Caracterizar cinéticamente las proteínas modificadas y compararlas con la nativa
5. Determinar las constantes de disociación de todas las modificaciones realizadas para sustratos de diferentes hidrofobicidades.

2 Objetivos

General.

Estudiar el efecto de la modificación química del grupo hemo sobre el comportamiento catalítico de la cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* y de la hemoglobina humana.

Particulares

1. Optimizar las condiciones de extracción y reincorporación del hemo de ambas hemoproteínas
2. Modificar químicamente al hemo y reincorporarlo en las apoproteínas
3. Modificar químicamente el hemo de la hemoglobina *in situ*
4. Caracterizar cinéticamente las proteínas modificadas y compararlas con la nativa
5. Determinar las constantes de disociación de todas las modificaciones realizadas para sustratos de diferentes hidrofobicidades.

3 Materiales y métodos

3.1 Reactivos y solventes

La hemoglobina humana, la catalasa y la peroxidasa de rábano blanco fueron compradas a Sigma. La cloroperoxidasa del hongo *C. fumago* fue obsequiada por el Dr. Michael Pickard de la Universidad de Alberta, Canadá. Los solventes utilizados todos grado HPLC, dimetilformamida, acetonitrilo, metil-etil-cetona, acetona, cloroformo y tetrahidrofurano fueron adquiridas de Merck. Los compuestos poliaromáticos tiantreno, fenantreno, fluoranteno, acenafteno, benzo(a)pireno, fluoreno, azuleno, antraceno, pireno, dibenzotiofeno, criseno, dibenzofurano, y bifenilo fueron comprados a Aldrich. Los reactivos siguientes fueron obtenidos de Sigma: ácido oxálico, alcohol nitrofenilo, alcohol aminofenilo, catecol, fenol, glicerol, hemina hidrocloreto, metoxipolietilenglicol activado con cloruro cianúrico, y metoxipolietilenglicol de diferentes tamaños moleculares, Tween 80, pirogalol, resorcinol, etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, glutatión oxidado, o-metoxifenol, urea, y ditiotritol. Las sales para los amortiguadores, el peróxido de hidrógeno, el cloruro de calcio, la sacarosa y el sulfato de sodio fueron compradas a Baker. El reactivo de Bradford, las resinas de intercambio catiónico y la de permeación en gel fueron adquiridas de Bio-Rad.

3.2 Cinética de desdoblamiento de la CPO en urea

Se incubaron 3.8 μ moles de CPO a diferentes concentraciones de urea (1 a 6 molar) a pH 5 a 27 °C. Se monitoreó la absorbancia de la banda Soret a 400 nm hasta alcanzar el equilibrio (sin cambio en la absorbancia). La constante de desdoblamiento de la CPO por la urea se determinó del ajuste de los datos a un modelo de primer orden:

$$\Delta A = \text{EXP} (-k_d t)$$

donde k_d es la constante de desdoblamiento, t el tiempo de incubación y la ΔA es el cambio de absorbancia a 400 nm determinado por $\Delta A = (A_t - A_{eq}) / (A_N - A_{eq})$ (Schmid *et al.*, 1992), donde A_t es la absorbancia al tiempo t , A_{eq} es la absorbancia al equilibrio y A_N es la absorbancia de la CPO al tiempo cero.

Al final de la incubación se obtuvo el espectro de emisión de 310 a 400 nm de las muestras excitando a 293 nm, con un slit de emisión y excitación de 2.5. También se determinó la actividad residual contra o-metoxifenol y H_2O_2 a pH 6.1.

Se determinó el efecto de diferentes aditivos sobre la velocidad de desdoblamiento de la cloroperoxidasa: 100 mM de CaCl_2 , 100 mM de sacarosa, 100 mM de glicerol y 1mM de glutation oxidado, 100 mM de DTT, 0.1% de Tween 80.

3.3 Cinética de replegamiento de la CPO

Fueron incubados 3.8 μmoles de CPO para su despliegue en 6 M de urea hasta alcanzar el equilibrio, momento en el cual se diluyó la urea con amortiguador de fosfatos con el aditivo disuelto en el mismo amortiguador. Se adicionó hemina en exceso disuelta en dimetilformamida (5%) y se monitoreó el cambio de absorbancia a 400 nm.

3.4 Métodos de extracción del hemo

Método de la butanona ácida- El experimento se realizó como sigue: la CPO o hemoglobina fueron incubadas a diferentes pH's a 4°C durante un minuto. Al término de la incubación se adicionó 2-3-metil-etil-cetona (butanona) en una relación 2/3 (agua/butanona) y se agitó vigorosamente para extraer el grupo hemo. Se permitió la

separación de las fases y se leyó a 400 nm la concentración de hemo en la fase orgánica. La fase acuosa se dializó exhaustivamente a diferentes pH's, se centrifugó y se separó el material desnaturalizado.

Método de la acetona ácida.- La hemoglobina se adicionó lentamente por goteo a la acetona ácida (500 ml de acetona + 1.25 ml de HCl 2M) previamente enfriada a -20°C. Se permitió disociar hemo-proteína por aproximadamente 1 minuto después de la gota final y posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min. El hemo permaneció disuelto en la acetona ácida, mientras que el pellet (apohemoglobina) se redisolvió en agua a -4°C. Se dializó varias veces contra una solución al 0.1% de bicarbonato de sodio y más adelante con amortiguador de fosfatos 10 mM pH 6.1.

Extracción del hemo de la CPO con urea.- Se incubaron 9.8 nmoles de CPO en diferentes concentraciones de urea (de 1 a 6 M) en soluciones de amortiguador en el rango de pH de 3 a 5. Pasado 1 minuto de incubación se extrajo el grupo hemo con butanona, centrifugando a 1000 rpm o filtrando a través de un filtro de 0.2 µm. Se separaron las fases y a la fase acuosa se le cuantificó el hemo remanente leyendo la absorbancia a 400 nm.

Reconstitución de la CPO.- Los ensayos de reconstitución de la apoCPO, obtenida por las diferentes metodologías mencionadas, involucraron la combinación de diferentes variables, en resumen, se incubó a la CPO en presencia del hemo a diferentes condiciones como: temperatura, tiempo de incubación, presencia de aditivos y/o solventes, inmovilización de la CPO o del hemo, presencia de detergente, etc.

3.5 Modificaciones químicas de la protoporfirina IX.

Modificación con polietilenglicol (hemo-PEG).- se mezclaron 4 mg de hemina hidrocioruro, disuelta en dimetilformamida, en 10 veces en exceso molar de etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida y 10 veces en exceso molar de polietilenglicol de 350 o 750 Da. La reacción se llevó a cabo durante 24 hrs a temperatura ambiente bajo agitación constante. La mezcla resultante se lavó con 10 volúmenes de cloroformo, se filtró para remover la hemina no modificada y finalmente se evaporó el solvente para redissolver el hemo modificado en agua (Takahashi *et al.*, 1986).

Esterificación de los carboxilos de la hemina clorada (Hemo-Met).- la hemina clorada se incubó en trifluoruro de boro en metanol durante 10 minutos a 60 °C, como ha sido reportado para la esterificación de grupos carboxilos; después se extrajo la hemina metilada lavando con cloroformo tres veces. El solvente se evaporó bajo flujo de nitrógeno y se redisolvió a la hemina modificada en dimetilformamida. Se ensayó la reconstitución con la apohemoglobina y apoCPO como se describió anteriormente.

Obtención de la porfirina sulfonada (hemo-sulfonado).- 4 mg de tetrafenilferroporfirina se mezclaron con 10 ml de H₂SO₄ concentrado. La mezcla de reacción se incubó por 7 hrs a 165 °C y se dejó enfriar por 12 hrs (este proceso provocó la salida del hierro de la porfirina). La solución se diluyó 10 veces con agua a 4 °C adicionada por goteo y se filtró. Posteriormente se adicionó una solución de bicarbonato de sodio saturada hasta alcanzar un pH aproximadamente de 8. Esto último provocó que la mezcla se haya tornado altamente viscosa dificultando la agitación. Se decantó el sobrenadante (que contiene la porfirina modificada) y el precipitado se lavó varias veces con etanol para extraer la porfirina modificada (Dolphin *et al.* 1990). Al sobrenadante se

le adicionó etanol en varias ocasiones para precipitar la sal aun presente. El sobrenadante se pasó por una columna cromatográfica de intercambio hidrofóbico (fenil-sefarosa), la cual se equilibró previamente con NaCl 1 M. La separación se logró eluyendo con agua destilada. Se colectan las fracciones y se lee el espectro de absorción. Se colectan las muestras que presentan los picos característicos de las porfirinas sustituidas.

Reincorporación del hierro en la porfirina sulfonada.- Cloruro férrico hexa hidratado se disolvió en dimetilformamida y se mezcló con la porfirina sulfonada a reflujo durante varias horas hasta ver un cambio de color y precipitación, lo cual indicó la inserción del hierro en la porfirina. Se aereó durante todo la noche para oxidar al hierro. Se filtró la mezcla y al filtrado se le adicionó una solución diluida de HCl para precipitar a la porfirina de la solución. El precipitado se lavó con agua y se secó al vacío. El sólido se redisolvió en diclorometano y se aplicó a una columna cromatográfica de gel de sílice. Se eluyó la porfirina sin hierro con diclorometano y en una relación de porcentaje 5:95 de una mezcla metanol:diclorometano para la porfirina que si contiene el hierro insertado.

Finalmente, el solvente se evaporó y se redisolvió en diclorometano puro. Se extrajo con HCL concentrado una vez para regenerar el enlace hierro-cloro. La fase orgánica se lava con agua hasta alcanzar un pH neutro del agua. Se secó sobre Na_2SO_4 y se extrajo con cloroformo (Dolphin et al, 1990).

Preparación del 8-hidroximetil hemo.- se mezclaron 168 mg de peroxidasa de rábano blanco (HRP) en 140 ml de amortiguador de fosfatos pH 7 con 15 mg de azida de sodio o fenil hidrazina. Después de 10 minutos, se adicionó peróxido de hidrógeno a una concentración final de 1mM. Quince minutos más tarde se agregaron 20 μL de una

solución 10 mg/ml de catalasa, para eliminar el exceso de H_2O_2 . Se acidificó con ácido acético y se extrajeron los hemos con eter etílico y finalmente se evaporó el éter con nitrógeno.

La separación del 8-hidroximetil hemo se realizó con una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna de fase reversa C-18. La fase de elución fue de 65% metanol, 35% de solución ácida (agua con 10% de ácido acético). Los picos de elución se monitorearon a 400 nm colectando fracciones cada minuto (Ator *et al.*, 1987).

3.6 Modificación química *in situ* de la hemoglobina

La hemoglobina fue químicamente modificada en sus aminos y carboxilos libres de la siguiente manera. Primero, a 0.12 gr de hemoglobina disuelta en amortiguador de boratos pH 10 se le adicionó 5 veces en exceso de polietilenglicol (peso molecular de 5000) activado con cloruro cianúrico, en base a sus aminos libres. La mezcla se dejó reaccionar por dos horas a temperatura ambiente. Después, se dializó en numerosas ocasiones con amortiguador de fosfatos pH 6 y se concentró por ultrafiltración con una membrana de 10 000 Da. y finalmente se dializó. Con este procedimiento se produjo la hemoglobina-PEG. La segunda modificación se realizó sobre la hemoglobina-PEG como sigue: la proteína liofilizada fue disuelta en 2 ml de trifluoruro de boro-metanol y se permitió que reaccionaran los carboxilos libres (incluidos los del hemo, que están expuestos al solvente) durante 1 hr a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de reacción se dializó exhaustivamente contra amortiguador de fosfatos pH 6. Con esta

doble modificación obtenemos la hemoglobina-PEG-Met (Tinoco y Vazquez-Duhalt, 1998).

Determinación de fierro en hemo de la hemoglobina modificada .- El método se basa en la conversión del hemo a su derivado porfirina fluorescente con la incubación en ácido oxálico. La curva estándar se construyó como a continuación se describe: 4 ml de una solución de ácido oxálico saturada (12.6 % en peso) se mezclaron con 100 μ L de la solución de hemoglobina conteniendo de 0.1-0.5 nmoles de proteína (0.4 a 2 nmoles de fierro) y se incubaron durante dos horas a 110 °C. La mezcla se dejó enfriar lentamente y una vez atemperada se leyó el espectro de emisión de la mezcla excitando a 410 nm. La lectura se realizó en el máximo de emisión (603 nm) del hemo derivatizado (Rice-Evans *et al.*, 1991).

3.7 Determinación de las actividades catalíticas

Actividad específica.- La actividad específica de la hemoglobina contra diferentes sustratos aromáticos se determinó en un sistema de reacción con 15% de acetonitrilo y 10 mM de H₂O₂ en amortiguador de fosfatos pH 6.1. Después de 10 minutos de reacción se analizó la disminución de la concentración del sustrato por HPLC a 225 o 250 nm. La elución se realizó con una fase 70% de acetonitrilo 30% agua.

La actividad específica contra los sustratos fenólicos (fenol y o-metoxifenol) fueron determinadas espectrofotométricamente siguiendo el incremento de absorbancia a 398 nm para el fenol (coeficiente de extinción molar igual a 36 000) y 420 nm para el o-metoxifenol (coeficiente de extinción molar de 26 600). La actividad catalítica contra resorcinol no fue determinada.

Constantes cinéticas.- La determinación de las constantes cinéticas se realizó con tiantreno como sustrato en el mismo sistema de reacción descrito anteriormente para las actividades específicas. La velocidad de reacción se determinó espectrofotométricamente midiendo la disminución de la absorbancia a 254 nm. El cálculo de la actividad específica se determinó con el coeficiente de extinción para el tiantreno de $35\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El cálculo de las constantes cinéticas se realizó utilizando el modelo de Michaelis Menten linearizando según Lineweaver-Burk.

Determinación de la estabilidad ante peróxido de hidrógeno.- La hemoproteína, no modificada y modificada, se incubó en presencia de peróxido de hidrógeno 10 mM durante diferentes tiempos de incubación, en amortiguador de fosfatos 60 mM pH 6.1. A cada tiempo se dió inicio a la reacción con la adición de pireno 20 μM . La actividad se midió espectrofotométricamente monitoreando disminución de la concentración del sustrato a 335 nm. El cálculo de la constante de inactivación se determinó ajustando los datos a una ecuación de primer orden:

$$A = A_0 \text{EXP} (-k_{in}t)$$

Donde A y A_0 son las actividades específicas al tiempo t de incubación en peróxido y al tiempo cero, respectivamente y k_{in} es la constante de inactivación por peróxido de hidrógeno.

Constantes de disociación.- A la hemoglobina se le adicionaron diferentes concentraciones de sustratos (pirogalol, catecol, resorcinol, fenol) y se detectaron los cambios en el banda Soret (404 nm) debidos al acomplejamiento proteína-sustrato. El cambio de absorbancia se determinó con la diferencia de la absorbancia en ausencia de

sustrato menos la absorbancia a una concentración de sustrato conocida. El modelo de ajuste para el cálculo de la constante de disociación es el siguiente:

$$\frac{1}{\Delta A} = \left[\frac{K_d}{\Delta A_s} \right] \frac{1}{S_0} + \frac{1}{\Delta A_s}$$

donde K_D es la constante de disociación, ΔA es el cambio de absorbancia a una concentración de sustrato dada y ΔA_s es el cambio de absorbancia a la concentración de saturación de sustrato (Casella *et al.*, 1992).

Determinación de proteína.- La concentración de proteína fue determinada por el método de Bio-Rad utilizando una curva estándar de hemoglobina previamente cuantificada espectrofotométricamente con el coeficiente de extinción $7.12 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 523 nm (Snell y Marini, 1988).

3.8 Minimización energética de las reconstituciones hemo-PEG de la hemoglobina.

1. A partir del archivo.pdb de la hemoglobina humana se extrajeron los grupos hemo y se guardan en un nuevo archivo2.pdb
2. Utilizando el programa Insight II se crearon los hemos modificados con PEG de 350 y 750 Da.
4. Con los archivos en formato pdb de los grupos hemos modificados se generaron los archivos de topología y parámetros (necesarios para la minimización energética con CNS en <http://alpha2.bmc.uu.se/hicup/>)
5. En CNS se integraron los archivos de proteína, hemos modificados y moléculas de agua con la subrutina GENERATE.

6. Con los archivos pdb y diccionarios integrados se minimizaron las coordenadas con la subrutina model-minimize (900 pasos).

7. Finalmente las figuras de las reconstituciones se generaron con el programa GRASP.

4 Resultados y discusión

4.1 La cloroperoxidasa del *C. fumago*

La CPO del hongo *C. fumago* fue incubada a diferentes concentraciones de urea para estudiar el proceso de desplegamiento y replegamiento en presencia de diferentes aditivos con el propósito de utilizar esta estrategia como una metodología para extraer al grupo hemo, en el proceso de desplegamiento, y sustituirlo con otro químicamente modificado, en el proceso de replegamiento. En la figura 11 se muestra la cinética de desdoblamiento de la CPO en urea, la cinética de desdoblamiento es similar al seguido por la peroxidasa de rábano blanco (Tams y Welinder, 1998) y por la peroxidasa de *Coprinus cinereus* (Tams y Welinder, 1996). La cinética fue monitoreada a 400 nm, la cual es el máximo de absorción del hemo en la cloroperoxidasa

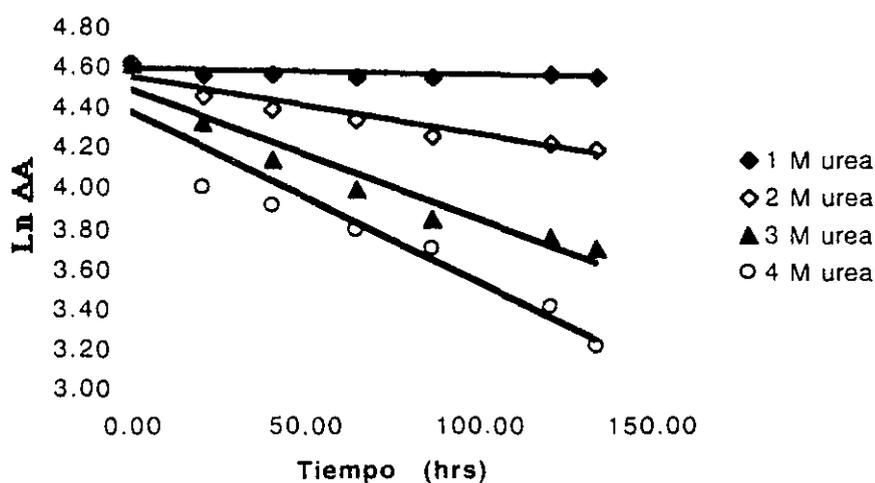


Figura 11. Cinética de desplegamiento de la CPO en urea

En la tabla XII se muestran los valores de las constantes de velocidad de la CPO para el proceso de desplegamiento en urea en ausencia y presencia de ciertos aditivos. Como se muestra, la presencia de aditivos como la sacarosa, el cloruro de calcio, el glutatión oxidado y el glicerol no tienen un efecto claro sobre la cinética de desdoblamiento de la CPO en urea. Un comportamiento similar fue reportado por Tams *et al* (1996) para la peroxidasa de *C. cinereus* contra la desnaturalización por urea, pH y temperatura.

Tabla XII. Constantes de desdoblamiento (días) de la CPO en urea a pH 3

Urea (M)	Sin aditivo	glicerol	glutatión	CaCl ₂	sacarosa
1	0.010	0.002	0.002	0.002	0.010
2	0.010	0.0001	0.005	0.007	0.010
3	0.023	0.012	0.012	0.057	0.012
4	0.072	0.086	0.079	0.161	0.043
5	0.168	0.252	0.151	0.269	0.168
6	0.168	0.385	0.291	0.497	0.168

El espectro de absorción de la CPO en la banda Soret a concentraciones de 4 M de urea o mayores, muestra una banda similar al hemo libre en solución, esto podría indicar que el hemo está fuera de la proteína, por lo que el ambiente alrededor del hemo podría estar muy desestructurado. Para corroborar lo anterior se obtuvo el espectro de emisión de la CPO a diferentes concentraciones de urea en el equilibrio (sin cambio en la absorbancia) (figura 12). Es sabido que el grupo hemo atenúa la intensidad de la emisión de los grupos triptófanos en las hemoproteínas. Al incubar a la enzima en urea, la intensidad de la emisión se incrementa al incrementarse la concentración del desnaturalizante. Esto nuevamente sugiere que el hemo está saliendo de la proteína y el hecho de que el máximo de emisión se mueva desplace a la derecha, que los triptófanos

están más expuestos al solvente. Es decir, la incubación con urea expulsa al hemo de la proteína desestructurando a esta última. Los patrones de emisión en presencia y ausencia de aditivos son similares. Es decir, los aditivos no tienen un efecto sobre el mantenimiento de la estructura terciaria de la CPO.

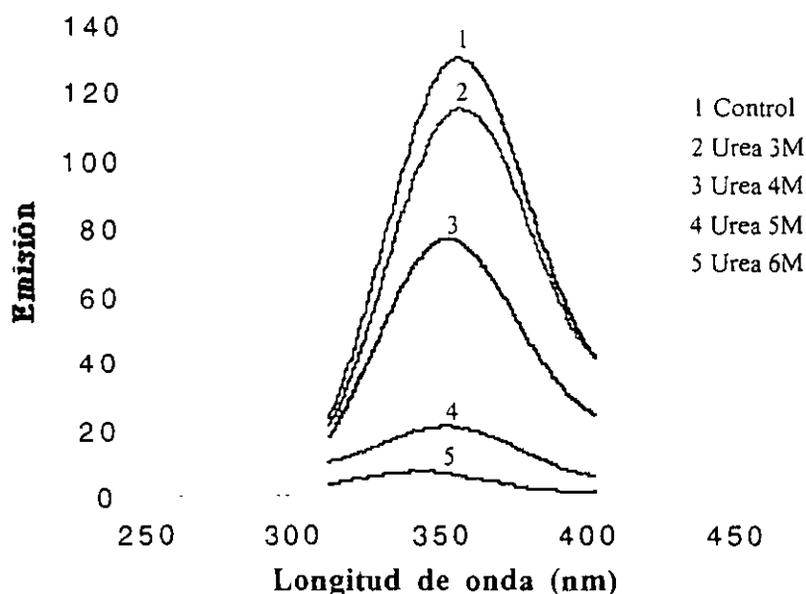


Figura 12.- Espectro de emisión en el equilibrio de la CPO a diferentes concentraciones de urea

El siguiente paso fue ensayar el replegamiento de la CPO desnaturalizada previamente en urea (hasta el equilibrio, aprox. 7 días). La urea fue removida lentamente por diálisis en presencia y ausencia de aditivo. En todos los casos el resultado fue negativo para el replegamiento de la proteína. Por otro lado, si la CPO se incubaba en urea (en concentraciones entre 4 y 6 M) a los 10 minutos pierde el 80% de su actividad

catalítica. Si en ese momento se diluye rápidamente la urea con amortiguador se recupera del 90-100% de la actividad.

Con este procedimiento con el que se logra dla recuperación de actividad, se llevó a cabo la remoción del hemo del medio desnaturizante por filtración, centrifugación y con meti-etil-cetona para darle tratamiento a la apoproteína en un medio con diferentes aditivos con el propósito de favorecer el replegamiento.

La incubación de la apoCPO con hemina en exceso utilizando esta metodología no llevó a la reconstitución de la CPO. Los aditivos conocidos como mejoradores del replegamiento de peroxidasas como el CaCl_2 , el glutation oxidado, la sacarosa, etc. no favorecieron la recuperación de actividad al incubar la apoCPO con hemina en exceso. En el replegado de una proteína desnaturizada intervienen muchos factores y no siempre es posible recuperar una proteína plegada en la forma correcta. La complejidad del problema y los resultados obtenidos nos llevaron a ensayar una metodología diferente de extracción del hemo, en donde el desplegamiento de la proteína no fuese necesario. Así, la extracción del hemo en solventes orgánicos se presentó como una alternativa viable.

Ha sido reportado que la estructura de muchas proteínas permanece inalterable en sistemas con altas concentraciones de solvente orgánico (Schmitke et al. 1997). De hecho, se sabe que la disminución de la constante dieléctrica, causada por la presencia de solvente, incrementa la fuerza de las interacciones de la proteína. Este incremento rigidiza a la molécula haciéndola más estable estructuralmente.

Para la extracción del hemo de la CPO se utilizaron tres sistemas de solventes orgánicos en condiciones ácidas: acetona, butanona y etanol. Las condiciones ácidas

promueven la protonación del ambiente proteico alrededor del hemo y facilitan su expulsión. La extracción del hemo con acetona ácida (aprox. pH 1) fue exitosa con una remoción del 100%. Este método ha sido usado con éxito para otras hemoproteínas como la hemoglobina, la mioglobina, la peroxidasa de rábano blanco, etc (Ascoli et al., 1981; Dinello y Dolphin, 1981; Boffi *et al.*, 1997). Sin embargo, en nuestro caso la apoproteína precipitada resultó ser insoluble en el amortiguador de reconstitución.

La extracción con etanol ácido fue muy ineficiente, con un máximo de remoción del 50%. La imposibilidad de separar la apoenzima de la mezcla, impide el uso de este método. No es posible realizar la estimación de la modificación del hemo cuando se tiene en la preparación altas proporciones de enzima nativa.

Con el método de la butanona ácida es posible extraer el 100% de hemo sin insolubilizar a la proteína. La desnaturalización por pH resultó también ser irreversible, ya que el simple cambio de pH hacia condiciones de estabilidad de la CPO nativa no lleva al replegamiento de la apoCPO. Si bien la apoproteína obtenida era soluble en el amortiguador de reconstitución no fue posible recuperar la actividad catalítica. Lo anterior puede tener dos causas principales; por un lado, que la proteína esté mal estructurada y, por otro, que existan limitaciones en la transferencia de masa en la incorporación del hemo (hidrofóbico) hacia el sitio activo de la apoCPO. Los experimentos siguientes tuvieron el propósito de resolver estos posibles problemas.

Para favorecer el replegamiento de la apoCPO (obtenida con el método de butanona ácida) se incubó a la proteína en diferentes aditivos bajo variadas condiciones de tiempo, temperatura y pH. Además, para evitar la agregación de la enzima desnaturalizada se inmovilizó a la CPO en Nylon y se ensayó tanto la remoción del hemo

como la reconstitución de la apoCPO en estado inmovilizado. Por otro lado, para disminuir los problemas de transferencia de masa se adicionaron solventes como dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), butanona, o un detergente como el Tween 80. Además, se utilizaron modificaciones químicas del hemo para hacerlo soluble en agua. Finalmente, para evitar la dimerización de la hemina y favorecer la transferencia de masa se inmovilizó el hemo en amberlita. La combinación de las variables mencionadas se muestra en la tabla XIII.

Aunque el resultado de esta larga serie de experimentos fue negativo en todos los casos, los experimentos realizados para disminuir los problemas de transferencia de masa fueron realmente efectivos. La ferroporfirina se disolvió perfectamente en el medio de reacción conteniendo 5% de DMF, THF o 20% de butanona, así como en un medio con 0.1% de Tween 80. Lo anterior sugiere que la razón principal por la que la apoCPO no se reconstituye no es por problemas en el acceso al hemo, sino por algún cambio irreversible en la estructura.

Existen tres vías para el plegamiento de las hemoproteínas *In vivo*. En una de ellas, la incorporación del hemo se realiza en una proteína previamente plegada y por medio de una enzima; este es el caso del citocromo c, en donde el hemo es incorporado a la apoproteína en una reacción catalizada por la hemoliasa (Nall, 1996). En un segundo proceso el plegamiento de la proteína se realiza en presencia del hemo y este sirve de templado para el plegamiento correcto; este es el caso de la citocromo c peroxidasa (Tsaprailis et al., 1998).

Tabla XIII.- Combinación de variables y condiciones de operación para la reconstitución de la apoCPO

Experimento	CaCl ₂	Glut. Oxid.	Sacarosa	Tw 80	Glicerol	Temperatura	Tiempo	Solvente	Inmovilización	Hemo
1						4	1	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
2						4	1	Tetrahidrolurano		Protoporfirina IX
3						25	1	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
4						25	1	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
5	X					25	1	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
6						25	1	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
7		X				25	1	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
8			X			25	1	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
9				X		25	1			Protoporfirina IX
10					X	25	1	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
11						25	1	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
12	X	X	X	X	X	25	1			Protoporfirina IX
13	X					25	7	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
14						25	7	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
15		X				25	7	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
16			X			25	7	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
17				X		25	7			Protoporfirina IX
18					X	25	7	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
19						25	7	Dimetilformamida		Protoporfirina IX
20	X	X	X	X	X	25	7			Protoporfirina IX
21						25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX
22						25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX
23						25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX
24						25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX
25	X					25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX
26						25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX
27		X				25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX
28			X			25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX
29				X		25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX
30					X	25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX
31						25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX

32	X	X	X	X	X	25	7	Dimetilformamida	Nylon	Protoporfirina IX
33						25	1		Amberlita	Protoporfirina IX
34						25	1		Amberlita	Protoporfirina IX
35	X					25	1		Amberlita	Protoporfirina IX
36						25	1		Amberlita	Protoporfirina IX
37		X				25	1		Amberlita	Protoporfirina IX
38			X			25	1		Amberlita	Protoporfirina IX
39				X		25	1		Amberlita	Protoporfirina IX
40					X	25	1		Amberlita	Protoporfirina IX
41						25	1		Amberlita	Protoporfirina IX
42	X	X	X	X	X	25	1		Amberlita	Protoporfirina IX
43						25	1	Amortiguador		Hemo soluble
44						25	1	Amortiguador		Hemo soluble
45	X					25	1	Amortiguador		Hemo soluble
46						25	1	Amortiguador		Hemo soluble
47		X				25	1	Amortiguador		Hemo soluble
48			X			25	1	Amortiguador		Hemo soluble
49				X		25	1	Amortiguador		Hemo soluble
50					X	25	1	Amortiguador		Hemo soluble
51						25	1	Amortiguador		Hemo soluble
52	X	X	X	X	X	25	1	Amortiguador		Hemo soluble
53					x	37	0.1			Protoporfirina IX
54					x	37	0.1			Protoporfirina IX
55	X				x	37	0.1			Protoporfirina IX
56					x	37	0.1			Protoporfirina IX
57		X			x	37	0.1			Protoporfirina IX
58			X		x	37	0.1			Protoporfirina IX
59				X	x	37	0.1			Protoporfirina IX
60					x	37	0.1			Protoporfirina IX
61					x	37	0.1			Protoporfirina IX
62	X	X	X	X	X	37	0.1			Protoporfirina IX

La concentración de los aditivos fue 100 mM, la del Tw 80 fue 0.1% y los solventes al 5% v/v. El Tiempo está dado en días y la Temperatura en °C

El tercer proceso de plegamiento de las hemoproteínas se lleva a cabo en enzimas como la peroxidasa de rábano blanco, donde el plegamiento se realiza en ausencia del grupo prostético, para posteriormente producir la holoproteína con la inserción del hemo (Pappa y Cass, 1993). En el caso de la cloroperoxidasa de *C. fumago*, la proteína sufre un procesamiento postraduccional. Como producto de las investigaciones de nuestro laboratorio, se sabe que la proteína plegada sufre dos cortes proteolíticos en sus extremos amino y carboxilo previos a su excreción de la célula. Este razonamiento indica que al carecer de dos porciones significativas de la proteína, el camino que toma la apoCPO desnaturalizada para replegarse pudiera dar una estructura diferente a la de la proteína sin procesar, aun cuando coordinara correctamente el grupo hemo (Valderrama *et al.*, trabajo en progreso). La otra razón tiene que ver con la glicosilación de la CPO, la cual contiene cerca de 27 residuos de azúcares unidos covalentemente (Sundaramoorthy *et al.*, 1995). La rigidez impuesta por estos grupos sobre la cadena polipeptídica podría también influir sobre la cinética de desplegamiento-replegamiento dirigiendo la estructura a una configuración inactiva. Por supuesto que podría darse una combinación de ambos fenómenos.

La expresión heteróloga de la apoCPO ha sido obtenida en *E. coli* (Zong *et al.*, 1995). En este caso la reincorporación del hemo se realizó a altas presiones obteniéndose muy bajas eficiencias de reincorporación. Este método no ha sido reportado posteriormente, lo cual es extraño ya que son muchos los grupos en el mundo trabajando con la CPO. Después de los resultados obtenidos en esta tesis, en el laboratorio se está trabajando en la expresión heteróloga y reconstitución de la CPO.

4.2 La hemoglobina humana

La hemoglobina es la hemoproteína transportadora de oxígeno en la sangre. Esta proteína es capaz de catalizar la oxidación de sustratos de interés en presencia de peróxido de hidrógeno (Catalñano y Ortiz de montellano, 1987; Klyachko y Klibanov, 1992; Ortiz-Leon et al., 1995). El grupo hemo de la hemoglobina fue extraído, modificado y reinsertado exitosamente en la apohemoglobina. La reconstitución con el hemo sin modificar presenta características espectroscópicas iguales a la de la hemoglobina control (figura 13). La reconstitución con hemo-PEG de 350 Da no afecta las propiedades electrónicas del hemo lo suficiente como para alterar la posición de la banda Soret; sin embargo, la modificación de los propionatos del hemo con PEG de 750 Da desplaza el máximo de absorción de la banda Soret aproximadamente 6 nm a la derecha, situando su máximo en 410 nm.

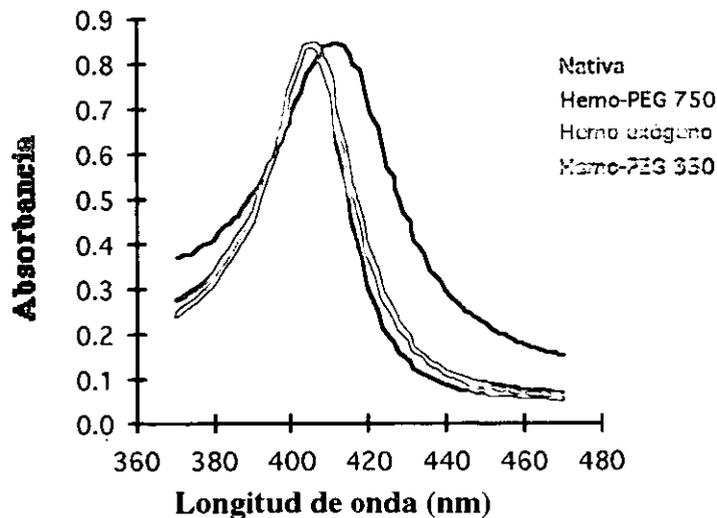


Figura 13. Espectros de absorción de la hemoglobina no modificada y sus reconstituciones con diferentes hemos.

Las constantes cinéticas contra tiantreno en un sistema que contenía 15% de acetonitrilo se muestran en la tabla XIV. La reconstitución con el hemo no modificado (hemo exógeno) mantiene las características cinéticas de la hemoglobina no modificada. La sustitución del hemo con hemo-PEG 350 aumenta ligeramente la k_{cat} , mientras que la sustitución con hemo-PEG 750 la disminuye ligeramente. Para ambas reconstituciones la afinidad por los sustratos, medida por la K_M , disminuye ligeramente. El efecto global está indicado por el cociente k_{cat}/K_M , la eficiencia catalítica, la cual muestra que la modificación con PEG 350 no altera significativamente las características cinéticas de la hemoglobina; sin embargo, la modificación con PEG 750 disminuye aproximadamente a menos del 50% la eficiencia de la hemoglobina como biocatalizador.

Tabla XIV.- Constantes cinéticas de la hemoglobina modificada y no modificada contra tiantreno en 15 % de acetonitrilo^a.

Reconstitución	k_{cat} (min^{-1})	$K_{M,\text{tiantreno}}$ (μM)	$k_{cat}/K_{M,\text{tiantreno}}$ ($\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
Nativa	12.5±12	14.6	856
Hemo exógeno	12.7±48	15.3	830
Hemo-PEG350	16.5±66	23.4	705
Hemo-PEG750	9.2±54	23.2	396

^aLa determinación de las constantes se realizó a concentraciones de saturación de H_2O_2

Nuestro interés estuvo centrado sobre el efecto de las modificaciones en la partición del sustrato entre el sitio activo y el solvente. Esta partición puede estar reflejada por la constante de Michaelis-Menten; sin embargo, siendo la diferencia tan pequeña se prosiguió con el cálculo de la C_{50} (concentración de solvente a la cual la actividad específica máxima disminuye a la mitad), como una manera de determinar como se particiona el sustrato con las reconstituciones. En la figura 14 se muestra el

efecto del aumento en la concentración de acetonitrilo sobre la actividad específica de la hemoglobina y sus diferentes reconstituciones.

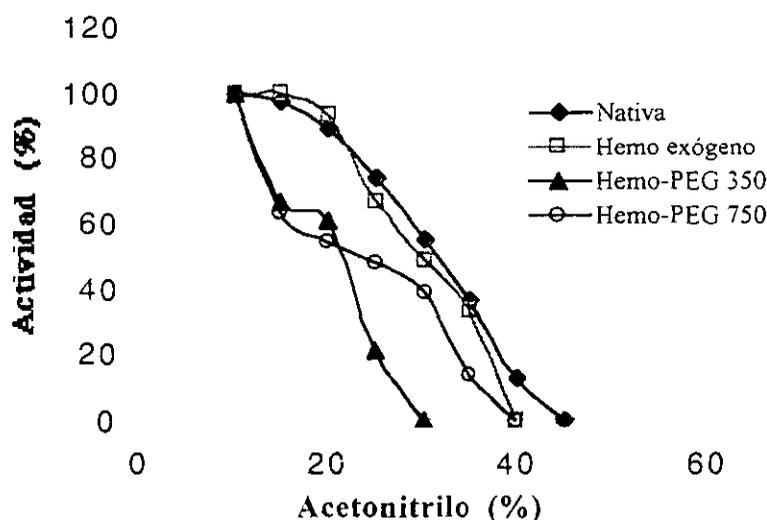


Figura 14.- Efecto de la concentración de solvente sobre la actividad catalítica de la hemoglobina reconstituida y no modificada.

La figura 14 muestra, por un lado, que la extracción y reincorporación del hemo no modificado (hemo exógeno) no altera el comportamiento catalítico de la hemoglobina a diferentes concentraciones de solvente. Por otro lado, los valores de la C_{50} (concentración de solvente a la que la velocidad máxima disminuye a la mitad) indican que las reconstituciones de la apohemoglobina con hemos modificados con polietilenglicol tienen menor capacidad para competir por el sustrato que la hemoglobina no modificada (C_{50} igual a 32, 22 y 24% para la hemoglobina nativa, hemo-PEG 350 y hemo-PEG 750 respectivamente, figura 14).

La disminución de actividad catalítica al aumentar la concentración de solvente puede reflejar no sólo la partición desfavorable del sustrato hacia el sitio activo, sino también la sensibilidad del biocatalizador al solvente. Como ha sido reportado, la

hemoglobina se ve seriamente dañada al incubarla en solventes como el dimetilsulfoxido a concentraciones tan bajas como el 20% (Liu et al., 1998). Las principales razones de la desnaturalización de la hemoglobina en solventes es la pérdida del grupo hemo, debida a la disrupción de los puentes de hidrógeno entre los carboxilos de la porfirina y la superficie proteica, y al desordenamiento del interior hidrofóbico de la proteína.

Para determinar si realmente las reconstituciones presentaban menor afinidad por los sustratos hidrofóbicos se procedió a la determinación de las constantes de disociación para las hemoglobinas con sustratos fenólicos de diferentes hidrofobicidades (fenol, catecol, resorcinol y pirogalol, cada uno es un anillo bencénico con uno, dos, dos y tres hidroxilos, respectivamente).

Los sustratos seleccionados son solubles en agua para evitar el uso de solventes orgánicos, y su solubilidad aumenta al incrementarse el número de hidroxilos presentes en la molécula. Debido a que no se llegó a la saturación de las hemoglobinas reconstituidas con estos sustratos, se limitó el cálculo a la pendiente del modelo descrito en materiales y métodos para el cálculo de la constante de disociación. En la tabla XV se presentan las pendientes del modelo para la hemoglobina no modificada y las reconstituciones con hemo-PEG 350 y hemo-PEG 750.

Tabla XV.- Comparación de las pendientes del modelo de la constante de disociación para la hemoglobina y sus dos reconstituciones.

Sustrato	Pendiente [mM]		
	Nativa	Hemo-Peg350	Hemo-peg750
Fenol	153	273	783
Catecol	257	320	2449
Resorcinol	358	386	2426
Pirogalol	489	465	7086

Como puede apreciarse, a medida que aumenta la hidrofobicidad del sustrato, medida por la solubilidad en agua, la afinidad por él también se incrementa para las tres hemoglobinas. Comparando la hemoglobina no modificada con la reconstituída con el hemo-PEG 350 las pendientes son muy similares cuando el sustrato es hidrofílico (como el pirogalol y resorcinol) y a medida que el sustrato es más hidrofóbico la diferencia en afinidad, reflejada por la pendiente, se hace más evidente, siendo menor para la hemoglobina reconstituída. Esto sugiere que el sitio activo de la hemoglobina reconstituída tendría menor capacidad para competir por un sustrato hidrofóbico que la hemoglobina no modificada si la colocáramos en un sistema con solventes orgánicos, en donde el sustrato tiende a particionarse hacia el solvente.

Al comparar la reconstitución con hemo-PEG 750 contra la hemoglobina nativa se puede apreciar que la afinidad de la nativa es mayor para todos los sustratos; al parecer, la afinidad por los sustratos de la hemoglobina reconstituída con hemo-PEG 750 no está en función únicamente de la hidrofobicidad del sitio activo, sino también del efecto estérico provocado por la larga cadena de PEG unido al hemo. En la figura 15 se muestra la molécula de la hemoglobina humana enfocada en el hemo de la cadena B, y en la figura 16 se muestra la minimización energética de la hemoglobina reconstituída con hemo-PEG 750 en la misma zona. Como puede apreciarse, según la minimización de energía obtenida para la reconstitución con hemo-PEG 750, la larga cadena de polietilenglicol podría limitar la entrada de los sustratos al sitio activo formando posiblemente múltiples interacciones con la proteína y con otras moléculas de PEG de hemos vecinos.

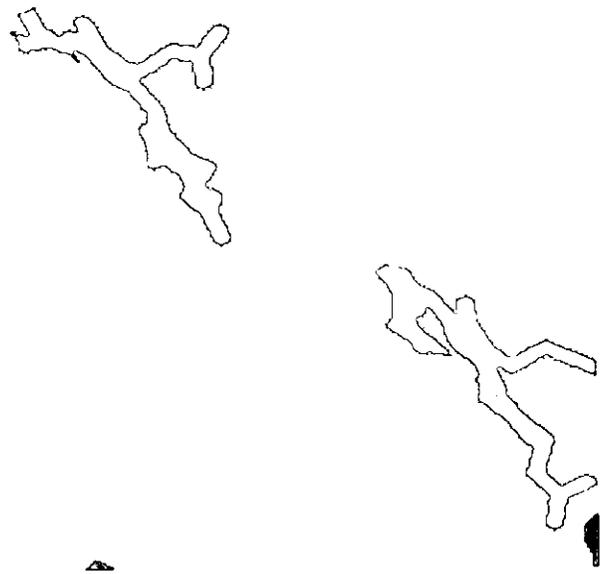


Figura 15.- Modelo estructural de la hemoglobina humana que muestra la posición y el acceso al hemo.

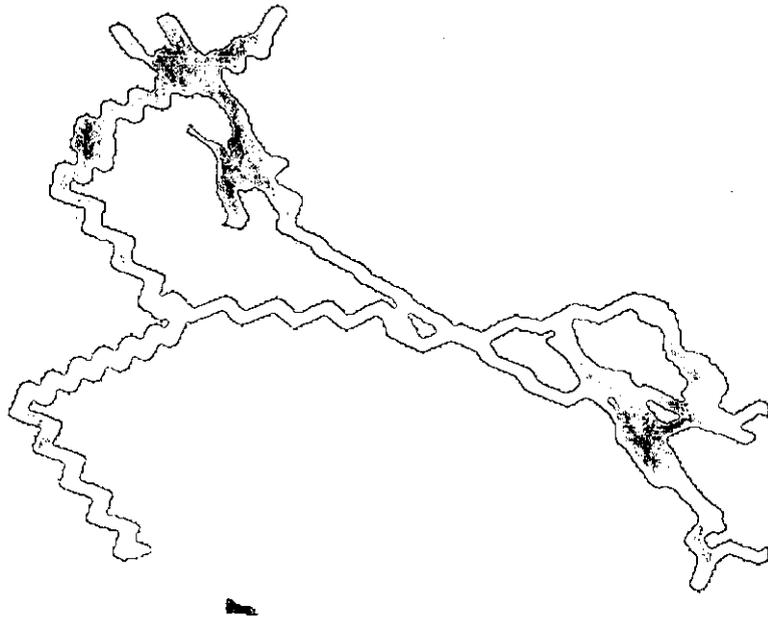


Figura 16.- Minimización energética de la hemoglobina reconstituida con hemo-PEG 750

4.3 Modificación *in situ* de la hemoglobina

La hemoglobina fue químicamente modificada en los grupo amino y carboxilos libres con el propósito de incrementar su hidrofobicidad tanto superficial como la del sitio activo. La modificación en los grupos amino se realizó con PEG de 5000 Da. Como ha sido reportado, la modificación de los aminos con polietilenglicol incrementa la hidrofobicidad superficial de algunas proteínas como la peroxidasa de rábano blanco (Vazquez-Duhalt et al., 1992). La metilación de los carboxilos libres, incluidos los del

hemo, produce una proteína con un sitio activo más hidrofóbico (Modi et al., 1995). La hemoglobina doblemente modificada muestra un espectro de absorción en la banda Soret diferente al de la hemoglobina no modificada (figura 17), reflejo de un cambio en el ambiente alrededor del sitio activo. Diferencias similares han sido reportadas para hemoproteínas reconstituidas con hemos químicamente modificados (Modi et al., 1995; Di Nello et al., 1981).

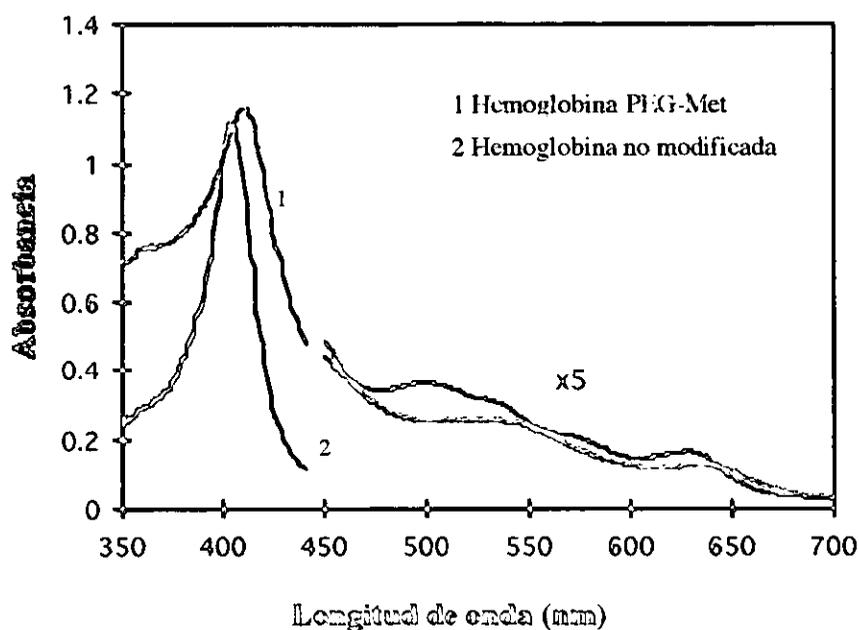


Figura 17.- Espectros de absorción de las hemoglobina modificada y no modificada.

Las constantes cinéticas para la hemoglobina modificada y no modificada contra tiantreno en un sistema con 15% de acetonitrilo se presentan en la tabla XVI. La doble modificación de la hemoglobina incrementó 3 veces la constante catalítica, k_{cat} , y disminuyó ligeramente la constante de Michaelis-Menten (1.5 veces). El efecto global de

la modificación está reflejado por el incremento de 3.7 veces en la eficiencia catalítica (tabla XVI).

Tabla XVI.- Constantes cinéticas de la hemoglobina PEG-Met y la hemoglobina sin modificar contra tiantreno en 15 % de acetonitrilo.

	k_{cat} (min^{-1})	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
Hemoglobina	2.5	15.0	166
Hemoglobina-PEG-Met	6.7	10.8	620

Tinoco *et al.* (1998) reportaron que la modificación de los aminos libres con PEG y la metilación de los carboxilos libres del citocromo c de corazón de caballo produjo un biocatalizador con mayor actividad y un rango de sustratos oxidados más amplio. Posteriormente, Busi *et al.* (2000) reportaron que este aumento en actividad fue debido a que la doble modificación del citocromo c modificó el estado del spin del fierro convirtiéndolo de un estado de bajo spin (hexacoordinado) a uno de alto spin (pentacoordinado); además, los autores sugirieron que el aumento en el rango de sustratos oxidados se debió a un incremento en la hidrofobicidad del sitio activo.

Con el propósito de comparar la capacidad contra hidrocarburos poliaromáticos, se determinó la actividad específica de la hemoglobina-PEG-Met y la hemoglobina no modificada contra 13 sustratos aromáticos en un sistema que contenía 15% de acetonitrilo. En la tabla XVII se muestran los resultados obtenidos. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se determinó la capacidad de la hemoglobina para oxidar HPA's en un sistema con 20% de acetonitrilo (Ortiz-Leon *et al.*, 1995); bajo esas

condiciones la hemoglobina fue incapaz de catalizar la oxidación de algunos sustratos como el fenantreno, acenafteno y fluoranteno. Como se muestra en la tabla XVII, en un sistema con 15% de acetonitrilo (5% menos que el trabajo previo) la hemoglobina catalizó la oxidación de 10 de los 13 sustratos ensayados. Entre ellos están incluidos el benzo(a)pireno, azuleno, pireno, tiantreno y los compuestos no reconocidos como sustratos anteriormente, acenafteno, fenantreno y fluoranteno. La importancia de la concentración del solvente en la partición del sustrato entre el solvente y el sitio activo ha sido demostrado anteriormente para la oxidación del pireno con el citocromo c y otras peroxidasas (Torres et al., 1998). Una disminución del 5 % de acetonitrilo en el sistema de reacción decrece lo suficiente la hidrofobicidad del medio como para que la partición del sustrato hacia el sitio activo de la hemoglobina esté favorecida sobre la partición hacia el solvente.

Tabla XVII.- Actividad específica (min^{-1}) de la hemoglobina no modificada y la hemoglobina modificada químicamente contra diferentes HPA's .

Sustrato	P.I. ²	No modificada	Hemoglobina-PEG-Met
Azuleno	7.43	2.2 (± 0.14)	10.8 (± 0.74)
Dibenzotiofeno	7.4	0.7 (± 0.02)	7.3 (± 0.5)
Tiantreno	7.8	1.5 (± 0.07)	6.8 (± 0.37)
Antraceno	7.5	0.4 (± 0.02)	2.6 (± 0.26)
Benzo(a)pireno	7.63	0.3 (± 0.01)	2.4 (± 0.08)
Pireno	7.72	0.19 (± 0.07)	1.5 (± 0.07)
Acenafteno	7.73	0.035 (± 0.003)	0.29 (± 0.007)
Fluoreno	7.91	0.016 (± 0.003)	0.15 (± 0.003)
Fenantreno	8.07	0.021 (± 0.001)	0.14 (± 0.003)
Fluoranteno	7.95	0.016 (± 0.007)	0.10 (± 0.003)
Bifenilo	8.64	NR	NR
Dibenzofurano	8.77	NR	NR
Criseno	7.80	NR	NR

² potencial de ionización en eV (Mallard y Linstrom, 1998).

NR No se detectó reacción

La capacidad de la hemoglobina para catalizar la oxidación de sustratos poliaromáticos está limitada por el potencial de ionización del sustrato. En la tabla XVII se muestran los valores del potencial de ionización de los sustratos utilizados. Como puede apreciarse, hidrocarburos poliaromáticos con potencial de ionización hasta de 8 eV son susceptibles de ser modificados. La correlación entre la actividad catalítica y el potencial de ionización de los HPA's sugiere un mecanismo de oxidación por un electrón mediado por radicales libres reportado para diferentes peroxidasas (figura 18) (morehouse et al., 1989; Vazquez-Duhalt *et al.*, 1994). Los sustratos azufrados ensayados, tiantreno y dibenzotiofeno, escapan a esta correlación debido a que son oxidados por un mecanismo diferente. Al parecer, la hemoglobina, al igual que la cloroperoxidasa y el citocromo P-450, oxida a los compuestos azufrados transfiriendo oxígeno directamente desde el fierro y no transfiriendo electrones desde los bordes de la protoporfirina, como en los HPA's (Ortiz de Montellano, 1992).

La hemoglobina-PEG-Met mostró una actividad específica de hasta 10 veces mayor que la hemoglobina no modificada para los diferentes HPA's ensayados. Modificaciones similares hechas al citocromo c de corazón de caballo incrementaron su actividad específica hasta 10 veces en la oxidación de sustratos poliaromáticos (Tinoco *et al.*, 1998). Al parecer, un aumento en la hidrofobicidad superficial y del sitio activo son responsables principales de un incremento en la afinidad de la proteína modificada por los sustratos hidrofóbicos, y en consecuencia, del incremento en la actividad específica.

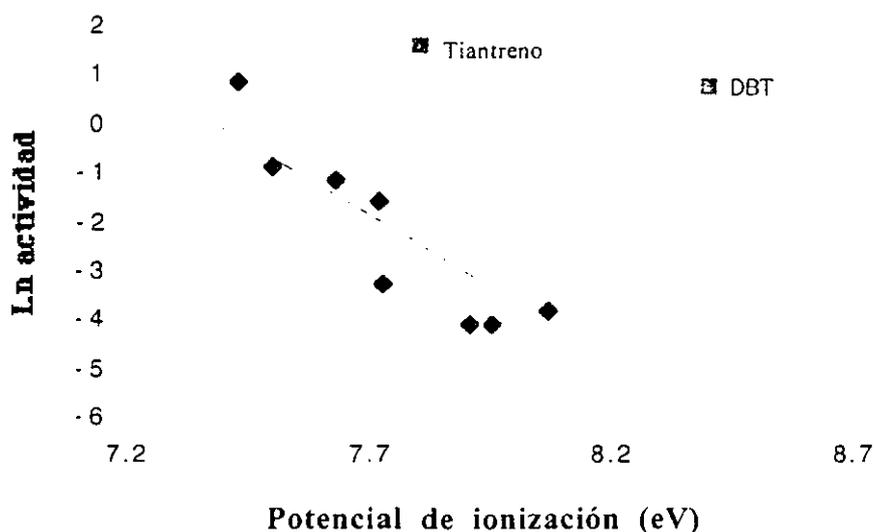


Figura 18.- Dependencia del potencial de ionización del sustrato sobre la actividad específica de la hemoglobina humana.

Para comprobar esto último se prosiguió a la determinación de la afinidad a través de las constantes de disociación para tres sustratos fenólicos de hidrofobicidad variada. Se utilizaron sustratos fenólicos para evitar la presencia de solventes orgánicos, cuyo efecto es más pronunciado que los cambios detectados por el acomplejamiento con el sustrato en la banda Soret de la hemoglobina. En la tabla XVIII se muestran las constantes de disociación para el *o*-metoxifenol, fenol, y resorcinol para la hemoglobina PEG-Met y la no modificada. Como se muestra, el aumento en la hidrofobicidad del sustrato, o una reducción en la solubilidad del mismo, incrementa la formación del complejo sitio activo-sustrato para la hemoglobina modificada, reflejado por la disminución de la constante de disociación. La doble modificación de la hemoglobina incrementa significativamente la afinidad por los mismos sustratos. Este incremento es más notorio a medida que se utilizan sustratos más hidrofóbicos.

Tabla XVIII.- Constantes de disociación para la hemoglobina PEG-Met y para la hemoglobina no modificada.

Sustrato	Solubilidad en agua	K_D (mM)	
		Hemoglobina	Hemoglobina- PEG-Met
Resorcinol	10.0 M	221.0	138.0
Phenol	0.7 M	29.8	13.1
Guaiacol	0.12 M	45.8	3.6

El aumento en la afinidad por los sustratos hidrofóbicos sugiere un incremento en la hidrofobicidad del sitio activo de la hemoglobina modificada, lo que podría indicar que el incremento de la actividad específica de la hemoglobina modificada sobre la no modificada se debe a la mayor facilidad de la hemoglobina PEG-Met de formar complejo con el sustrato. Esta conclusión está soportada por resultados reportados en la literatura. Por ejemplo, Wangikar et al. (1995) reportaron que la catálisis de la subtilisina procedía más eficientemente con sustratos hidrofóbicos en agua, debido principalmente a dos contribuciones energéticas: la primera, la energía diferencial del estado basal del sustrato disminuye a medida que aumenta la hidrofobicidad del sustrato; esto es, el sustrato mientras más hidrofóbico sea tendrá mayor tendencia a desolvatarse y de asociarse con un medio hidrofóbico (sitio activo); y la segunda, la energía de estabilización del estado de transición (acomplejamiento enzima-sustrato) también disminuía a medida que el sustrato incrementa su hidrofobicidad.

Finalmente, en la figura 19 se muestra el efecto de la concentración de acetonitrilo sobre la biocatálisis con las dos hemoglobinas. Como puede apreciarse, la doble

modificación de la hemoglobina resulta en un biocatalizador que es activo a concentraciones de solvente en la que la hemoglobina no modificada no es activa. Esto puede significar que la hemoglobina modificada es más resistente al solvente, por un lado, y que tiene mayor capacidad de competir con el solvente por el sustrato, por otro lado.

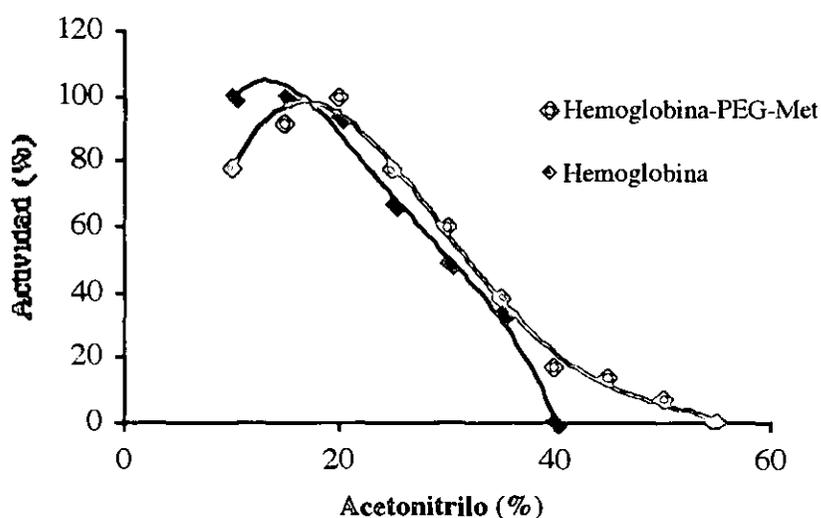


Figura 19.- Efecto de la concentración de solvente sobre la actividad catalítica de la hemoglobina modificada y no modificada.

Con base en los resultados obtenidos podemos concluir que es posible modificar la partición del sustrato hacia el sitio activo de las hemoproteínas en sistemas con solventes orgánicos por la modificación química *ex-situ* e *in-situ* del grupo hemo.

Los resultados del efecto de la modificación química *in situ* de la hemoglobina sobre su comportamiento biocatalítico contra los hidrocarburos poliaromáticos en sistemas con solvente orgánico fueron publicados en la revista *Biochemical and Biophysical Research Communications*, se adiciona una copia del mismo en el anexo I.

5 Conclusiones

- La reconstitución de la apocloroperoxidasa de *C. fumago* con hemo no modificado y modificado no fue posible debido probablemente al replegamiento incorrecto de la proteína. Este replegamiento inadecuado podría deberse a que la proteína madura ha sufrido dos cortes proteolíticos que impedirían el replegamiento logrado *in vivo* con la proteína completa.
- Fue posible modificar el comportamiento biocatalítico de la hemoglobina a través de la modificación química *ex-situ* del grupo hemo.
- La modificación del hemo con polietilenglicol de tamaños 350 o 750 Da produjo cambios mínimos en las constantes catalíticas de la hemoglobina contra tiantreno en sistemas con solvente orgánico
- La afinidad por sustratos de diferente hidrofobicidad disminuyó drásticamente debido probablemente a los cambios de hidrofobicidad del sitio activo y a efectos estéricos.
- Las simulaciones computacionales, obtenidas de minimizaciones energéticas, de las reconstituciones de la hemoglobina con hemo-PEG 750 revelaron que el acceso al sitio activo de la hemoglobina está estéricamente limitado por la cadena de PEG.
- El incremento en la hidrofobicidad superficial, a través de la modificación con polietilenglicol de 5000 Da, y del sitio activo, metilando los carboxilos del hemo, favorecieron la partición de sustratos hidrofóbicos, como los HPA's y fenoles, hacia el sitio activo incrementando hasta 10 veces la actividad específica contra los HPA's y hasta 13 veces la afinidad por los sustratos fenólicos.

6 Referencias

- Aitken, M.D., Irvine, R.L. (1989). Stability testing of ligninase and Mn peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnol. Bioeng.** 34:1251-1260.
- Akasaka, R., Mashino, T., Hirobe, M. (1994). Hydroxylation of benzene by immobilized cytochrome c in an organic solvent. **J. Chem. Soc. Perkin. Trans.** 1:1817-1821.
- Alvarez, J.C., Ortiz de Montellano, P.R. (1992). Thianthrene-5-oxide as a probe of the electrophilicity of hemoprotein oxidizing species. **Biochemistry**, 31: 8315-8322
- Arnao, M.B., Acosta, M., del Rio, J. A., Varon, R., Garcia-Canovas, F. (1990). A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. **Biochem. Biophys. Acta**, 1041:43-47.
- Ascoli, F., Fanell, M. R. S., Antonini, E. (1981). Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins. **Methods in Enzymology**, 76: 72-87
- Ator, M. A., David, S. K., Ortíz de Montellano, P. R. (1987). Structure and catalytic mechanism of horseradish peroxidase: Regiospecific meso alkylation of the prosthetic heme group by alkylhydrazines. **J. Biol. Chem.** 262, 31: 14954 – 14960.
- Azari, M.R., Wiseman, A. (1982). Purification and characterization of cytochrome P-448 component of benzo[a]pyrene hydroxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Anal. Biochem.** 122:129-138.
- Backes, W.L., Cawley, G., Eyer, C.S., Means, M., Causey, K.M., Canady, W.J. (1993). Aromatic hydrocarbon binding to cytochrome P450 and other enzyme binding sites: are hydrophobic compounds drawn into the active site or pushed from the aqueous phase?. **Arch. Biochem. Biophys.** 304, 1: 27-37
- Baust-Timpson, M., Sester-Wasserthal, P. (1998). CLEC's: robust and efficient biocatalyst for fine chemicals and pharmaceutical manufacturing. **Specialty Chemicals.** 18: 248 - 251
- Bech, L.M., Breddam, K.. (1988). Chemical modifications of cysteinyl residue introduced in the binding site of carboxipeptidase Y by site directed mutagenesis. **Carlsberg-Res. Commun.** 53: 381 - 393

- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E. (1996). Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62, 7:2547-2553.
- Black, J.A., Birge, W.J., Westerman, A.G., Francis, P.C. (1983). Comparative aquatic toxicology of aromatic hydrocarbons. **Fundam. Appl. Toxicol.** 3:353-358.
- Boffi, A., Zamparelli, C., Verzili, D., Ilari, A., Chiancone E. (1997). Effect of the vinyl - globin interactions on the temperature-dependent broadening of the Soret spectra: a study with horse myoglobin and *Scapharca* dimeric hemoglobin reconstituted with unnatural 3, 4-heme derivatives. **Arch. Biochem. Biophys.** 340, 1: 43 - 51
- Bogan, B.W., Lamar, R.T. (1995). One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 61, 7:2631-2635.
- Bogan, B.W., Lamar, R.T. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-625 and its extracellular lignolytic enzymes. **Appl. Environ. Microbiol.** 62, 5:1597-1603.
- Busi, E., Howes, B. D., Pogni, R., Basosi, R., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. (2000). Modified cytochrome c/H₂O₂ system: spectroscopic EPR investigation of the biocatalytic behaviour. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, 9: 39-48.
- Carrillo - Muñoz, J. R., Bouvet, D., Guibe -Sampel, E., Loupy, A., Petit, A. (1996). Microwave - promoted lipase-catalyzed reactions. Resolutions of (+/-) - 1- Phenyl ethanol. **J. Org. Chem.** 61: 7746 - 7749
- Casella, L., Gullotti, M., Gitezzi, R., Poli, S., Beringhelli, T., Colonna S., and Carrea, G.. (1992). Mechanism of enantioselective oxygenation of sulfides catalyzed by chloroperoxidase and horseradish peroxidase. Spectral studies and characterization of enzyme-substrate complexes. **Biochemistry**, 31: 9451-9459
- Catalano, C.E., Ortiz de Montellano, P.R. (1987). Oxene transfer, electron abstraction and cooxidation in the epoxidation of stilbene and 7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene by hemoglobin. **Biochemistry**. 26: 8373-8380.

- Colonna, S., Gaggero, N., Manfredi, A., Casella, L., Gullotti, M., Carrea, G. (1990). Enantioselective oxidations of sulfides catalyzed by chloroperoxidase. **Biochemistry**. 29, 46: 10465-10468.
- Colonna, S., Gaggero, N., Carrea, C., Pasta, P. (1994). The microperoxidase-11 catalyzed oxidation of sulfides enantioselective. **Tetrahedron Lett.** 35, 48: 9103-9104
- Colonna, S., Gaggero, N., Casella, L., Carrea, G., Pasta, P. (1993). Enantioselective epoxidation of styrene derivatives by chloroperoxidase catalysis. **Tetrahedron: Asymm.** 4, 6:1325-1330
- Constantino, H. R., Griebenow, K., Langer, R., Klibanov, A. M. (1997). On the pH memory of lyophilized compounds containing protein functional groups. **Biotechnol. Bioeng.** 53: 345- 348
- DeSantis, G., Jones, B. (1999). Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. **Current Opinion in Biotechnology.** 10: 324 - 330
- DeSantis, G., Jones, J. B. (1998). Chemical modifications at a single site can induce significant shifts in the pH activity profiles of a serine protease. **J. Am. Chem. Soc.** 120: 8582 - 8586
- DiNello, R. K., Dolphin, D. H. (1981). Substituted hemins as probes for structure-function relationships in horseradish peroxidase. **J. Biol. Chem.** 256. 13: 6903- 6912
- Dolphin, D. H., Nakano, T., Kirk, t. K., Wijesekera, r. L., Farrell, R. K., Malone, T. E. (1990). Porphirins and uses thereof. **US Patent** 4, 892 – 941.
- Durant, J.L., Busby Jr., W.F., Lafleur, A.L., Penman, B.W., Crespi, C.L. (1996). Human cell mutagenicity of oxigenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. **Mutation Res.** 371:123-157.
- Fioretti, E., Ascoli, F., Brunori, M. (1976). Preparations of apohemoglobin trout IV and reconstitution with different hemes. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 68: 4; 1169 – 1173.
- Fowler, S.M., England, P.A., Westlake, A.C.G., Rouch, D.R., Nickerson, D.P. (1994). Cytochrome P450_{cam} monooxygenase can be redesigned to catalyse the regioselective aromatic hydroxylation of diphenylmethane. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.** 2761-2762

- Fujita, A., Senzu, H., Kunitake, T., Hamachi, I. (1994). Enhanced peroxidase activity of cytochrome c by phosphate bilayer membrane. **Chem. Lett.** 1219-1222.
- Garcia, D., Ortega, F., Marti, J.L. (1998). Kinetics of thermal inactivation of horseradish peroxidase: stabilizing effect of methoxypoly(ethylenglycol). **Biotechnol. Appl. Biochem.** 27: 49-54
- Geigert, J., Datielas, D., Neidleman, S. L., Lee, T. D., Wadsworth, J. (1983). Peroxide oxidation of primary alcohols to aldehydes by chloroperoxidase catalysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 114, 3: 1104-1108
- Govardhan, C. (1999). Cross linking of enzymes for improved stability and performance. **Current Opinion in Biotechnology.** 10: 331 - 335
- Griebenow, K., Klivanov, A. M. (1997). Can conformational changes be responsible for solvent and excipient effects on the catalytic behaviour of subtilisin Carlsberg in organic solvents?. **Biotechnol. Bioeng.** 53: 35 - 362
- Griffoll, M., Selifonov, S.A., Gatlin, C. V., Chapman, P.J. (1995). Actions of a versatile fluorene-degrading bacteria isolate on polycyclic aromatic compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** 61,10:3711-3723.
- Grimberg, S.J., Stringfellow, W.T., Aitken, M.D. (1996). Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of nonionic surfactant. **Appl. Environ. Microbiol.** 62,7:2387-2392.
- Gron, H., Bech, L. M., Branner, S., Breddam, K. (1990). A highly active and oxidation-resistant subtilisin-like enzyme produced by a combination of site-directed mutageneses and chemical modification. **Eur. J. Biochem.** 194: 897 - 901
- Halling, P. (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 178-205.
- Hammel, K.E., Kayanamaran, B., Kirk, T.K. (1986). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. **J. Biol. Chem.** 36:16948-16952.
- Hernáiz, M. L., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V. (1997) Influence of the nature of modifier in the enzymatic activity of chemical modified semipurified lipase from *Candida Rugosa*. **Biotechnol. Bioeng.** 55: 252 - 260

- Hernández, J., Robledo, N. R., Velasco, L., Quintero, R., Pickard, M. A., Vázquez-Duhalt, R. (1998). Chloroperoxidase-mediated oxidations of organophosphorus pesticides. **Pesticide Biochem. Physiol.** 61: 87-94
- Ito, Y., Sugimura, N., Kwon, H. O., Imanishi, Y. (1999). Enzyme modifications by polymers with solubilities that change in response to photo irradiation in organic media. **Nature Biotechnology.** 17: 73 - 75
- Jene, Q., Pearson, J. C., Lowe, C. R. (1997) Surfactant modified enzymes: solubility and activity of surfactant-modified catalase in organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.** 20: 69 - 74
- Johnson, T. M., Li, J. K.K. (1991). Heterologous expression and characterization of an active lignin peroxidase from *P. chrysosporium* using recombinant *Baculovirus*. **Arch. Biochem. Biophys.** 291, 2: 371 - 378
- Khatishvili, G., Gordeziani, M., Kvesitadze, G., Korte, F. (1997). Plant monooxygenases: participation in xenobiotic oxidation. **Ecotoxicol. Environ. Safety.** 36: 118-122
- Khmel'nitsky, Y. L., Mozhaev, V. V., Belova, A. B., Sergeeva, M. V., Martinek, K. (1991). Denaturation capacity: a new quantitative criterion for the selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. **Eur. J. Biochem.** 198: 31-41.
- Khmel'nitsky, Y., Rich, J. O. (1999). Biocatalysis in nonaqueous solvents. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 3: 47 - 53
- King, D.J., Azari, M.R., Wiseman, A. (1984). Studies on the properties of highly purified cytochrome P₄₄₈ and its dependent activity benzo[a]pyrene hydroxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Xenobiotica**, 14, 1/2:187-206
- Kitaguchi, H., Klibanov, A.M. (1989). Enzymatic peptide synthesis via segment condensation in the presence of water mimics. **J. Am. Chem. Soc.** 111: 9272 - 9273
- Klyachko, N. L., Klibanov, A. M. (1992). Oxidation of dibenzothiophene catalyzed by hemoglobin and other hemoproteins in various aqueous-organic media. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 37, 53 - 68.
- Kusk, K.O. (1981). Comparison of the effects of aromatic hydrocarbons on a laboratory alga and natural phytoplankton. **Bot. Mar.** 24:611-613

- Liu, C. , Bo, A., Cheng, G., Lin, X., Dong, S. (1998). Characterization of the structural and functional changes of hemoglobin in dimethyl sulfoxide by spectroscopic techniques. **Biochim. Biophys. Acta**, 1398: 53-60.
- Lundbland, R.L., Bradshaw, R. A. (1997). Applications of site-specific chemical modifications in the manufacture of biopharmaceuticals: I. An overview. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 26: 143 - 151
- Mallard, W. G., Linstrom. P. J. (1998). Ion Energetic data. En **NIST Chemistry Webbook**, NIST Standard Reference Database Number 69 (Online). National Institute of Standards and Technology: Gaitherrburg, MD. (<http://webbook.nist.gov>)
- Masaphy, S., Levanon, D., Henis, Y., Venkateswarlu, K., Kelly, S.L. (1995). Microsomal and cytosolic cytochrome P₄₅₀ mediated benzo[a]pyrene hydroxylation in *Pleurotus pulmonarius*.. **Biotechnol. Lett.** 17:969-974.
- Meulenber, R., Rijnaarts, H.H.M., Doddema, H.J., Field, J.A. (1997). Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. **FEMS-Microbiol. Lett.** 152, 1:45-49.
- Mieyal, J.J., Ackerman, R.S., Freeman, L.S. (1976). Characterization of enzyme-like activity of human hemoglobin. **J. Biol. Chem.** 251: 3436-3441
- Miller, V. P., DePillis, G. D., Ferrer, J. C., Mauk, A. G., Ortiz de Montellano, P. R. (1992). Monooxygenase activity of cytochrome c peroxidase. **J. Biol. Chem.** 267, 13: 8936-8942
- Millquist - Fureby, A., Gill, I. S., Vultson, E.N. (1997). Enzymatic transformations in supersaturated substrate solutions: I. A general study with glycosidases. **Biotechnol. Bioeng.** 60: 190-196
- Modi, S., Primrose, W. V., Lian, L. Y., roberts, G. C. K. (1995). Effect of replacement of ferroprotoporphyrin IX in the haem domain of cytochrome P450 BM - 3 on substrate binding and catalytic activity. **Biochem. J.** 310: 939 - 943
- Morehouse, K. M., Sipe, H. J., Mason, R. P. (1989). The one-electron oxidation of porphyrins to porphyrin Pi-cation radicals by peroxidases: an electron spin resonance investigation. **Arch. Biochem. Biophys.** 273, 1 :158-164.

- Nagabula, E., Rifkind, J. M. (1998). Formation of fluorescent heme degradations products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 247, 592-596
- Nall, B. T. (1996). Cytochrome c folding and stability. En **Cytochrome c, a multidisciplinary approach**. (eds Scott, R.A., Grant mauk, A.). pp 167-200. University Science Books, California, USA.
- Ohya, Y., Miyaoka, J., Ouch., T. (1996). Recruitment of enzyme activity in albumin by molecular imprinting. **Macromol. Rapid. Commun.** 17: 871 - 874
- Ortiz de Montellano, P. R. (1992). Catalytic sites of hemoprotein peroxidases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 32: 89-107.
- Ortiz-Leon, M., Velasco, L., Vazquez-Duhalt, R. (1995). Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by hemoglobin and hydrogen peroxide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 215, 3:968-973
- Pappa, H. S., Cass, E. G. (1993). A step towards understanding the folding mechanism of horseradish peroxidase. **Eur. J. Biochem.** 212:227-235.
- Pipe, R.K., Moore, M.N. (1986). An ultrastructural study on the effects of phenanthrene on lysomal enzyme glucoronidase in digestive cell of periwinkle *Littorina littorea*. **Aquat. Toxicol.** 8:65-76
- Quiocho F. A, Richards F.M. (1964). Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: carboxipeptidase - A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 52: 833 - 839
- Rice-Evans, C. A., Diplock, A. T., Symons, M. C. R. (1991). **Techniques in Free Radical Research**. Elsevier
- Ryabov, A. D., Goral, V. N., Gorton, L., Csöregi, E. (1999). Electrochemically and catalytically active reconstituted horseradish peroxidase with ferrocene - modified hemin and an artificial binding site. **Chem. Eur. Journal.** 5, 3: 961 - 967
- Ryu, K., Dordick, J. S. (1992). How the organic solvent affect peroxidase structure and function. **Biochemistry**, 31: 2588 - 2598
- Sanglard, D., Leisola, M.S.A., Fiechter, A. (1986). Role of extracellular ligninases on biodegradation of benzo[a]pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme Microb. Technol.** 8:209-212

- Satoh, K., Sato, R., Takahata, T., Suzuki, S., Hayakari, M., Tsuchida, S., Hayatama, I. (1999). Quantitative differences in the active-site hydrophobicity of five human glutathione S-transferase isoenzymes: water-soluble carcinogen-selective properties of the neoplastic GSTP1-1 species. **Arch. Biochem. Biophys.** 361, 2: 271-276
- Savino, J.F., Tanabe, L.L., (1984). Sublethal effects of phenanthrene, nicotine and pinane on *Daphnia pulex*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 42:778-784
- Schmid, F.X. (1992). Kinetics of unfolding and refolding of single-domain proteins. In **Protein Folding**. (Ed. Creighton, T.E.), pp 197-242. W.H. Freeman and Company, New York.
- Schmitke, J. L., Stern, L. J., Klibanov, A. M. (1997). The Crystal Structure of Butilisin Carlsberg in anhydrous dioxane and its comparison with those in water and acetonitrile. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 94: 4250- 4255
- Slade, C. J., Vultson, E. N. (1998). Induction of catalytic activity in proteins by lyophilization in the presence of a transition state analogue. **Biotechnol. Bioeng.** 57: 211 - 215
- Smith, H. B., Larimer, F. W., Hartman, F. C. (1988). Subtle alteration of the active site ribulose carboxylase/oxygenase by concerted site-directed mutagenesis and chemical modification. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 152: 579- 584
- Snell, S. M., Marini, M.A. (1988). A convenient spectroscopic method for the estimation of hemoglobin concentrations in cell-free solutions. **J. Biochem. Biophys. Meth.** 17: 25-34
- St. Clair N. L., Navia M. A. (1992). Cross linked enzyme crystals as a robust biocatalyst. **J. Am. Chem. Soc.** 114: 7314 - 7316
- Sundaramoorthy, M., Turner, J., Poulos, T. L. (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase - cytochrome P450 functional hybrid. **Structure.** 3: 1367 – 1377
- Takahashi, K., Matsushima, A., Saito, Y., Inada, Y. (1986). Polyethylene glycol-modified hemin having peroxidase activity in organic solvents. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 138, 1, 283 – 288.

- Tams, J.W., Welinder, K.G. (1996). Unfolding and refolding of *Coprinus cinereus* peroxidase at high pH, in urea, and at high temperature. Effect of organic and ionic additives on these processes. **Biochemistry**, 35:7573-7579
- Tams, J.W., Welinder, K.G. (1998). Glycosilation and thermodynamic versus kinetic stability of horseradish peroxidase. **FEBS Letters** 421:234-236
- Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. (1998). Chemical modifications of cytochrome c improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Enzyme Microb. Technol.** 22: 8 -12
- Torres, E., Sandoval, J.V., Rossell, F.I., Mauk, A.G., Vazquez-Duhalt, R. (1995). Site-directed mutagenesis improved biocatalytic activity of iso-1-cytochrome c in polycyclic hydrocarbon oxidation. **Enzyme Microb. Technol.** 17:1014-1020.
- Torres, E., Siminovich, B., Barzana, E., Vazquez-Duhalt, R. (1998). Thermodynamic hydrophobicity of aqueous mixtures of water-miscible organic solvents predicts peroxidase activity. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic** 4: 155-159
- Torres, E., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. (1996). Solvent hydrophobicity predicts biocatalytic behaviour of lignin peroxidase and cytochrome c in aqueous solution of water-miscible organic solvents. **J. Biotechnol.** 49: 59-67
- Torres, R. E. (1998). Ingenieria de solventes en la biocatálisis con citocromo c. **Tesis de Maestría**. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Tsapraillis, G., Chan, D. W. S., English, A.M. (1998). Conformational states in denaturants of cytochrome c and horseradish peroxidase examined by fluorescence and circular dichorism. **Biochemistry**, 37: 2004-2016.
- van Deurzen, M. P. J. (1996). Selective Oxidations Catalyzed by chloroperoxidase. **Tesis Doctoral**. University of Technology, Julianalaan. The Netherlands
- Vázquez-Duhalt, R. (1997). Hemoproteins as biocatalyst for the oxidations of polycyclic aromatic hydrocarbons. In **advances in Bioprocess Engineering II**. (Eds. Galindo, E., Ramírez, O. T.), pp 183-207. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Vazquez-Duhalt, R. (1999). Cytochrome c as biocatalyst. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic** 7:241-249

- Vazquez-Duhalt, R., Fedorak, P.M., Westlake, W.S. (1992). Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents. **Enzyme Microb. Technol.** 14: 837-841.
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S., Fedorak, P.M. (1993). Cytochrome c as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. **Enzyme Microb. Technol.** 15:494-499.
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S., Fedorak, P.M. (1994). Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. **Appl. Environ. Microbiol.** 60, 2:459-466
- Volkering, F., Breure, A.M., van Andel, J.G., Rukens, W.H. (1995). Influence of nonionic surfactant on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 61, 5:1699-1705.
- Volkering, F., Breure, A.M., Sterkenburg, A., van Andel, J.G. (1992). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36:548-552.
- Wang Y. F., Yakovlevsky, K., Margolin, A. L., (1996). An efficient synthesis of chiral amino acid and peptide alkylamides via CLEC - subtilisin catalyzed coupling and in situ resolution. **Tetrahedron.** 37: 5317 - 5320
- Wang, P., Sergeeva, M. V., Lim, L., Dordick, J.S. (1997). Biocatalytic plastics as active and stable materials for biotransformations. **Nature Biotechnology.** 15: 789-793
- Wangikar, P. P., Rich, J. O., Clark, D. S., Dordick, J. S. (1995). Probing enzymic transition state hydrophobicities. **Biochemistry.** 34: 12302 – 12310.
- Whitwam, R. E., Gazarian, I. G., Tien, M. (1995). Expression of fungal Mn peroxidase in *E. coli* and refolding to yield active enzyme. 216, 3: 1013 – 1017.
- Wu, J., Gorenstein, G. (1993). Structure and dynamics of cytochrome c in nonaqueous solvents by 2D NH-exchange NMR spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.** 115, 15: 6843-6850.
- Xu, K., Griebenow, K., Klibanow, A. M. (1997). Correlation between catalytic activity and secondary structure of subtilisin dissolved in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.** 53: 351 – 362.

- Yoshida, Y., Kashiba, K., Niki, E. (1994). Free radical-mediated oxidation of lipids induced by hemoglobin in aqueous dispersion. **Biochim. Biophys. Acta.** 1201: 165-172.
- Zaks, A., Dodds, D. R. (1995). Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric oxidations: substrate specificity and mechanistic study. **J. Am. Chem. Soc.** 117, 42, 10419-10424.
- Zaks, A., Klibanov, A. M. (1988). The effect of water on enzyme action in organic media. **J. Biol. Chem.** 263, 17: 8017 – 8021.
- Zong, Q. Z., Pawel, A. O., Hager, L. P. (1995). High-pressure-assisted reconstitution of recombinant chloroperoxidase. **Biochemistry**, 34: 12420-12425.

Anexo I

Chemical Modification of hemoglobin improves biocatalytic oxidation of PAHs.

Chemical Modification of Hemoglobin Improves Biocatalytic Oxidation of PAHs

Eduardo Torres and Rafael Vazquez-Duhalt*

Biotechnology Institute, National University of Mexico, Av. Universidad Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

Received May 13, 2000

Chemical modifications on human hemoglobin were performed with the aim to change both surface and active-site hydrophobicities. The modifications included covalent coupling of poly(ethylene glycol) (5000 MW) on free amino groups and the methyl esterification of free carboxylic groups. The modified hemoglobin was assayed for the oxidation of 11 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and 2 organosulfur aromatic compounds. Acenaphthene, anthracene, azulene, benzo(a)pyrene, fluoranthene, fluorene, phenanthrene, and pyrene were transformed to their respective quinones, while for chrysene and biphenyl no biocatalytic reaction could be detected. Dibenzothiophene and thianthrene were oxidized to form sulf-oxides. The doubly modified hemoglobin, PEG-Met-hemoglobin, showed up to 10 times higher activity than the unmodified protein. The kinetic constants show that the PEG-Met-hemoglobin has a significantly higher catalytic efficiency. The equilibrium substrate binding constants for unmodified and PEG-Met-modified hemoglobins and hemoglobin show that this catalytic enhancement could be attributed to the affinity increase for hydrophobic substrates in the modified protein. © 2000 Academic Press

Key Words: chemical modifications; biocatalysis; hemoglobin; hemoproteins; PAHs.

Polycyclic aromatic hydrocarbons are considered a potential health risk because of their carcinogenic and mutagenic activity (1). They are components of crude oil, creosote and coal tar and they are widespread environmental concern. Some hemoproteins, such as lignin peroxidase (2, 3), manganese peroxidase (4), cytochrome P450 (5), cytochrome c (6) and hemoglobin (7) are able to oxidize PAHs in the presence of hydrogen peroxide. The products from the hemoprotein-mediated oxidation of PAHs are mainly quinones (8).

* To whom correspondence should be addressed at Center for Agricultural Biotechnology, 3115 Plant Science Building, University of Maryland, College Park, MD 20742-4459. Fax: (301)314-9075. E-mail: vazquez@umbi.umd.edu.

This biocatalytic oxidation may reduce significantly the mutagenic activity of these pollutants (9), and may increase their biodegradability (10). A limiting factor in the enzymatic oxidation of hydrophobic substrates, such as the PAHs, is the substrate partition between the active site of the hemoprotein and the bulk solvent (11). Some hemoproteins have been chemically modified to improve their catalytic properties in the oxidation of different substrates in organic solvent (12–14). In this work, with the aim to improve the substrate partition to the protein active site, human hemoglobin was chemically modified in two ways: a modification on superficial amino groups with poly(ethylene glycol), and a methylation on free carboxylic groups. The effect of this modification on the biocatalytic activity against PAHs was evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Human hemoglobin, boron trifluoride-methanol and methoxy-poly(ethylene glycol) activated with cyanuric chloride were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Polycyclic aromatic hydrocarbons were obtained from Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). HPLC-grade acetonitrile was purchased from Merck (Germany). Buffer salts and hydrogen peroxide were obtained from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ).

Chemical modifications. Chemical modifications of hemoglobin were realized as previously reported for horse heart cytochrome c (14). PEG-hemoglobin was prepared as follows: 5 times molar excess, based on free amino groups, were added to 20 ml of 100 μ M hemoglobin solution in 50 mM sodium borate buffer, pH 10. The reaction mixture was shaken during 2 h at room temperature. The reaction mixture was then dialyzed and concentrated in an Amicon ultrafiltration cell with a 10,000-Da membrane. PEG-Met-hemoglobin was prepared by methylation of free carboxylic groups on the PEG-hemoglobin. Lyophilized PEG-hemoglobin (65 mg) was dissolved in 2 ml boron trifluoride-methanol reagent (BF₃·methanol). The reaction mixture was held one hour at room temperature and then it was dialyzed and concentrated on an Amicon ultrafiltration system through a 10,000-Da membrane.

Reactions conditions. Specific activities of human hemoglobin were estimated in 1-ml reaction mixture containing from 0.7 to 3.3 mM hemoglobin preparation, and 2 μ M PAHs in a medium containing 15% acetonitrile–60 mM phosphate buffer, pH 6.1. Reaction were started by adding 10 mM hydrogen peroxide. The reaction progress was followed by a HPLC system equipped with a reverse-phase



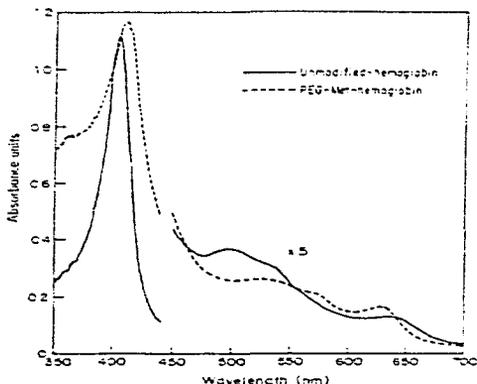


FIG. 1. Unmodified and PEG-Met-modified hemoglobin spectra.

column Resolve C₁₈, 5 μ m as previously reported (14). All reactions were done in triplicate. Kinetics constants were calculated using pyrene as substrate and monitoring the reaction spectrophotometrically at 335 nm, as previously described (7). The inactivation rates were determined by incubating modified and unmodified hemoglobins, during different times, in the presence of 10 mM hydrogen peroxide, and the reaction was then started by adding 20 μ M pyrene in acetonitrile. The inactivation constant was then determined from a first-order equation.

Substrate binding studies. The equilibrium constants for the binding of resorcinol, phenol and o-methoxyphenol to modified and unmodified hemoglobins were determined from spectrophotometric titration (15). The measurements were carried out in 1-ml cell containing a protein solution in 50 mM phosphate buffer, pH 6.1, and under N₂ atmosphere. Microliter amounts of concentrated solutions of phenols were added to the sample cell and an equivalent volume of buffer to the enzyme solution in the reference cell. After reaching the equilibrium, the difference spectra was recorded. The dissociation constants were calculated from the following linear equation (16):

$$1/\Delta A = K_d/\Delta A_0(1/S_0) + 1/\Delta A_0,$$

where ΔA and ΔA_0 are the absorbance changes at 405 nm at a given initial (S_0) and saturating substrate concentrations respectively, and K_d is the dissociation constant of the enzyme-substrate complex.

RESULTS AND DISCUSSION

Hemoglobin is able to catalyze the oxidation of several polycyclic aromatic hydrocarbon, and the chemical nature of products has been determined by mass spectrometry (7). In order to reduce the mass transfer limitations during the reaction, two chemical modifica-

TABLE 1

Specific Activity (min⁻¹) of Unmodified and Chemically Modified Hemoglobin in the Oxidation of Different PAHs in 15% Acetonitrile

Substrate	Unmodified hemoglobin	PEG-Met-hemoglobin	Increase ratio
Azulene	2.2 \pm 0.24	10.5 \pm 1.74	4.8
Dibenzothophene	0.7 \pm 0.02	7.3 \pm 1	10.4
Thianthrene	1.5 \pm 0.37	6.2 \pm 0.37	4.5
Anthracene	3.4 \pm 0.02	2.6 \pm 0.26	0.5
Benzo[a]pyrene	0.3 \pm 0.1	2.4 \pm 0.2	8.0
Pyrene	0.19 \pm 0.07	1.5 \pm 0.07	7.9
Acenaphthene	0.035 \pm 0.0003	0.29 \pm 0.07	7.4
Fluorene	0.16 \pm 0.0033	0.15 \pm 0.03	0.9
Phenanthrene	0.307 \pm 0.001	0.14 \pm 0.002	0.9
Fluoranthene	0.016 \pm 0.007	0.10 \pm 0.002	6.1
Biphenyl	NR	NR	
Dibenzofuran	NR	NR	
Chryseno	NR	NR	

Note: NR, no reaction could be detected.

tions were performed on the hemoglobin molecule: the superficial hydrophobicity of the protein was increased by a covalent modification of free amino groups with activated poly(ethylene glycol) (5000 Da). Then, a methylation of free carboxylic groups was achieved, in which the propionate groups of the heme prosthetic group are also esterified. After the chemical modification differences in the absorption spectrum could be detected (Fig. 1). The shift on the Soret band indicates an environment change of the active site pocket (heme). This double chemical modification increased both, the activity and the range of PAH substrates, when cytochrome c was used as biocatalyst (14). In addition, to improve the substrate partition to the active site, the biocatalytic reactions were performed in the presence of only 15% acetonitrile. As showed in Table 1, the specific activity of PEG-Met-hemoglobin showed to be up to 10 times higher than the unmodified protein. This increase could be mainly attributed to the esterification of the carboxylic groups, which may increase the hydrophobicity of the active site. The methyl esterification of propionates was demonstrated by the

TABLE 2

Kinetic Constants of Unmodified and PEG-Met-Modified Hemoglobins for Pyrene Oxidation and Inactivation Constant in the Presence of 10 mM Hydrogen Peroxide*

	k_{cat} min ⁻¹	$K_{m,app}$ (mM)	$k_{inact}K_{m,app}$ min ⁻¹ mM	k_i min ⁻¹ s ⁻¹
Unmodified hemoglobin	2.5	15.0	166	0.48
PEG-Met-hemoglobin	5.7	10.8	620	0.17

* The reaction mixture contained 15% acetonitrile in 50 mM phosphate buffer, pH 6.1.

TABLE 3
Dissociation Constants for Phenols of Unmodified and PEG-Met-Modified Hemoglobins

Substrate	Water solubility (M)	K_d (nM)	
		Unmodified hemoglobin	PEG-Met-hemoglobin
Resorcinol	10.0	221.0	138.0
Phenol	0.7	29.8	13.1
Guaiacol	0.12	45.8	3.6

differences in the visible spectrum of solvent extracted heme before and after modification. In addition, the absorbance spectrum of the extracted heme from modified PEG-Met-hemoglobin matched that obtained from a protoporphyrin IX iron (III) methyl ester standard.

Under our reaction conditions, hemoglobin was able to oxidize 11 of 13 PAHs tested, including phenanthrene, acenaphthene, and fluoranthene. However, chrysene dibenzofuran and biphenyl were no substrates for neither, modified nor unmodified hemoglobins. The products from PAHs oxidation with PEG-Met-hemoglobin are the same found with unmodified hemoglobin (7), and as in the case of other hemoproteins, including peroxidases, these products are also mainly quinones (8). Thianthrene and dibenzothio-phenone were transformed by both hemoglobin preparations to their respective sulfoxides. In a previous work (7), unmodified hemoglobin was unable to oxidize phenanthrene, acenaphthene, and fluoranthene in reaction medium containing 20% acetonitrile. As showed in Table 1, a decrease from 20 to 15% of acetonitrile in the reaction mixture allowed phenanthrene, acenaphthene, and fluoranthene to react with unmodified hemoglobin. The importance of the solvent concentration on the substrate partition between the active site and the solvent has been demonstrated for pyrene oxidation by cytochrome c and other peroxidases (11, 16). For an aqueous mixture of water miscible organic solvent, the solvent hydrophobicity depends on the organic solvent concentration (16). Increasing this concentration, the partition of the hydrophobic substrate between the site active and reaction solvent becomes favorable to the bulk solvent, decreasing the enzyme-substrate interaction.

Kinetic constants for pyrene oxidation with hemoglobin and its chemical modification (PEG-Met-hemoglobin) in 15% acetonitrile are reported in Table 2. As shown, the double modification increased the catalytic constant (k_{cat}) for pyrene. The substrate affinity ($K_{M,app}$) is also slightly improved, and thus the catalytic efficiency of the PEG-Met-hemoglobin was 3.7 times higher than for unmodified hemoglobin. Interestingly, PEG-Met-hemoglobin showed to be more stable against the inactivation by the presence of hydrogen peroxide, than the unmodified protein. In order to determine the effect of the chemical modification on the

affinity for hydrophobic substrates, equilibrium experiments were performed using different phenols (resorcinol, phenol, and guaiacol). Phenols were used instead of PAHs to avoid the use of organic solvent in the system. Table 3 shows the dissociation constants for the three different phenols. Chemical modification of hemoglobin increased the substrate affinity, as shown by a decrease of the dissociation constant. The modified hemoglobin binds the substrate more tightly as the substrate hydrophobicity increases (Table 3). Thus, the activity increase could be attributed to the hydrophobicity increase of the active site after chemical modification.

In conclusion, hemoglobin is able to oxidize several PAHs including phenanthrene, acenaphthene and the well-known carcinogenic benzo(a)pyrene. The chemical modification on both, protein surface and site active pocket improves significantly the catalytic activity and stability of hemoglobin. Dissociation constants for aromatic substrates are reduced by the chemical modification, suggesting an increase of the active site hydrophobicity that enhances the formation of the substrate-protein complex. Different chemical and genetic modifications on hemoproteins are in progress in our laboratory with the aim to produce an attractive biocatalyst for environmental purposes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by a DGAPA-UNAM grant (IN 220597) and by the National Council for Science and Technology of Mexico (Grant 2576-A).

REFERENCES

- International Agency for Research on Cancer (1983) Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Part Chemical, Environmental and Experimental Data. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans, Vol. 32, World Health Organization, Lyon, France.
- Haemmerli, S. D., Lenoir, M. S., Sanglard, D., and Fletcher, A. (1986) Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 261, 18958-18962.
- Vazquez-Dunait, R., Westlake, D. W. S., and Fedorak, P. M. (1994) Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvent. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 459-466.
- Boğan, B. W., and Lamar, R. T. (1996) Polycyclic aromatic

- hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1597-603.
5. Azari, M. R., and Wiseman, A. (1982) Evaluation of immobilized cytochrome P448 from *Saccharomyces cerevisiae* using permeabilized cells, microsomal fraction, and highly purified reconstituted forms with benzo-3-monooxygenase activity *Enzyme Microb. Technol.* 4, 401-404.
 6. Torres, E., Sandoval, J. V., Rosell, F. I., Mauk, A. G., and Vazquez-Duhalt, R. (1995) Site-directed mutagenesis improves the biocatalytic activity of iso-1-cytochrome c in polycyclic hydrocarbon oxidation *Enzyme Microb. Technol.* 17, 1014-1020.
 7. Ortiz-Leon, M., Velasco, L., and Vazquez-Duhalt, R. (1995) Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by hemoglobin and hydrogen peroxide *Biochem Biophys Res Commun.* 215, 968-973.
 8. Vazquez-Duhalt, R. (1998) Hemoproteins as biocatalyst for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *In* Advances in Bioprocess Engineering II (Galindo, E., and Ramirez, O. T., Eds.), Kluwer Academic, The Netherlands.
 9. Durant, J. L., Busby, W. F. Jr., Lafleur, A. L., Penman, B. W., and Crespi, C. (1996) Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutat. Res.* 371, 123-157.
 10. Muelenberg, R., Rijnaarts, H. H. M., Doddema, H. J., and Field, J. A. (1997) Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability *FEMS Lett.* 152, 45-49.
 11. Torres, E., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. (1996) Solvent hydrophobicity predicts biocatalytic behavior of lignin peroxidase and cytochrome c in aqueous solution of water-miscible organic solvents. *J. Biotechnol.* 49, 59-67.
 12. Vazquez-Duhalt, R., Fedorak, P. M., and Westlake, D. W. S. (1992) Role of the enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 37-541.
 13. Moll, S., Primrose, W. V., Lian, L. Y., and Roberts, G. C. K. (1995) Effect of replacement of ferroprotoporphyrin IX in the haem domain of cytochrome P450 BM-3 on substrate binding and catalytic activity *Biochem. J.* 310, 939-943.
 14. Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. (1998) Chemical modification of cytochrome c improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 5-12.
 15. Casella, L., Guilotti, M., Gitezzi, R., Pili, S., Beringghelli, T., Colonna, S., and Carrea, G. (1992) Mechanism of enantioselective oxygenation of sulfides catalyzed by chloroperoxidase and horseradish peroxidase. Spectral studies and characterization of enzyme-substrate complexes. *Biochemistry* 31, 9451-9459.
 16. Torres, E., Siminovich, B., Barzana, E., and Vazquez-Duhalt, R. (1998) Thermodynamic hydrophobicity of aqueous mixtures of water-miscible organic solvents predicts peroxidase activity. *J. Mol. Catalysis B Enzymatic* 4, 155-159.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Rafael Vázquez Duhalt.

La realización de los estudios de Doctorado fue posible gracias al apoyo económico otorgado por el CONACyT, proyecto 121796 y por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP)